

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL SECRETOMA DE
Aspergillus brasiliensis OBTENIDO CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN CULTIVO EN
MEDIO LÍQUIDO**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

CARLOS GUERRERO URRUTIA

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Dr. Ricardo Hernández Martínez

Ciudad de México, 2017

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Ciudad de México a 28 de Agosto de 2017

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

Iztapalapa aprobó la tesis

**Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis* obtenido con
diferentes concentraciones de sacarosa en cultivo en medio líquido**

Presentó

Carlos Guerrero Urrutia

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesora: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Asesor: Dr. Ricardo Hernández Martínez

Jurado:

Presidente: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda



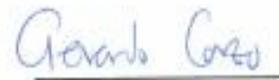
Secretario: Dr. Ulises Carrasco Navarro



Vocal: Dr. Ricardo Hernández Martínez

R. H. M.

Vocal: Dr. Gerardo Corzo Burguete



CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
AGRADECIMIENTOS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO (CML).....	2
2.2. INVERTASA.....	4
2.2.1. <i>Microorganismos productores de invertasa</i>	5
2.2.2. <i>Métodos de producción</i>	6
2.2.3. <i>Purificación, caracterización fisicoquímica y cinética de invertasas microbianas</i>	7
2.2.4. <i>Aplicaciones</i>	11
2.3. RESPIROMETRÍA.....	11
2.4. PROTEÓMICA.....	11
2.4.1. CARACTERÍSTICAS E IMPORTANCIA DEL SECRETOMA.....	12
2.4.2. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	13
2.4.2.1. <i>Geles de dos dimensiones 2-DE</i>	13
2.4.2.2. <i>Espectrometría de masas</i>	14
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS	18
6.1. GENERAL.....	18
6.2. ESPECÍFICOS.....	18
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
8. MATERIALES Y MÉTODOS	20
8.1. MICROORGANISMO.....	20
8.1.1. <i>Propagación y conservación de la cepa</i>	20
8.1.2. <i>Propagación del inóculo</i>	21
8.2. MEDIO DE CULTIVO.....	22
8.3. CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO (CML).....	22
8.4. CONDICIONES DE CULTIVO SIN CRECIMIENTO EN PARED.....	23
8.5. ESTUDIO RESPIROMÉTRICO.....	23
8.6. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE INVERTASA.....	24

8.7. OBTENCIÓN DEL SECRETOMA	24
8.8. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS	25
8.8.1. Geles SDS-PAGE.....	25
8.8.2. Geles 2D-PAGE.....	26
8.9. MÉTODOS ANALÍTICOS	27
8.9.1. Análisis de azúcares.....	27
8.9.2. Actividad invertasa.....	27
8.9.3. Análisis de proteína	28
8.10. ANÁLISIS DE IMÁGENES DE GELES 2D-PAGE	28
8.11. PROCESAMIENTO DE LOS “SPOTS”	29
8.11.1. Digestión con tripsina.....	29
8.11.2. Espectrometría de masas.....	30
8.12. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	30
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
9.1. CONDICIONES DE CULTIVO SIN CRECIMIENTO EN PARED (PRETRATAMIENTO CON SIGMACOTE®)	32
9.2. ANÁLISIS RESPIROMÉTRICO	33
9.3. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE INVERTASA	38
9.4. OBTENCIÓN DEL SECRETOMA	41
9.5. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR PESO MOLECULAR EN GELES SDS-PAGE	43
9.6. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR GELES 2D-PAGE	44
9.7. SELECCIÓN DE “SPOTS” Y ANÁLISIS POR LC-MS/MS	46
9.8. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS	55
9.8.1. Proteínas que participan en el metabolismo de carbohidratos.....	62
9.8.2. Proteínas que participan en reacciones de oxidación-reducción	63
9.8.3. Proteínas con función de patogénesis.....	63
9.8.4. Proteínas con función proteolítica	63
9.8.5. Proteínas bajo expresadas.....	64
10. CONCLUSIONES	65
11. REFERENCIAS	66

Lista de Figuras

Figura 1. Hidrólisis enzimática de sacarosa.....	4
Figura 2. Estrategia experimental.....	19
Figura 3. Esquema de medición del sistema de respirometría.....	24
Figura 4. Crecimiento en pared de <i>A. brasiliensis</i> . A) Matraz sin Sigmacote®, B) Matraz con Sigmacote®.....	33
Figura 5. Tasa de producción de CO ₂ en función de la concentración inicial de sacarosa.....	34
Figura 6. Cinéticas de producción de CO ₂ en función de la concentración inicial de sacarosa.....	35
Figura 7. Perfiles de CO ₂ en función de la concentración inicial de sacarosa.....	36
Figura 8. Cinética de actividad invertasa. Concentración de sacarosa en el medio inicial 20 mg/mL.....	40
Figura 9. Consumo de azúcares reductores totales determinados como equivalentes de sacarosa. Concentración de sacarosa en el medio inicial 20 mg/mL.....	40
Figura 10. Cambios en el pH durante el tiempo de cultivo.....	41
Figura 11. Geles SDS-PAGE de los extractos proteicos extracelulares. A) 20 g/L sacarosa inicial. B) 40 g/L sacarosa inicial. C) 60 g/L sacarosa inicial. Carriles 1,2 y 3,4 son replicas analíticas de dos réplicas biológicas diferentes. En cada carril se cargaron 90 µg de proteína.....	44
Figura 12. Geles maestros de los extractos proteicos extracelulares obtenidos a partir de medios de cultivo con concentraciones iniciales de sacarosa. (a) 20 g/L, (b) 40 g/L y (C) 60 g/L. La separación por punto isoeléctrico se hizo con IPG con un rango de pH de 4 a 7 y la separación por peso molecular se hizo con geles SDS-PAGE con T=12%.....	45
Figura 13. Distribución de los spots identificados en cada condición.....	46

Figura 14. Distribución de los spots seleccionados para el análisis LC-MS/MS.....	47
Figura 15. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a su función biológica.....	59
Figura 16. Ruta general del metabolismo de sacarosa por <i>A. brasiliensis</i>	61

Lista de Tablas

Tabla 1. Microorganismos productores de invertasa y niveles de actividad reportados.....	5
Tabla 2. Purificación de invertasa producida por hongos del genero <i>Aspergillus</i>	8
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica y cinética de invertasas microbianas.....	10
Tabla 4. Parámetros cinéticos asociados a la producción de CO ₂	37
Tabla 5. Parámetros estimados de los modelos logístico, Pirt y Luedeking-Piret para el crecimiento de <i>A. brasiliensis</i>	39
Tabla 6. Parámetros cinéticos asociados a la producción de CO ₂ en las concentraciones seleccionadas para el análisis del secretoma.....	42
Tabla 7. Cuantificación de proteína extracelular concentrada.....	42
Tabla 8. Características de los spots seleccionados para análisis LC-MS/MS.....	48
Tabla 9. Características de las proteínas identificadas a partir del secretoma de <i>A. brasiliensis</i>	56

Abreviaturas

%T: Concentración total de monómeros de acrilamida y bis acrilamida en el gel de electroforesis

2D-PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida con dos dimensiones

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de suero bovino

CHAPS: 3-[(3-Colamidopropilo)dimetilamonio]-1-propanosulfonato, es un detergente zwitteriónico que participa en la solubilización de proteínas previo a una electroforesis bidimensional

CML: Cultivo en medio líquido

CMS: Cultivo en medio sólido

DNS: Ácido dinitrosalicílico

DTT: Ditioneitol

ESI: Ionización por electrospray

IEC: Cromatografía de intercambio iónico

IEF: Isoelectroenfoque

IPG: Tiras con gradiente inmovilizado de pH, empleadas en electroforesis bidimensional para hacer la separación de proteínas por punto isoeléctrico

Km: Constante de afinidad de la enzima por el sustrato

kDa: Kilo Dalton, unidad de medida del peso molecular de proteínas.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

MALDI: Desorción/ionización con láser asistida por matriz

MEC: Cromatografía de exclusión molecular

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDA: Medio de cultivo agar papa y dextrosa

pI: Punto isoeléctrico

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Spot: Punto de proteína identificado en 2D-PAGE

TCA: Ácido tricloroacético

TFA: Ácido trifluoroacético

TTC: cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

TTP: Sistema de partición en tres fases

Wicks: Tiras de papel filtro de 1x0.2 cm que se colocan entre cada electrodo y la tira con el propósito de favorecer la remoción de sales durante el Isoelectroenfoque.

Vmax: Velocidad máxima de catálisis

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por permitirme desarrollar en sus instalaciones mi proyecto de maestría.

A CONACYT por otorgarme una beca durante el periodo de maestría.

A Ernesto Favela Torres por haberme guiado y apoyado durante todo el proceso de formación como maestro.

A mis asesores por participar en el desarrollo de la tesis y por sus importantes aportes.

A Daniel Salgado por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencias relacionadas con mi tema de investigación.

A Ulises Carrasco por haberme asesorado durante la etapa de separación de proteínas por métodos electroforéticos.

A Gabriela Carrillo por haberme asesorado con el análisis de la información obtenida con el software PDQuest.

A los "PEDRITOS" (Christian M., Christian H., David, Kary, Rubén y Uriel) por haberme brindado su amistad y compartir momentos inolvidables.

Dedicatorias

A mi familia que confió en mí y me alentó durante el desarrollo de la maestría. Gracias por formarme como una persona de bien.

Resumen

El presente trabajo comparó el secretoma de *A. brasiliensis* ATCC 9642 obtenido en cultivo en medio líquido (CML) empleando el medio mínimo Hill y Kafer, con tres concentraciones de sacarosa inicial: 20, 40 y 60 g/L.

Las muestras para análisis de los secretomas se tomaron en el tiempo de cultivo en que se alcanzó la tasa máxima de producción de CO₂, lo que permitió su obtención en cultivos con estados fisiológicos comparables. Los extractos proteicos extracelulares obtenidos fueron concentrados y diafiltrados con membranas de 10 kDa y posteriormente, las proteínas fueron separadas por su punto isoeléctrico (Isoelectroenfoque) y después por sus pesos moleculares (SDS-PAGE). Las imágenes obtenidas de la separación en dos dimensiones (2D-PAGE) se analizaron con el software PDQuest, identificando los “spots” reproducibles entre replicas.

De los geles 2D-PAGE se seleccionaron 28 “spots” para análisis de proteínas. Las proteínas en los “spots” fueron digeridas con tripsina. Los péptidos obtenidos fueron analizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Para la caracterización de las secuencias identificadas se emplearon las siguientes bases de datos: BlastP, AspGD, UniProt, ExPASy, KEGG, Pfam, SignalP y SecretomeP y se consideró como microorganismo de referencia *A. niger* CBS 513.88.

Se identificaron 30 proteínas de las cuales 15 participan en el metabolismo de carbohidratos, 5 en reacciones de oxidación-reducción, 2 presentan actividad proteolítica, 2 tienen función de patogénesis y las seis proteínas restantes tienen diferente función. Se demostró que la secreción de proteínas disminuyó conforme aumenta la concentración de sacarosa en el medio, siendo la mitad de éstas, proteínas que participan en el metabolismo de carbohidratos entre las cuales la glucoamilasa se expresa a nivel constitutivo independientemente de la concentración de sacarosa mientras que la abundancia de invertasa disminuye cuando aumenta la concentración de sacarosa.

Abstract

The present study compared the *A. brasiliensis* ATCC 9642 secretome obtained by submerged fermentation using the minimal medium Hill y Kafer with three initial concentrations of sucrose: 20, 40 and 60 g/L.

The samples for the analysis of secretomes were taken at the culture time where the maximum rate of production of CO₂ was observed, with this it was possible to obtain cultures with comparable physiological states. The extracellular protein extracts obtained were concentrated and diafiltered with membrane (10 KDa) and after that, the proteins were separated by their isoelectric point (isoelectrofocuss) and their molecular weight (SDS-PAGE). The images obtained from the separation by 2D-PAGE were analyzed through the software PDQuest, identifying the reproducible spots between replicates.

28 spots were selected from the 2D-PAGE gels for their protein analysis. The proteins in the spots were digested with trypsin. The obtained peptides were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS).

For the characterization of the sequences identified were used the next data bases: BlastP, AspGD, UniProt, ExPASy, KEGG, Pfam, SignalP y SecretomeP. *A. niger* CBS513.88 was considered as reference microorganism.

30 proteins were identified of which 15 participate in the carbohydrates metabolism, 5 in oxide reduction reactions, 2 has proteolytic activity, 2 has pathogenic function and the others six proteins have different function. It was showed that secretion of proteins decreased when the sucrose concentration in the media was increased, of these proteins that participate in the carbohydrates metabolism, glucoamylase was expressed at constitutive level and this was independent of the sucrose concentration. By another hand, it was observed that the abundance of invertasa was decreased when the sucrose concentration was increased.

1. Introducción

La industria biotecnológica produce una amplia gama de productos; entre los cuales, destacan ácidos orgánicos, antibióticos y enzimas. La gran mayoría de estos productos son producidos en CML (Hansen y col., 2015). El CML es muy empleado desde hace algunas décadas y los investigadores lo definen como la fermentación que se lleva a cabo en presencia de un exceso de agua (Singhania y col., 2010); lo que permite un mejor control en el pH y temperatura, así como la posible adición de nutrientes e inductores y, conduce a procesos más productivos.

En la actualidad, es bien sabido que las enzimas de interés industrial son producidas por diferentes tipos de microorganismos, entre los que destacan los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, levaduras del género *Saccharomyces* y bacterias del género *Bacillus*. Es importante mencionar que muchas de las veces la producción de enzimas se ve afectada negativamente por diferentes factores, entre los que se encuentran, la represión catabólica, el estrés osmótico y la inhibición por sustrato y producto. Sin embargo, se han realizado numerosos estudios con el propósito de dar explicación a este tipo de fenómenos y sugieren que nuevas proteínas están involucradas en la adaptación fisiológica de los microorganismos a cualquiera de las condiciones antes mencionadas (Kim y col., 2007).

Dado lo anterior, es necesario utilizar métodos de análisis proteómico vistos como una herramienta que permite elucidar los mecanismos microbianos para adaptar su metabolismo a diferentes condiciones ambientales y a variaciones en la fuente de carbono o de nitrógeno (Kniemeyer, 2011). Por tal motivo, el presente trabajo pretende estudiar el secretoma del hongo *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 9642) cuando es sometido a diferentes concentraciones de sacarosa en CML; en particular, se buscó evaluar los mecanismos de síntesis de enzimas involucradas en la hidrólisis y asimilación de sacarosa. Además, se intentó identificar otras proteínas secretadas como mecanismo de adaptación y, eventualmente, la presencia de proteínas con funciones aun no identificadas.

Este trabajo se compone de un resumen de los resultados más relevantes, una introducción al documento, una revisión bibliográfica, justificación, hipótesis y objetivos generales y específicos. Posterior a esto, se presenta la sección de materiales y métodos, donde se describe toda la metodología desarrollada en el trabajo experimental que se dividió en seis

etapas. La primera, fue de conservación de la cepa *A. brasiliensis*, seguida de la caracterización del crecimiento y producción de invertasa en medios de cultivo con concentraciones crecientes de nutrientes y fuente de carbono. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron tres concentraciones de nutrientes y fuente de carbono y se realizaron los cultivos (CML) para la obtención del secretoma. Los extractos proteicos extracelulares obtenidos fueron separados por IEF y SDS-PAGE (2D-PAGE). Las imágenes obtenidas de los geles 2D-PAGE se analizaron vía software (PDQuest) y los “spots” seleccionados fueron analizados por LC-MS/MS. Las proteínas fueron identificadas y analizadas en bases de datos.

En la sección es la de Resultados y Discusión se presentan y comparan los resultados obtenidos con la bibliografía de forma gráfica y con tablas. El trabajo finaliza presentando las conclusiones más relevantes.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Cultivo en medio líquido (CML)

El cultivo en medio líquido (CML) es una forma de cultivar células microbianas de manera homogénea en un recipiente agitado que contiene los nutrientes necesarios que las células necesitan para crecer. Estos nutrientes están disueltos en agua y es por esto que algunos investigadores definen el CML como el cultivo que se lleva a cabo en presencia de un exceso de agua (Singhania y col., 2010).

Este tipo de cultivo es muy empleado para la producción de enzimas; de hecho, es preferido por las industrias productoras de enzimas porque, a diferencia del cultivo en medio sólido (CMS), se puede tener mejor control de los parámetros de proceso tales como temperatura, pH, aireación, etc. Además, la morfología óptima de los hongos filamentosos cuando crecen en CML es comúnmente conocida como “pellets” y está relacionada con la producción de enzimas, pero se ve influenciada por factores como agitación, pH, osmolaridad y temperatura entre otros (Papagianni, 2004; Krull y col., 2013).

El CML presenta algunas ventajas comparado con el CMS. Sin embargo, también presenta limitaciones y retos que, al ser resueltos, pueden permitir obtener rendimiento y productividad elevados (Hansen y col., 2015). A continuación, se presentan algunos retos, ventajas y

desventajas de CML (Viniegra-González y col., 2003; Papagianni, 2004; Krull y col., 2013; Workman y col., 2013).

Ventajas:

- Bases tecnológicas bien establecidas para el escalamiento a nivel industrial.
- Alto grado de control de los parámetros de operación (temperatura, pH, agitación, formación de espuma, oxígeno, etc.).

Desventajas:

- Susceptible a represión catabólica en concentraciones mayores a 10 g/L.
- Degradación del producto por proteasas.
- Altos gastos de energía para suministrar oxígeno a una tasa suficientemente grande para satisfacer los requerimientos.

Retos:

- Necesidad de utilizar sistemas de fermentación en lote alimentado que permitan suministrar los sustratos de modo que se evite la represión catabólica.
- La variabilidad de la morfología puede ser vista como un reto que permita definir parámetros que controlen y mantengan una forma óptima durante la producción de enzimas.

El uso de microorganismos para la producción de compuestos con valor agregado por CML se ha incrementado en los últimos cincuenta años. La producción de bebidas alcohólicas, biomasa, enzimas (α -amilasa, β -amilasa, catalasa, celulasa, glucoamilasa, invertasa, lipasa, etc.), antibióticos (cefalosporinas, penicilinas, ciclosporinas, etc.) y algunos ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, etc.) son ejemplos de productos industriales obtenidos por hongos. Sin embargo, fue hasta que surgieron las técnicas de CML usadas en la producción de penicilina que se expandió el uso de hongos en la industria (Papagianni, 2004).

2.2. Invertasa

Entre las enzimas que son producidas en la industria biotecnológica, destaca la invertasa también conocida como β -fructofuranosidasa, sacarosa glicosidasa, β -fructosidasa, β -fructofuranosido fructohidrolasa, sacarasa e invertina. Es una enzima que cataliza la hidrólisis de la molécula de sacarosa, al identificar la parte correspondiente a la fructosa (si la enzima proviene de levaduras), o si la enzima proviene de hongos identifica el extremo correspondiente a la glucosa. El resultado de la hidrólisis (Fig. 1), es una mezcla equimolecular de glucosa y fructosa que se conoce como azúcar invertido (Aranda y col., 2006; Ashokkumar y col., 2001; Naumoff, 2001; Nadeem y col., 2015).

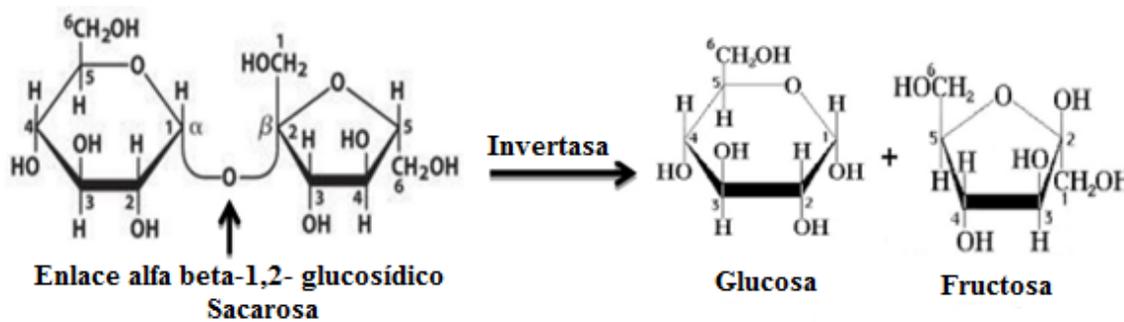


Figura 1. Hidrólisis enzimática de sacarosa.

Dependiendo del pH de máxima actividad, las invertasas pueden clasificarse en ácidas, básicas o neutras (Winter y Huber, 2000). Las invertasas básicas y neutras se han reportado en plantas (Xiang y col, 2011) y cianobacterias (Vargas y Salerno, 2010), mientras que las invertasas ácidas se han encontrado en plantas, hongos, levaduras y bacterias (Rustiguel y col., 2015).

Se ha demostrado que a elevadas concentraciones de sacarosa la invertasa presenta actividad transglicosidasa, es decir, cataliza la producción de fructo-oligosacáridos (FOS) de bajo contenido calórico como cestosa y nistosa (Veana y col., 2011; Ning y col., 2010).

La invertasa fue una de las primeras enzimas utilizadas para estudiar la biocatálisis enzimática (Belcarz y col., 2002). Sin embargo, el uso de la invertasa ha sido limitado debido a que la glucosa isomerasa puede ser utilizada para transformar glucosa en fructosa a un bajo costo (Aranda y col., 2006).

2.2.1. Microorganismos productores de invertasa

Las enzimas microbianas son más utilizadas que las obtenidas de plantas y animales por diversas cuestiones, entre las que destacan la gran variedad de actividades catalíticas, facilidad de manipulación genética, altos rendimientos debido al rápido crecimiento de los microorganismos además de mayor estabilidad (Nadeem y col., 2015).

Un gran número de microorganismos son productores de invertasa, lo que significa que pueden utilizar sacarosa como fuente de carbono y como inductor (Aranda y col., 2006).

Desde el año 2000 a la fecha, se han reportado diferentes cepas productoras de invertasa (Tabla 1), entre las cuales, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura principalmente utilizada para la producción de invertasa en CML a nivel comercial. Esto se debe a su alta capacidad de fermentación de sacarosa y que se dispone de cepas súper productoras de dicha enzima (Haq y Ali, 2005).

La producción de invertasa con bacterias fue reportada por vez primera con *Lactobacillus brevis* Mm-6 cultivada en CML con sacarosa (100 g/L) como fuente de carbono (Awad y col., 2013).

Por su parte, el hongo filamentoso *A. niger* es considerado como seguro, es decir GRAS y se ha demostrado que produce diferentes productos con alto valor agregado como ácidos orgánicos, antibióticos y por supuesto una amplia variedad de enzimas (invertasa, amilasas, etc.) cuando es cultivado en diferentes medios de cultivo (Nadeem y col., 2015; Pandey, 1992).

Tabla 1. Microorganismos productores de invertasa y niveles de actividad reportados (Nadeem y col., 2015).

Microorganismo	Fuente de carbono	*Tipo de cultivo	Actividad (U/mL)	Referencia
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Sacarosa (20, 40, 60 g/L)	CML	3.90, 2.96, 0.82	Presente trabajo
<i>A. niger</i>	Sacarosa (20 g/L)	CML	34.10	Nadeem y col., (2009)
<i>A. niger</i>	Glucosa (10 g/L)	CML	4.00	Rubio y Navarro, (2006)

<i>A. niger</i>	Sacarosa (100 g/L)	CMS	0.15	AshokKumar y col., (2001)
<i>A. nidulans</i>	Sacarosa (10 g/L)	CML	93.00	Alves y col., (2013)
<i>A. flavus</i>	Sacarosa (30 g/L)	CML	25.80	Uma y col., (2010)
<i>A. ochraceus</i>	Sacarosa (20 g/L)	CML	12.50	HSG y col., (2007)
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	Sacarosa (20 g/L)	CML	17.50	Uma y col., (2012)
<i>Fusarium solani</i>	Melaza (20 g/L)	CML	9.90	Bhatti y col., (2006)
<i>Mucor geophyllus</i> EFRL 03	Glucosa (10g/L)	CML	35.89	Qureshi y col., (2012)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> M15	Melaza (15 g/L)	CML	1.20	Aziz y col., (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KR18	Sacarosa (15 g/L)	CML	6.76	Shafiq y col., (2004)
<i>S. cerevisiae</i> WS-2	Almidón	CML	0.65	Sivakumar y col., (2013)
<i>S. cerevisiae</i> GSA-II	Sacarosa (20 g/L)	CML	107.40	Haq y Ali, (2005)
<i>S. cerevisiae</i> MK	Sacarosa (20 g/L)	CML	0.48	Shankar y col., (2013)
<i>S. cerevisiae</i> NRRLY-12632	Sacarosa (10 g/L)	CMS	272.50 U/g	Rashad y Nooman, (2009)
<i>Lactobacillus brevis</i> Mm-6	Sacarosa (100 g/L)	CML	1399.00	Awad y col., (2013)
<i>Streptomyces sp.</i>	Sacarosa (30 g/L)	CML	0.35	Kaur y Sharma, (2005)

* CML y CMS: cultivo en medio líquido y sólido respectivamente.

2.2.2. Métodos de producción

Actualmente, la aplicación del CML para la producción de invertasa se ha generalizado alrededor del mundo. De hecho, el CML es el método más común para la producción de

enzimas a nivel industrial y tiene un gran potencial, ya que presenta un adecuado control de parámetros, alta productividad por volumen de reactor y concentraciones de invertasa del orden de gramos por litro (Nadeem y col., 2015; Hansen y col., 2015; Harvey y McNeil, 1993).

Sin embargo, el CMS es prometedor por tener una mayor producción de enzimas comparado con el CML (Hansen y col., 2015).

2.2.3. Purificación, caracterización fisicoquímica y cinética de invertasas microbianas

La purificación es un paso importante que permite la separación de enzimas de interés de una mezcla compleja para su caracterización, con esto es posible incrementar la actividad, estabilidad, periodo de utilidad y, en términos generales, permite comprender la estructura y función de las enzimas para su aplicación en formulaciones con propósitos industriales y medicinales (Nadeem y col., 2015; Veana y col., 2011).

Según Neumann y Lampenn (1967), Berthelot fue quien realizó el primer trabajo de purificación de invertasa en 1860 (Gracida-Rodríguez y col., 2005). Desde entonces, se han aplicado diversas estrategias para la purificación de cada enzima en particular acoplando diferentes metodologías de lisis celular (en el caso de enzimas intracelulares), concentración de las enzimas, que puede ser por filtración a través de membrana o por precipitación con sales o solventes (sulfato de amonio o etanol), seguido de técnicas cromatográficas que permiten llevar a cabo una purificación parcial o total de la enzima (Nadeem y col., 2015; Veana y col., 2011; Prado-Barragán y col., 1999).

Uma y col. (2010) purificaron invertasa de *A. flavus* precipitando con sulfato de amonio y posteriormente, separando a través de una columna de cromatografía DEAE. Después de una separación por SDS-PAGE determinaron que el peso molecular de la enzima fue alrededor de 67 kDa, además, obtuvieron un factor de purificación de 5.8. La invertasa presentó V_{max} de 15.8 U/mg, K_m de 0.23 mg/mL, estabilidad de media hora a 50°C e inhibida por zinc.

También, una invertasa secretada por *A. niger* fue purificada con un factor de purificación de 23 mediante ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico (IEC) y cromatografía de exclusión molecular (MEC). La invertasa purificada presentó pH y temperatura óptimos de 5.5 y 50°C respectivamente. Por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE se determinó un peso

molecular de 125 kDa y, mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, se estimó que el peso molecular de la proteína nativa estaba comprendido entre 225 y 250 kDa (Boddy y col., 1993).

Se ha demostrado que la combinación de diferentes técnicas de cromatografía resulta favorable para purificar invertasa de *A. niger* (Tabla 2). Destaca el trabajo reportado por Nguyen y col., (2005) en el que se concentró la proteína por precipitación con sulfato de amonio, seguido de separación por IEC y MEC recuperando 42 % de la enzima, con un factor de purificación de 50. Por SDS-PAGE se estimó que la invertasa tenía un peso molecular comprendido entre 120 y 130 kDa. Adicionalmente, se determinó que el pH y temperatura óptimos fue de 5.5 y 50°C respectivamente alcanzando una actividad específica de 51.67 U/mg de proteína.

Tabla 2. Purificación de invertasa producida por hongos del género *Aspergillus* (Veana y col., 2011).

Microorganismo	Pasos de purificación	Factor de purificación	Recuperación de invertasa (%)	Referencia
<i>A. niger</i> B60	Ultrafiltración, IEC, MEC	23	10	Boddy y col., (1993)
<i>A. niger</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ 45-80%, IEC, MEC	8.6	0.8	Rubio y Maldonado, (1995)
<i>A. niger</i> IMI303386	(NH ₄) ₂ SO ₄ 80 %, IEC, MEC	50	42	Nguyen y col., (2005)
<i>A. oryzae</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-50%, TTP usando (NH ₄) ₂ SO ₄ y t-butanol	12	54	Dhananjay y Mulimani, (2008)
<i>A. flavus</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ 70%, diálisis, IEC	5.8	3.2	Uma y col., (2010)

La afinidad de las enzimas por el sustrato está determinada por la constante de Michaelis (Km) y se define como la concentración de sustrato en la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima de catálisis por la enzima (Vmax), siendo ésta última la máxima velocidad de catálisis que alcanza la enzima en condiciones de saturación de sustrato. La invertasa de *A. niger* muestra estabilidad a valores de pH comprendidos entre 2.9 y 5.6; sin embargo, alcanza la

máxima actividad a pH 4.1 a 65°C presentando Km y Vmax de 117 mM y 12,500 $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectivamente (Nadeem y col., 2009).

Rubio y Maldonado (1995) purificaron y caracterizaron una invertasa de *A. niger*. Sus resultados mostraron que la enzima mantenía elevada actividad en un rango de pH comprendido entre 4 y 6, alcanzando la máxima actividad a pH 5 con una temperatura optima de 60°C. Los parámetros Km y Vmax estimadas fueron 0.063 mM 13,000 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente.

Bacterias como *Bacillus* (Yoon y col., 2007) y levaduras como *Candida* (Plascencia-Espinosa y col., 2014; Chávez y col., 1997) y *Saccharomyces* (Rashad y Nooman, 2009) han sido reportadas como productoras de invertasa con constantes de Michaelis (Km) comprendidas entre 0.1 y 60 mM (Tabla 3). Por lo tanto, de la Tabla 3 se puede afirmar que las invertasas de hongos y levaduras tienen mayor afinidad por la sacarosa comparadas con las invertasas de bacterias (Nadeem y col., 2015).

El peso molecular de las enzimas usualmente es determinado mediante cromatografía de exclusión molecular y electroforesis (SDS-PAGE). Se han reportado diferentes pesos moleculares para las invertasas microbianas que dependen, entre otras cosas, de la fuente y naturaleza de la enzima, es decir, del microorganismo productor y si se trata de enzimas extracelulares (usualmente glicosiladas) o intracelulares (Gracida-Rodríguez y col., 2005). El peso molecular de invertasas de hongos, levaduras y bacterias se reporta en el orden de 71-116, 63-150 y 23 kDa, respectivamente. Las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de invertasas microbianas son resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica y cinética de invertasas microbianas (Nadeem y col., 2015).

Microorganismo	*PM (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima	Vmax (μmol/min)	Km (mM)	Referencia
<i>A. niger</i>	116	4.1	65	1,705	117.0	Nadeem y col., (2009)
<i>A. niger</i>	47	5.0	60	1.3x10 ⁻²	0.1	Rubio y Maldonado, (1995)
<i>A. niger</i> AS0023	71-111	4.4	55	4.0	35.7	Hocine y col., (2000)
<i>Penicillium janczewskii</i>	80	4-5.5	60	0.1	0.4	Pessoni y col., (2007)
<i>Bacillus cereus</i>	23	7.0	50	0.6	370.0	Yoon y col., (2007)
<i>Candida guilliermondii</i>	63-70	5.0	65	10.9	0.1	Plascencia-Espinosa y col., (2014)
<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-12632	+95.5	6.0	50	35.5	60.0	Rashad y Nooman, (2009)

*PM: Peso molecular determinado por SDS-PAGE; +PM determinado por cromatografía de exclusión molecular.

2.2.4. Aplicaciones

La invertasa es ampliamente utilizada en la industria alimentaria para la elaboración de jarabes invertidos, que comúnmente son empleados como edulcorantes para mermeladas, dulces y todo tipo de productos de confitería. Además, tiene aplicación en la industria farmacéutica y en fermentaciones para la producción de bebidas alcohólicas, glicerol y ácido láctico a partir de sacarosa como fuente de carbono (Ashokkumar y col., 2001; Klein y col., 1989).

También, tiene aplicación en la industria cosmética en la elaboración de cremas y como agente plastificante. Aunado a esto, se atribuye a esta enzima la dulzura de algunas frutas en etapa de maduración (Andjelković y col., 2015).

2.3. Respirometría

La respirometría es una forma de medir el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono por parte de un cultivo microbiano que se encuentra bajo condiciones definidas de cultivo. Para esto, son empleados equipos comúnmente conocidos como respirómetros o metabolímetros; estos equipos permiten hacer mediciones en línea de dos indicadores del metabolismo microbiano: el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono (Soto, 1993).

Recientemente, el uso de metabolímetros para monitorear estos gases, es preferido sobre otros métodos porque presentan múltiples ventajas, entre las que destacan el ahorro de tiempo y trabajo al ser un método de medición en línea, evita la preparación de muestras para hacer mediciones y no se genera daño en la biomasa. Además, los datos obtenidos pueden ser relacionados con diversos aspectos del metabolismo como la formación de biomasa (Soto, 1993; Nava, 2016).

2.4. Proteómica

Las proteínas son de gran importancia, ya que participan en todos los procesos celulares; de este modo, comprender la forma en la que trabaja un sistema vivo implica tener un amplio conocimiento de todo el conjunto proteico del organismo. El conjunto de proteínas codificadas por el genoma de un organismo en un momento dado y a lo largo de la vida del mismo, recibe el nombre de “proteoma”, término que fue empleado por vez primera en 1994 por Mark Wilkins y que deriva de las palabras proteína y genoma (Mishra, 2010).

Para ocuparse del estudio global de los perfiles de expresión y de modificaciones postraduccionales de las proteínas, de su abundancia relativa, de la expresión diferencial de enzimas, así como de las interacciones entre proteínas surge la “proteómica”, que es una disciplina que identifica, describe, y caracteriza el proteoma de un organismo (Mishra, 2010; Peretó, 2007).

2.4.1. Características e importancia del secretoma

Los hongos filamentosos tienen una gran capacidad para crecer en medios con diferentes fuentes de carbono; además, tienen la habilidad para percibir el ambiente en el que se encuentran y producir y secretar enzimas a la región extracelular siendo esto último atractivo para el estudio y entendimiento de la expresión proteica (Aro, Pakula y Penttila, 2005).

De este modo, el término secretoma, se emplea para describir una parte del proteoma celular e incluye todas las proteínas secretadas (ancladas a la pared celular o en el medio) y las proteínas involucradas en la vía secretora (Tjalsma y col., 2000).

Sin embargo, la composición y tamaño del secretoma depende del entorno en que se encuentre el microorganismo, ya que esto confiere cambios en el perfil proteico. Además, su caracterización depende de las condiciones de crecimiento y de las herramientas empleadas para su análisis (Callegari y Navarrete, 2012).

Algunos factores que influyen en los patrones de expresión proteica del secretoma son el pH del medio, la fuente de carbono y el sistema de cultivo, habiendo en CMS mayor secreción y mayor variedad de proteínas con respecto al CML (Paper y col., 2007; Oda y col., 2006).

Aunque los estudios sobre el secretoma de hongos filamentosos se están incrementando en los últimos años, éstos únicamente se han centrado en la descripción y aún carecen de discusión sobre el significado biológico de los perfiles proteicos encontrados. Esto puede ser debido a que la “secretómica” es un área relativamente nueva en la investigación y que aún implica limitaciones. Además, no se tiene conocimiento de las funciones de nuevas proteínas identificadas. No obstante, a pesar de todas las limitaciones para entender diferentes procesos biológicos a nivel celular, es importante continuar desarrollando estudios del secretoma y del proteoma (Callegari y Navarrete, 2012).

2.4.2. Técnicas para el análisis proteómico

En proteómica es fundamental separar primero las proteínas para su posterior identificación. El método más adecuado de separación es la electroforesis bidimensional, mientras que el procedimiento más habitual para la identificación, es la digestión de las proteínas con proteasas para el análisis de los péptidos resultantes por espectrometría de masas (Peretó, 2007).

Aunque los geles de dos dimensiones acoplados a espectrometría de masas son la alternativa más utilizada para la separación e identificación de las proteínas de un secretoma, existen otras alternativas como el análisis de proteínas libres de gel usando espectrometría de masas (Callegari y Navarrete, 2012).

2.4.2.1. Geles de dos dimensiones 2-DE

La electroforesis bidimensional, también conocida como método Iso-Dalton es una de las herramientas más utilizadas en proteómica, ya que permite la separación de proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) y a su peso molecular. Además, es relativamente fácil de usar, presenta alta reproducibilidad, alta resolución de proteínas, es decir, dependiendo del tamaño de corte del gel y del gradiente de pH, puede separar hasta 5,000 proteínas y cuantificar "spots" <1 ng de proteína y adicionalmente, permite la aplicación de análisis por espectrometría de masas (Lilley, Razzaq y Dupree, 2002).

La metodología de electroforesis bidimensional utilizando tiras IPG fue descrita por Gorg (1998), y consta de las siguientes etapas:

1. Preparación de la muestra, solubilización y aplicación sobre el gel.
2. Primera dimensión de separación: separación de las proteínas por isoelectroenfoque (IEF) con tiras de gradiente de pH (IPG). Es muy sensible a alteraciones en la carga de la muestra debido a contaminación por sales.
3. Segunda dimensión de separación: separación de las proteínas presentes en IPG por SDS-PAGE (de acuerdo a su peso molecular).
4. Visualización de las proteínas separadas mediante tinción con azul de Coomassie, tinción por plata o por fluorescencia.

5. Análisis de los patrones de separación de las proteínas sobre el gel.

No obstante, la electroforesis bidimensional cuenta con algunas limitaciones, por ejemplo, las proteínas hidrofóbicas difícilmente entran en el gel y generalmente no son resueltas durante el desarrollo de la técnica, su aplicación en proteínas integrales de membrana también es limitada. Además, proteínas de muy alto o muy bajo peso molecular no pueden ser resueltas, lo mismo sucede con proteínas muy ácidas (Walker, 2009).

2.4.2.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es ampliamente utilizada en proteómica para conocer la secuencia de aminoácidos de una proteína (estructura primaria) y para conocer la formación de complejos proteína-ligando, incluyendo modificaciones postraduccionales, uniones enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo. Los espectrómetros de masas ionizan las moléculas y las separan de acuerdo a su proporción masa/carga (m/z) y a la información de rendimientos respecto al peso molecular de cada ion, esta información obtenida es utilizada para conocer la estructura de las moléculas (Mishra, 2010).

Existen muchos métodos de ionización basados en la protonación (adición de un ion H^+) o desprotonación (eliminación de un ion H^+) entre los cuales los más utilizados en proteómica son ESI (Electrospray Ionization) y MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) (Walker, 2009).

A continuación, se explican estas estrategias de ionización:

ESI. Esta técnica fue desarrollada por John Fenn en el año 1989. Se considera como un proceso suave porque no desintegra las moléculas de la muestra. El método consiste en hacer pasar la muestra en solución a través de una delgada aguja (con diámetro en el orden de μm) hasta llegar al orificio del espectrómetro de masas. Con ayuda de un gradiente de potencial electrostático entre la aguja y el orificio del espectrómetro de masas, el delgado filamento de líquido se rompe en diminutas gotas que contienen iones de la muestra; ahora con la combinación de la evaporación del solvente y la repulsión electrostática se van generando gotas con cada vez menor número de iones de muestra hasta que se generan iones individuales (Fenn y col., 1989; Whitehouse y col., 1985). A diferencia del MALDI, con este

método se generan iones multivalentes y esto confiere múltiples lecturas de la masa de la muestra y de este modo, se obtienen determinaciones de masas más exactas. Además, ESI es fácilmente acoplado a separaciones cromatográficas o electroforéticas, motivo por el cual a la fecha este es el método estándar en estudios de proteómica (Walker, 2009).

MALDI. Este proceso fue desarrollado en 1988 por Koichi Tanaka. En este método, la muestra de proteínas es adsorbida en una matriz; después, volúmenes en el orden de microlitros son depositados sobre una placa metálica y se secan por evaporación lenta formando cristales. La placa se coloca en una cámara al vacío del espectrómetro y es irradiada con pulsos de luz UV. El resultado de este proceso es una rápida desorción y ionización de la muestra. Los iones de la muestra (con carga positiva) son extraídos utilizando un campo electrostático y posteriormente empleados en el análisis de masas (Karas y Hillenkamp 1988; Krüger y col., 2000). El hecho de que las proteínas se ionicen como simples especies cargadas trae consigo que los espectros de masas MALDI sean sencillos de interpretar, pero la desventaja es que se necesitan analizadores de masas más precisos con respecto a la proporción m/z . Adicionalmente, las secuencias de moléculas cargadas individualmente son en muchos casos más difíciles de analizar (Patel, 2015).

3. Antecedentes directos

En la Planta Piloto de Fermentaciones en Medio Sólido (PP4) de la UAM-I se ha estudiado el secretoma de *A. niger* en CMS con almidón como fuente de carbono (Carrillo y col., 2016) y de *A. brasiliensis* en CMS con glucosa y sacarosa como fuentes de carbono. En dichos estudios, se ha mostrado alta actividad catabólica y pocas proteínas con actividad proteolítica. En particular, para el caso de sacarosa, se evaluaron concentraciones iniciales de 25 a 300 g/L, encontrando alta presencia de transaldolasa y varias isoformas de inulinasas; sin embargo, solo se identificó una invertasa. Adicionalmente, se identificó un mayor número de proteínas al aumentar la concentración de fuente de carbono. Además, se demostró mediante un análisis 2D-PAGE que las proteínas secretadas bajo las diferentes condiciones de ensayo son principalmente ácidas (pI 4-7) y de bajo peso molecular.

Así mismo, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), se identificaron 29 proteínas. De las 29 proteínas identificadas, mediante programas bioinformáticos, se predijo que 17 proteínas eran extracelulares y de éstas, 10 presentaron péptido señal, se predijo que 4 tenían mecanismos de secreción no convencionales y que presentan dominios transmembranales y 1 no fue caracterizada. De todo esto lo que llama la atención es que, *A. brasiliensis* cultivado con sacarosa en CMS produce isoformas de la enzima inulinasa y no reporta presencia de la enzima invertasa (Nava, 2016).

4. Justificación

Los resultados obtenidos de diversos trabajos sobre producción de invertasa han sido enfocados a estudios cinéticos, de producción, purificación, actividad, regulación de la síntesis, mecanismos de secreción heteróloga, además de estabilidad al pH y temperatura (Veana y col., 2011). En todos estos trabajos el hongo filamentoso *A. niger* ha sido la principal cepa empleada ya que ha demostrado ser un buen productor mediante fermentación en CML. Sin embargo, al trabajar con esta cepa, no se han tomado en cuenta factores importantes como el efecto de la concentración de sustrato sobre algunos de los parámetros ya mencionados, además del efecto que este ejerce sobre la composición del secretoma, siendo Olivo y col. (2009) quienes estudiaron los patrones de inducción y represión de la invertasa de *A. niger* Van Tieghem. Por este motivo es importante mencionar que en la actualidad no se cuenta con información suficiente que permita explicar los mecanismos del género *Aspergillus* para la producción de invertasa en medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa.

Con base en lo anterior y, partiendo del antecedente directo que es un estudio del secretoma de *A. brasiliensis* ATCC 9642 en el que los resultados demuestran que se reprime la síntesis de invertasa, pero se induce la síntesis de inulinasa cuando se cultiva este hongo en CMS con sacarosa como fuente de carbono (25, 150, 300 g/L) surgen preguntas: ¿se obtendrán los mismos resultados cuando *A. brasiliensis* es cultivado en medio líquido con concentraciones crecientes de sacarosa como fuente de carbono? ¿la invertasa es la única enzima que se reprime al variar la concentración de sacarosa en el medio? ¿qué otras enzimas y proteínas son reprimidas o inducidas al variar la concentración de sacarosa en el medio? ¿qué relación tienen estos cambios en la expresión proteica de este hongo con la adaptación de su metabolismo a diferentes condiciones del medio? Para dar respuesta a las preguntas planteadas, en el presente trabajo se cultivó la cepa *A. brasiliensis* ATCC 9642 en medio líquido, con concentraciones crecientes de sacarosa como fuente de carbono y energía. Al conocer el secretoma de este hongo en cada condición estudiada, se pretende sentar las bases que permitan explicar por qué se modifica la composición del secretoma al aumentar la concentración de sacarosa en el medio, cómo se relaciona el secretoma con la adaptación del metabolismo y el crecimiento en cada condición determinada, cómo se ve afectada la síntesis de invertasa al aumentar la concentración de sacarosa y cómo se ven influenciadas algunas características de la invertasa como su actividad y estabilidad.

5. Hipótesis

El aumento en la concentración de sacarosa en el medio provoca un cambio en la composición del secretoma de *A. brasiliensis* ATCC 9642 y en la síntesis de enzimas involucradas en la hidrólisis de sacarosa.

6. Objetivos

6.1. General

Determinar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de invertasa y la composición del secretoma de *A. brasiliensis* ATCC 9642.

6.2. Específicos

- Determinar el efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento microbiano y la producción de invertasa.
- Identificar y comparar las proteínas secretadas por *A. brasiliensis* con cada concentración de sacarosa estudiada.
- Comparar el secretoma obtenido con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.

7. Estrategia experimental

En este capítulo se presenta de manera breve y esquemática la estrategia general que se siguió en el trabajo experimental (Figura 2).

La estrategia experimental se desarrolló en 6 etapas. Primero se evaluó el crecimiento de *A. brasiliensis* en CML con concentraciones crecientes de sacarosa (10 a 80 g/L). Se seleccionaron tres concentraciones y se realizó una cinética de actividad invertasa con la concentración más baja que se eligió (20 g/L). En los cultivos para la obtención del secretoma, se utilizaron tres concentraciones de sacarosa (20, 40 y 60 g/L). Las muestras fueron tratadas para concentrar las proteínas y separarlas por electroforesis 2D-PAGE. El análisis de las imágenes de la separación por 2D-PAGE se realizó con uso de software (PDQuest) y se identificaron los “spots” expresados diferencialmente en función de la concentración de sacarosa. Estos se recuperaron y digirieron con tripsina para su análisis por LC-MS/MS.

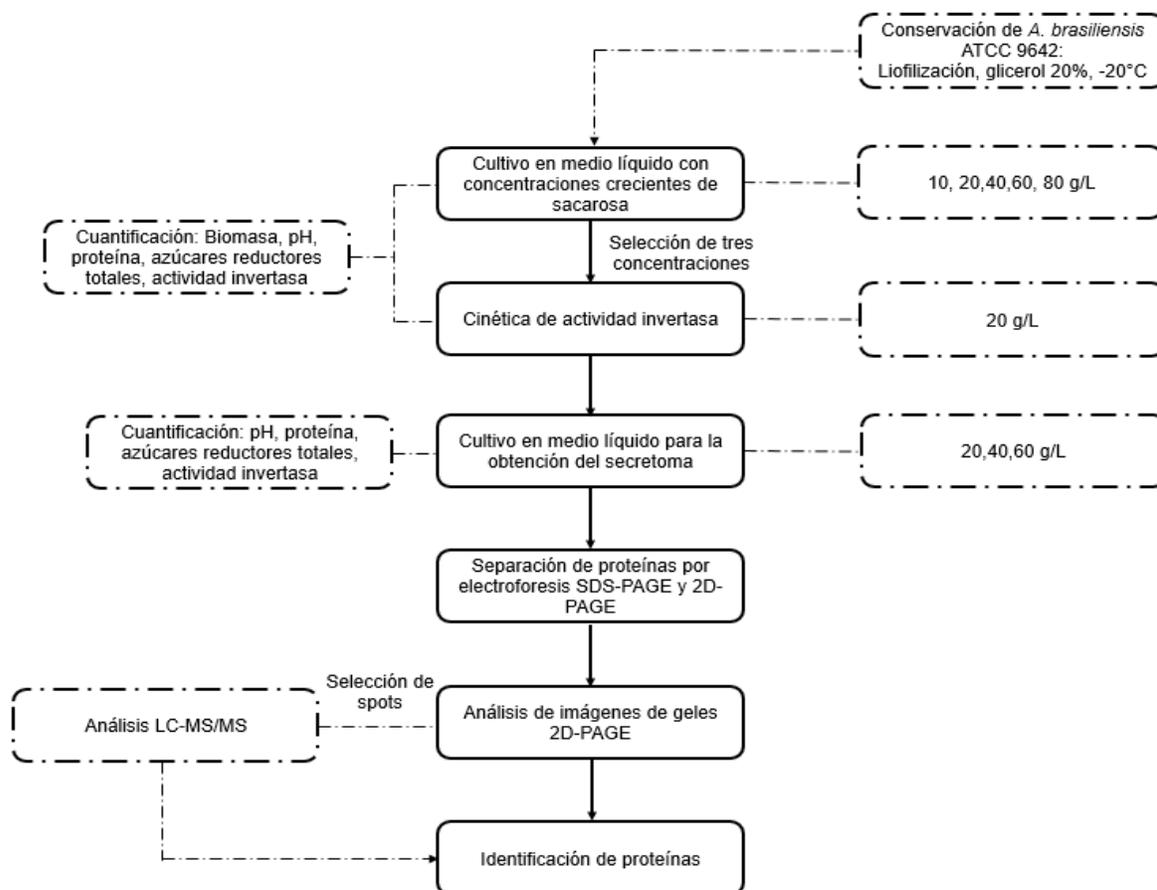


Figura 2. Estrategia experimental general.

8. Materiales y métodos

8.1. Microorganismo

La cepa empleada fue *A. brasiliensis* ATCC 9642. Esta cepa pertenece al cepario de la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido de la UAM Iztapalapa. Aquí se encuentra conservada bajo dos métodos: glicerol al 20% (v/v) y por liofilización.

8.1.1. Propagación y conservación de la cepa

Para la conservación de la cepa se utilizó un vial con la cepa previamente liofilizada. Primero, bajo condiciones asépticas, se suspendió el liofilizado en 5 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v). Con esta suspensión se inocularon por estría cuatro tubos inclinados con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), posteriormente se incubaron a 30°C durante 7 días.

Las esporas presentes en dos tubos inclinados se suspendieron en 5 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v), se adicionó la solución Tween 80 con 20 perlas de vidrio en el primer tubo; éste se agitó y después el contenido se pasó al segundo tubo; finalmente la suspensión se devolvió al tubo que originalmente contenía la solución de Tween 80. Con esta suspensión, se inocularon cuatro matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA. Estos matraces se incubaron a 30°C durante 7 días.

Pasado el periodo de incubación, se tomaron los 4 matraces inoculados con *A. brasiliensis*. Dos matraces fueron utilizados para hacer la suspensión de esporas con 20 mL de Tween 80 al 0.05% previamente esterilizado. Esta suspensión se empleó en la conservación en glicerol. Las esporas de los dos matraces restantes se suspendieron con 30 mL de leche descremada al 20% (p/v). La suspensión resultante fue empleada en la conservación por liofilización.

Para la conservación en glicerol al 20%, se preparó una solución de glicerol al 40% (v/v) y se adicionaron 0.75 mL a 6 tubos Eppendorf de 2 mL. Los tubos se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² durante 15 minutos (Arencibia Gámez y Rosario, 2008).

A continuación, a 6 tubos crioprotectores se les extrajo 0.5 mL de su volumen en condiciones de máxima asepsia y se les adicionaron 0.5 mL de la suspensión de esporas en Tween 80 al 0.05%, los tubos crioprotectores se agitaron manualmente y con suavidad para no dañar las esporas y, finalmente, se les extrajo el exceso de líquido. Adicionalmente, a los 6 tubos de 1.5

mL que contenían glicerol al 40% se les adicionó 0.75 mL de la misma suspensión de esporas. La cepa conservada en glicerol se almacenó a -20°C (Manual de conservación de cepas de la planta piloto de fermentación en medio sólido, s/a).

Para la conservación por liofilización, se prepararon 50 mL de una solución de leche descremada “svelty®” al 20% (p/v). En un frasco de vidrio se adicionaron 30 mL que se emplearon para suspender las esporas de *A. brasiliensis*, a otro frasco se agregó el resto de solución. Posteriormente se esterilizaron a 10 lb/in² durante 10 minutos (Arencibia Gámez y Rosario, 2008).

Ampolletas de vidrio se mantuvieron sumergidas durante 3 horas en una solución de HCl al 2%. Inmediatamente, las ampolletas fueron lavadas con agua destilada para garantizar la completa remoción del ácido, se secaron a 60°C durante 2 horas y posteriormente, se les colocó un tapón de algodón y se esterilizaron a 15 lb/in² por 3 horas. Después de la esterilización y en condiciones asépticas se pipetearon 2 mL de suspensión de esporas en leche descremada al 20% en 12 ampolletas. Adicionalmente, se prepararon dos ampolletas con solo leche descremada para utilizarla como control positivo. Las ampolletas fueron tapadas con un trozo de algodón estéril que se colocó en la parte delgada del cuello de las mismas, además, se les colocó un tapón de algodón en la punta. Posteriormente, las ampolletas fueron congeladas con nitrógeno líquido, se les quitó el tapón de algodón y se colocaron en la jarra para la posterior liofilización. Las ampolletas ya liofilizadas fueron selladas a la flama de un soplete. Las ampolletas selladas se almacenaron en oscuridad y en un lugar seco (Manual de conservación de cepas de la planta piloto de fermentación en medio sólido, s/a).

8.1.2. Propagación del inóculo

La propagación del inóculo se realizó de la siguiente manera: se inocularon por estría dos tubos inclinados con medio PDA, se incubaron a 30°C durante 7 días. Bajo condiciones asépticas, se vertieron en uno de los tubos 5 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v) junto con 20 perlas de vidrio, el tubo se agitó manualmente y la suspensión de esporas se pasó al siguiente tubo, se procedió de la misma forma que con el primer tubo y al final la suspensión fue vertida al tubo que originalmente contenía la solución Tween 80 al 0.05% (v/v). De esta suspensión se tomaron alícuotas de 1 mL para inocular tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL

de medio PDA. Los matraces se incubaron a 30°C durante 7 días. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se suspendieron las esporas de dos matraces en 20 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v). La suspensión de esporas obtenida fue empleada como inóculo para los CML.

8.2. Medio de cultivo

El medio empleado para todos los cultivos fue el reportado por Hill y Kafer (2001), empleando sacarosa como fuente de carbono y manteniendo una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 8.58. El medio fue diseñado para aforar a un litro las siguientes cantidades de los componentes: sacarosa, 20 g; mezcla de sales, 50 mL; solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mL; oligoelementos de Hutner, 1 mL. Al modificar la cantidad de sacarosa, el resto de los nutrientes se modificó también en la misma proporción con respecto al medio basal. El pH inicial del medio no se ajustó y éste osciló entre 6.3 y 6.7 dependiendo de la cantidad de sacarosa presente en el medio.

El medio de cultivo consta de tres soluciones, cuyos componentes se expresan en g/L:

- 1) Mezcla de sales (20x). Nitrato de sodio (NaNO_3), 120; cloruro de potasio (KCl), 10.4; fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 16.3; fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), 20.9.
- 2) Solución de sulfato de magnesio (200x): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 104.
- 3) Solución de oligoelementos de Hutner: sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 5; EDTA: 50; sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 22; ácido bórico (H_3BO_3), 11; cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 5; cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1.6; sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 1.6; molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 1.1.

8.3. Cultivo en medio líquido (CML)

El cultivo se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio. Los matraces con el medio de cultivo fueron esterilizados a 93°C durante 15 minutos (para evitar la caramelización de la sacarosa) e inoculados con 1×10^6 esporas/mL de medio. Al terminar de inocular los matraces, se les cambió el tapón de algodón por uno diseñado para permitir la distribución de aire e inmediatamente fueron incubados a 30°C, 200 rpm, y conectados al sistema de respirometría con un flujo de aire de 20 mL/min (Salgado, 2015; Nava, 2016).

8.4. Condiciones de cultivo sin crecimiento en pared

Para establecer las condiciones de cultivo de *A. brasiliensis* sin crecimiento en pared, se procedió de la siguiente manera: se adicionaron 50 mL de medio (40 g/L de sacarosa) en 6 matraces de 250 mL, incluyendo dos pretratados con Sigmacote® (Sigma-Aldrich®, solución de organopolisiloxano clorado en heptano que se utiliza como agente siliconizante de vidrios ya que forma una micro capa hidrófoba que impide la adhesión de proteínas en la superficie) (Van Schie y Fletcher 1999). Cada matraz se inoculo con 1×10^6 esporas/mL de medio.

Se evaluaron tres condiciones de cultivo por duplicado, la primera fue una condición denominada “normal” (incubación: 30°C y 150 rpm), la segunda condición fue haciendo un pretratamiento a los matraces con Sigmacote® para formar una capa delgada que impida el crecimiento en pared (incubación: 30°C y 150 rpm), la tercera condición denominada “estática” consistió en dejar los matraces inoculados en incubación a 30°C, sin agitación durante un periodo de 8 horas hasta que germinaran las esporas y, posteriormente, se agitaron a 150 rpm.

Dos matraces limpios y secos (60°C, 12 h), se enfriaron en desecador por 30 minutos. A cada matraz se le adicionó 1 mL de Sigmacote®. Esto se realizó con una pipeta dejando que resbalara por las paredes del matraz. El exceso de Sigmacote® se puso en contacto con las paredes de cada matraz, ladeándolo y girándolo con suavidad. Finalmente, se decantó el exceso en cada matraz; entonces, los matraces se secaron a 100°C durante media hora para garantizar la durabilidad de la capa formada. Antes de usar los matraces para el cultivo de *A. brasiliensis*, se enjuagaron con agua destilada para eliminar cualquier rastro de HCl formado.

8.5. Estudio respirométrico

Con la finalidad de elegir tres concentraciones de sacarosa inicial para la obtención del secretoma de *A. brasiliensis* se evaluó un rango amplio de concentraciones de sacarosa: 10, 20, 40, 60 y 80 g/L. Los cultivos se realizaron por duplicado y se incubaron y conectaron al sistema de respirometría (Fig. 3) durante un periodo de 80 horas para analizar la cinética completa de producción de CO₂. Al finalizar el cultivo, el contenido de los matraces se filtró con papel filtro Whatman 41, la biomasa fue cuantificada por gravimetría (60°C, 24 h) y el

sobrenadante recuperado fue puesto en congelación hasta el análisis enzimático, de azúcares reductores totales y medición de pH final.

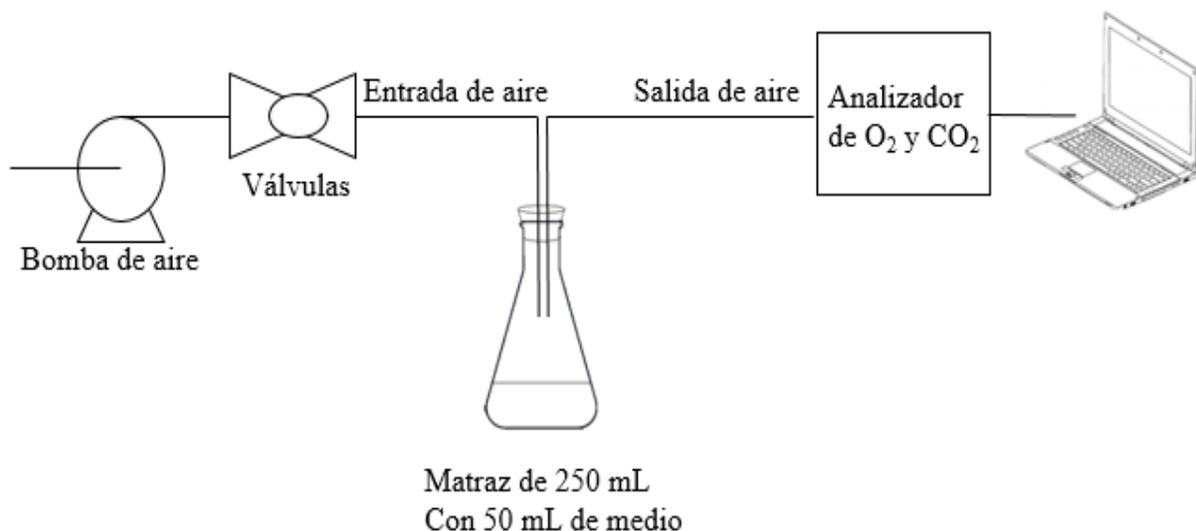


Figura 3. Esquema de medición del sistema de respirometría.

8.6. Cinética de producción de invertasa

El cultivo para la cinética de producción de invertasa se realizó empleando sacarosa en una concentración de 20 g/L; ya que esta, es la concentración más baja que se empleó en los cultivos para la obtención del secretoma. Se emplearon 10 matraces y se tomaron muestras por duplicado cada 24 h. Inmediatamente después de la toma de muestras, los matraces se almacenaron a 4°C por 15 min. Posteriormente, el contenido de los matraces se filtró con papel filtro Whatman 41. La biomasa fue cuantificada por gravimetría y el sobrenadante recuperado fue puesto en congelación hasta el análisis enzimático, de azúcares reductores totales, medición de pH final y cuantificación de proteína.

8.7. Obtención del secretoma

Para los estudios de secretoma se emplearon tres concentraciones de sacarosa (20, 40, 60 g/L) por triplicado. Los matraces se mantuvieron en incubación, conectados al sistema de respirometría hasta que alcanzaron la tasa máxima de producción de CO₂.

Una vez obtenida la tasa máxima de producción de CO₂, los matraces se desconectaron del sistema de respirometría e inmediatamente se les adicionaron 20 µL de un inhibidor de

proteasas (Sigma-Aldrich®) y se dejaron en refrigeración durante 30 minutos. Pasado este tiempo, el contenido de los matraces se filtró en baño de hielo con papel filtro Whatman 41. La biomasa fue lavada con 30 mL de buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.2, se depositó en tubos Falcón® congeló (-70°C) antes de su liofilización.

De cada matraz se recuperaron entre 35 y 40 mL de extracto proteico, de los cuales 32.5 mL fueron ultrafiltrados en tubos Amicon MWCO 10 kDa de 15 mL; el resto de extracto se utilizó para cuantificar actividad enzimática, azúcares reductores totales, pH y proteína. La ultrafiltración se realizó en tres lotes a 3500 rpm, 4°C por 25 minutos. De cada lote se recuperaron alrededor de 0.5 mL de extracto concentrado que al final se unieron en el mismo tubo Amicon y fueron diafiltrados en 3 ocasiones con buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7.2) a las condiciones de centrifugación arriba descritas, pero durante 20 minutos. Después de la tercera diafiltración se obtuvo un volumen de extracto concentrado de 0.5 mL; a este se le adicionaron 1.5 mL del mismo buffer y pipeteando varias veces en el tubo para favorecer la solubilización de la proteína. La proteína concentrada se cuantificó por el método del ácido bicinónico (BCA) con el “kit” de Pierce BCA “protein Assay Kit” (Thermo scientific®). El extracto se repartió en viales conteniendo 180 y 100 µg de proteína y se congelaron a -70°C para su liofilización y análisis por geles SDS-PAGE y 2D-PAGE.

8.8. Separación de proteínas

8.8.1. Geles SDS-PAGE

A los viales con 100 µg de proteína liofilizada se les adicionaron 38.9 µL buffer de Laemmli 2x (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 25% glicerol; 0.01% azul de bromofenol; 5% β-mercaptoetanol). Los viales se agitaron en vórtex durante 5 minutos hasta que la proteína estuviera totalmente disuelta, entonces se colocaron durante 5 minutos en un agitador “Termomixer comfort” a 95°C. Inmediatamente, se pipetearon 35 µL (90 µg de proteína) por pozo en geles prefabricados (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, BIO-RAD®) con las siguientes características: 8.6 x 6.7 x 0.1 cm con T al 12% y 10 pozos de 50 µL. En cada gel se cargaron 2 réplicas biológicas por duplicado y en el primer pozo del gel se pipetearon 5 µL de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue Standards). Los geles se corrieron a 150 V en una cámara Mini-PROTEAN® (Tetra Cell, 2-Gel System, BIO-RAD®) y una fuente de poder PowerPac™ Universal (BIO-RAD®) de 500 V.

Los geles fueron lavados con agua destilada, se fijaron durante 2 horas con 75 mL de solución fijadora (10% ácido acético; 40% etanol; 50% agua destilada). Transcurrido el tiempo de fijación, se hicieron tres lavados de 15 minutos con 75 mL de agua destilada, inmediatamente después se tiñeron por 2 horas con 75 mL de colorante Commassie G-250 Blue Silver (Candiano y col., 2004).

Se realizaron tres lavados de 15 minutos con 75 mL de agua destilada. Los geles se dejaron en refrigeración con 75 mL de ácido acético al 2% (v/v) y se digitalizaron en un fotodocumentador Geldoc EZ de BIO-RAD® con el software ImageLab.

8.8.2. Geles 2D-PAGE

Los geles 2D-PAGE se realizaron en dos etapas, la primera fue una separación por isoelectroenfoque (IEF), en el que las proteínas se separaron de acuerdo a su punto isoeléctrico. En la segunda etapa, se separaron de acuerdo a su peso molecular en un gel SDS-PAGE con T al 12%.

Para la primera etapa (IEF), a los viales con 180 µg de proteína liofilizada se les adicionaron 150 µL de buffer de rehidratación (8 M Urea; 2 M Tiourea; 4% (p/v) CHAPS; 50 mM DTT; 0.6% anfolitos; 2 gotas de azul de bromofenol al 1%). Las muestras se solubilizaron agitando en vórtex durante 5 minutos y posteriormente, sonicando durante 15 minutos en baño de hielo; nuevamente, se agitó en vórtex durante un minuto y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1.5 minutos para sedimentar todo el material insoluble. A continuación, se pipetearon 125 µL (150 µg de proteína) por cada carril de la charola de rehidratación, se pipeteó de manera que la muestra se esparciera uniformemente por el carril sin generar burbujas y dejando un centímetro de espacio con respecto a los electrodos. Se colocaron las tiras de rango de pH de 4-7 (Ready-strip IPG de BIO-RAD®) cubriéndose con 2 mL de aceite mineral (BIO-RAD®). La placa se conectó al equipo de isoelectroenfoque (Protean i12 IEF Cell, BIO-RAD®) y se aplicó una rehidratación activa durante 14 horas, 20°C y una corriente máxima de 50 µA.

Cuando terminó el proceso de rehidratación, se colocaron los “wicks” (tiras de papel filtro de 1x0.2 cm) entre cada electrodo y la tira con el propósito de favorecer la remoción de sales y se inició el isoelectroenfoque con el siguiente protocolo:

1. 250 V → 15 minutos

2. Gradiente 4000 V → 1 hora
3. Aumento 4000 → 15000 V-hora
4. "Hold" → 500 V

Se retiró el aceite mineral de las tiras y se equilibraron en agitación suave durante 15 minutos con solución de equilibrio 1, seguido de 20 minutos con solución de equilibrio 2. La composición de las soluciones de equilibrio fue 6 M Urea; 250 mM Tris-HCl pH 8.8; 20 % (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS. Para la solución de equilibrio 1 y 2 se agregó 65 mM DTT y 260 mM de iodoacetamida respectivamente.

Al terminar el isoelectroenfoque, las tiras se colocaron en geles prefabricados al 12% (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, BIO-RAD®) y se sellaron con agarosa. A partir de este momento se procedió igual que con los geles SDS-PAGE de la sección 8.8.1.

8.9. Métodos analíticos

8.9.1. Análisis de azúcares

El análisis de azúcares se realizó en el medio inicial y medio final, por duplicado, empleando el método del ácido dinitrosalicílico, DNS-HCl (Miller y col., 1960). Para esto se preparó una curva estándar con una mezcla glucosa-fructosa en concentraciones decrecientes empezando con 2.5 mg/mL y diluyendo con agua cada vez a la mitad. Se pipeteó 1 mL de muestra (con la dilución necesaria para que la absorbancia medida callera dentro de la curva) en tubos de ensayo. A cada tubo se le pipetearon 20 µL de HCl al 36%, se mezclaron en vórtex y se incubaron en baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Se adicionaron 50 µL de KOH 5N a cada tubo para neutralizar el HCl y se mezcló el contenido en vórtex. Inmediatamente después se agregaron 1.5 mL de reactivo DNS y se incubaron en baño a ebullición durante diez minutos. Al final, los tubos se enfriaron en baño de agua corriente y se midió la absorbancia a 640 nm empleando un blanco con 1 mL de agua destilada que se procesó de la misma manera que las muestras.

8.9.2. Actividad invertasa

La actividad invertasa de cada extracto se realizó por duplicado y fue cuantificada midiendo la liberación de azúcares reductores mediante el método de Miller (1960). A cada tubo del ensayo se le agregaron 0.9 mL de sustrato (sacarosa 0.1 M en buffer de acetatos 0.1 M a pH

5) y se pusieron en baño de agua a 50 °C. Para cada tubo de ensayo se usó un control con 0.9 mL de buffer acetatos 0.1 M a pH 5 y 1.5 mL de reactivo DNS. Adicionalmente, se prepararon 3 tubos de estándar de glucosa-fructosa en concentración de 1 mg/mL y se les adicionaron 1.5 mL de reactivo DNS. Para el blanco se adicionó, en dos tubos 1 mL de buffer acetatos 0.1 M a pH 5 y 1.5 mL de reactivo DNS.

A todos los tubos se les adicionó 0.1 mL de extracto enzimático. Pasados 10 minutos de la adición del extracto, la reacción fue detenida adicionando 1.5 mL de reactivo DNS, excepto el control debido a que ya contenía el reactivo. Una vez que se detenida la reacción, los tubos fueron incubados en baño a ebullición durante 10 minutos. Finalmente, se enfriaron los tubos en baño de agua corriente y se midió la absorbancia a 640 nm.

Una unidad de actividad invertasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar una μmol de azúcares reductores por minuto bajo las condiciones de ensayo.

8.9.3. Análisis de proteína

El contenido de proteína del medio final sin concentrar y concentrado fue determinado por el método del ácido bicinconínico (BCA). La prueba se realizó en tubos, preparando primero una curva con el estándar de albúmina de suero bovino (BSA) empezando en una concentración de 2 mg/mL y diluyendo con buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.2 cada vez a la mitad.

El “kit” (Thermo Fisher Scientific) consta de dos reactivos: A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0.1M hidróxido de sodio) y B (4% de sulfato cúprico) que se mezclan en relación 50:1 respectivamente.

Para la determinación se adicionaron 50 μL de muestra más 1 mL de reactivo BCA, se mezclaron en vórtex y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, los tubos se enfriaron y se midió la absorbancia a 562 nm.

8.10. Análisis de imágenes de geles 2D-PAGE

Con el software PDQuest de BIO-RAD® se identificaron los “spots” en las imágenes obtenidas de la separación de proteínas por electroforesis bidimensional. Para cada concentración de sacarosa trabajada se generaron cuádruplicados de geles y, a partir de éstos, se obtuvo un gel maestro. Una vez generados los tres geles maestro se procedió a hacer una comparación

entre las tres condiciones. Se exportó la información generada en PDQuest al software Microsoft office Excel 2016. En particular importa trabajar con la “cantidad normalizada” que es una medida de la intensidad de cada “spot”. Este parámetro fue comparado vía gráfica y por análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los spots identificados entre condiciones.

Los “spots” seleccionados bajo los criterios establecidos en la sección 9.8 fueron cortados manualmente con puntas de micropipeta de 200 μ L. Las puntas fueron cortadas con bisturí bajo condiciones asépticas hasta dejarlas al tamaño del “spot” a recuperar. Posteriormente, se lavaron junto con tubos para PCR con una solución de acetonitrilo al 70% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%.

8.11. Procesamiento de los “spots”

Una vez cortados los “spots”, se enviaron a analizar por LC-MS/MS al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN unidad Irapuato (CINVESTAV). A continuación, todo el procesamiento se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Shevchenko y col. (2006). Primero, los “spots” fueron desteñidos adicionando 100 μ L de bicarbonato de amonio 100 mM solubilizado en acetonitrilo (1:1, v/v) y se incubaron durante 30 minutos con agitación suave. A continuación, se adicionaron 500 μ L de acetonitrilo puro y se incubaron con agitación suave a temperatura ambiente hasta perder el color de la tinción; inmediatamente se retiró el exceso de acetonitrilo.

8.11.1. Digestión con tripsina

Se preparó una solución de tripsina de Promega® 13 ng/ μ L en buffer de bicarbonato de amonio 10 mM conteniendo 10% (v/v) de acetonitrilo. Se adicionaron 50 μ L de esta solución hasta saturar los “spots” y se mantuvieron en baño de hielo. Cada 30 minutos se revisó si la solución fue absorbida y siendo éste el caso, se adicionó más solución hasta cubrir por completo los spots. Este procedimiento se repitió durante dos horas y a continuación se adicionaron 20 μ L del buffer bicarbonato de amonio para mantener los spots húmedos durante la hidrólisis enzimática que se llevó a 37°C durante toda la noche.

Los péptidos fueron extraídos con 100 μ L de buffer de extracción compuesto por ácido fórmico al 5% y acetonitrilo (1:2, v/v). Cada tubo fue incubado a 37°C durante 15 minutos con agitación suave. El sobrenadante fue colectado en tubos para PCR y secado en una centrifuga de vacío.

En cada tubo se adicionaron 20 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v), se agitaron con vórtex y se colocaron durante 5 minutos en un baño de agua con sonicación. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm y el sobrenadante fue colectado y secado en centrifuga de vacío.

8.11.2. Espectrometría de masas

Los péptidos obtenidos fueron separados utilizando un equipo nanoAcquity nano-flow liquid chromatography (LC) system (Waters), acoplado a un espectrómetro de masas (LTQ Velos) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipado con una fuente de iones nanoelectrospray. En una precolumna (Symmetry[®]) C18 de 5 μ m, 180 μ m x20 mm (Waters) se cargaron 3 μ L de muestra. Posteriormente, el flujo fue dirigido a una columna capilar de UPLC de 10 cm (100 μ m ID BEH-C18 1.7 μ m tamaño de partícula). La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C y los péptidos fueron separados durante 1 hora con un gradiente de solventes (A: ácido fórmico al 0.1%, B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo puro) con flujo de 400 nL/min. El gradiente se programó de la siguiente manera: 3-50% B (30 min), 50-80% B (2 min), 85% B (4 min) y 3% B (22 min) (Shevchenko y col., 2006). Los péptidos se eluyeron dentro de la fuente de iones del espectrómetro a través de una punta cubierta con sílice (NewObjective, Woburn, MA). El espectrómetro fue operado en modo de adquisición de datos dependiente, para alternar de forma automática el escaneo completo (400-1600 m/z) y uno siguiente de exclusión dinámica de los cinco espectros más abundantes en la trampa de iones linear. La disociación inducida por colisión (CID) fue llevada a cabo utilizando helio como gas de colisión al 35% de la energía de colisión y un tiempo de activación de 10 milisegundos. La adquisición de datos fue a través del software Xcalibur 2.0.7 de Thermo Fisher Scientific.

Los espectros de masas fueron extraídos con el software Proteome Discoverer versión 1.4 y buscados en la base de datos Sequest contra *A. brasiliensis* (13042 entradas) y *A. niger* (28928 entradas).

8.12. Identificación de proteínas

Con la información obtenida de los péptidos obtenidos y, con el fin de obtener información de las proteínas, se consultaron las siguientes bases de datos:

- “Protein Blast” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- “AspGD” (<http://www.aspergillusgenome.org/>)

- “UniProt” (<http://www.uniprot.org/>)
- “ExPASy” (http://web.expasy.org/compute_pi/)
- “KEGG” (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>)
- “Signal P 4.1 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)
- “Secretome P 2.0 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>)
- “Pfam” (<http://pfam.xfam.org/>)

9. Resultados y discusión

Este capítulo se divide en tres secciones, en la primera se reportan los resultados referentes a respirometría, incluyendo el pretratamiento con Sigmacote®; en la segunda sección, se presentan los resultados correspondientes al análisis enzimático y separación de proteínas en geles (SDS-PAGE y 2D-PAGE); y en la tercera sección, se presenta la identificación de proteínas posterior al análisis por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos.

9.1. Condiciones de cultivo sin crecimiento en pared (pretratamiento con Sigmacote®)

Estudios previos realizados en la planta piloto de Fermentación en Medio Sólido demostraron que al hacer CML empleando concentraciones crecientes de glucosa al inicio del cultivo, se obtienen dos estados fisiológicos en el crecimiento de *A. brasiliensis*: uno con morfología de pellets y otro con morfología miceliar (crecimiento en pared). Por lo tanto, se decidió evaluar una condición de cultivo en la que los matraces son pretratados con Sigmacote® (solución de organopolisiloxano clorado en heptano) ya que esta solución reacciona con grupos silanol presentes en la superficie del vidrio formando una microcapa neutral e hidrofóbica que previene la adsorción de proteínas básicas. De este modo, se pretendía evitar el crecimiento en pared. Sin embargo, el crecimiento en pared se vio favorecido en presencia de Sigmacote® ya que el hongo creció en las paredes e incluso en la base del matraz Van Schie y Fletcher (1999), demostraron que un tratamiento con Sigmacote® evita la adhesión de *Syntrophomonas wolfei* sobre superficies de vidrio. El resultado obtenido para *A. brasiliensis* puede atribuirse a que el hongo sintetizó y secretó proteínas y polímeros al medio que le permitieron adherirse a las paredes (Fig. 4). Además, entre otras condiciones que posiblemente favorecieron el crecimiento en pared podemos mencionar la elevada fuerza iónica del medio y quizás que las células del hongo presentaron interacciones hidrofóbicas con la superficie tratada del matraz.

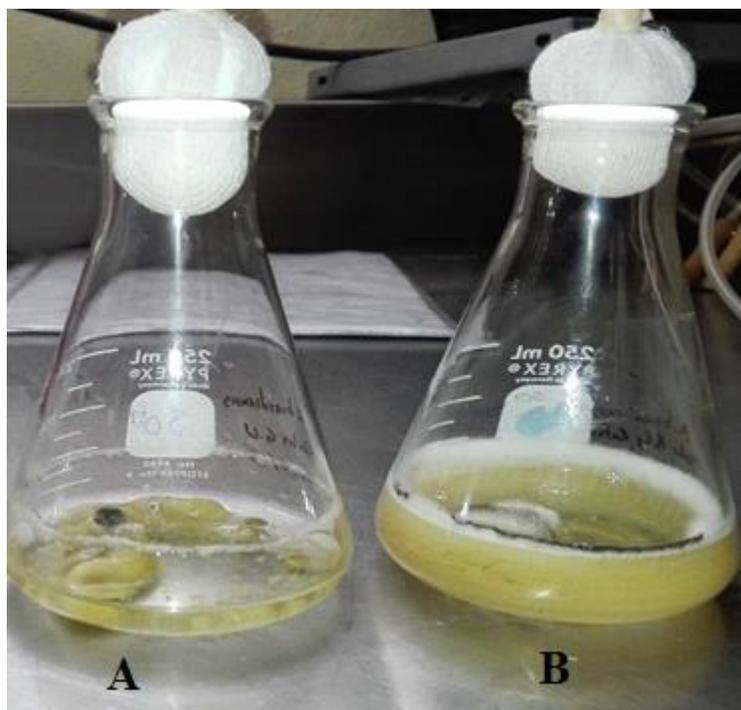


Figura 4. Crecimiento en pared de *A. brasiliensis*. A) Matraz sin Sigmacote[®], B) Matraz con Sigmacote[®].

Por lo tanto, se descartó el pretratamiento de los matraces con Sigmacote[®] y se decidió hacer los estudios respirométricos considerando la posibilidad de que se presente un segundo estado fisiológico (crecimiento en pared) que resultó mínimo en la concentración más baja de sacarosa inicial.

9.2. Análisis respirométrico

En esta sección se presentan los resultados de respiración de *A. brasiliensis* en medios de cultivo con concentraciones iniciales de sacarosa de 10 a 80 g/L. El análisis de los perfiles de producción de CO₂ en este intervalo de concentraciones de sacarosa y parámetros asociados con el estado fisiológico de *A. brasiliensis* durante su cultivo permitió elegir tres concentraciones: mínima, intermedia y máxima, además de un tiempo de muestreo para los cultivos destinados al análisis del secretoma (Volke y col., 2016).

Una vez definidas las concentraciones de sacarosa inicial y el tiempo de muestreo, se presentan los resultados correspondientes a los cultivos para la obtención y análisis del secretoma.

Esta ampliamente reportado que los CML se ven afectados por la elevada concentración de la fuente de carbono, ya sea por la elevada fuerza iónica del medio, presión osmótica y también por represión catabólica en la síntesis de algunas enzimas inducibles (Singhania y col. 2010); por este motivo, se decidió evaluar de forma indirecta el crecimiento de *A. brasiliensis* en medios con un amplio rango de concentraciones de sacarosa. Para esto, se monitoreó en línea la producción de CO₂ y posteriormente, se analizaron parámetros relacionados a ésta.

En la figura 5 se presenta la tasa de producción de CO₂ obtenida con concentraciones de sacarosa inicial de 10 a 80 g/L. El tiempo de cultivo para todas las concentraciones fue de 79 horas.

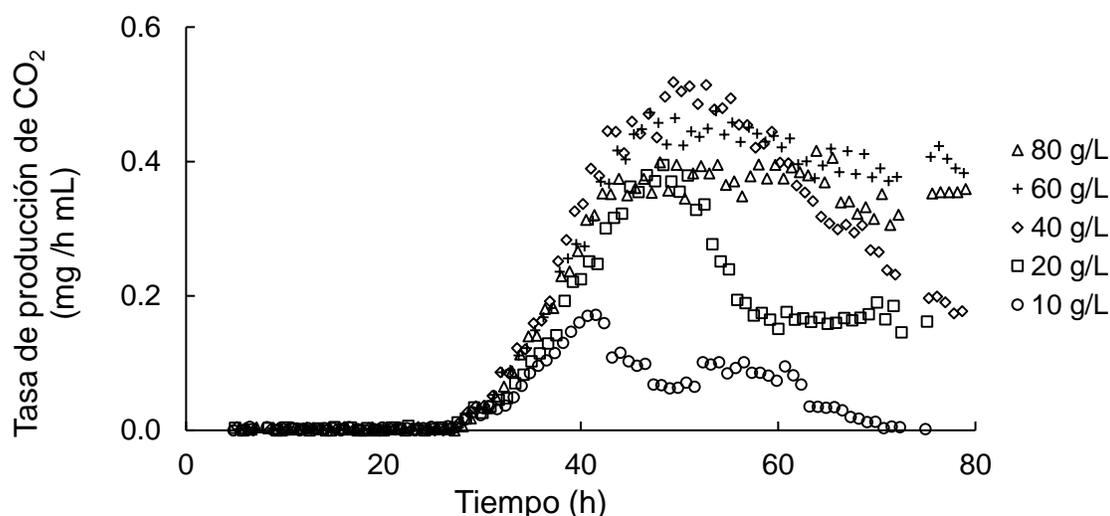


Figura 5. Tasa de producción de CO₂ en función de la concentración inicial de sacarosa.

A medida que aumenta la concentración de sacarosa inicial, la tasa máxima de producción de CO₂ aumenta. Sin embargo, los efectos adversos de la elevada concentración de sacarosa son visibles a partir de 60 g/L, ya que la tasa máxima de producción de CO₂ disminuye (Fig. 5 y Tabla 4). En contraste con lo reportado por Nava (2016), los resultados difieren notablemente ya que ella demostró que en CMS la tasa máxima de producción de CO₂ en función del tiempo aumenta al incrementar la concentración de sacarosa a concentraciones de 25 a 300 g/L.

Adicionalmente, se observa que la tasa máxima de producción de CO₂ se alcanza en un periodo de tiempo de 41 a 55 horas de cultivo y es similar con lo reportado por Nava (2016), quien reportó que la tasa máxima de producción de CO₂ a partir de concentraciones de

sacarosa de 25 a 300 g/L se alcanza a partir de las 29 y hasta 53 horas de cultivo respectivamente.

Posteriormente, al integrar los datos presentados en la figura 5, se obtienen las cinéticas de producción de CO₂ (Fig. 6), se aprecia que la producción de CO₂ se duplica cuando aumenta la concentración de sacarosa de 10 a 20 g/L. Este comportamiento se observa al aumentar la concentración a 40 g/L. No obstante, la producción de CO₂ en las concentraciones superiores a 40 g/L demostró ser similar.

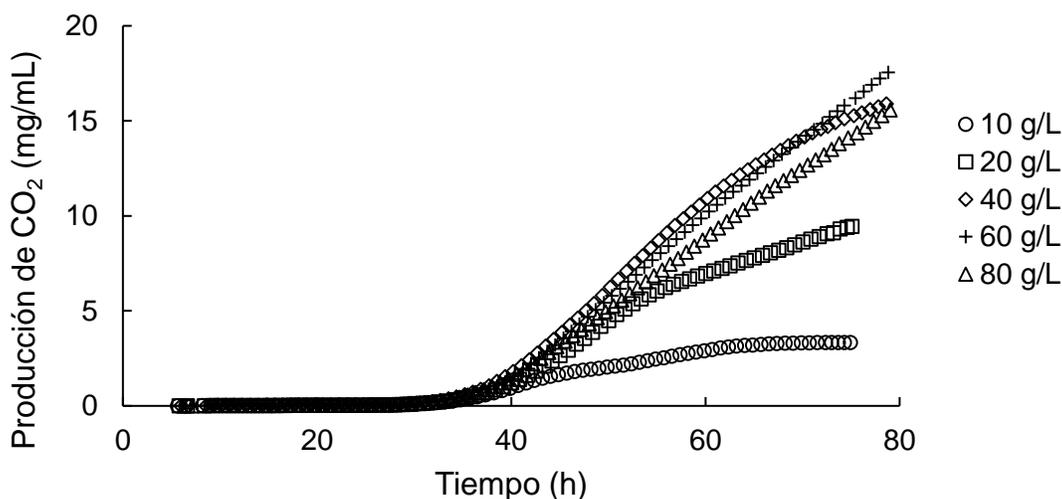


Figura 6. Cinéticas de producción de CO₂ en función de la concentración inicial de sacarosa.

Para observar con mayor claridad cómo se ve afectada la tasa máxima de producción de CO₂ y la máxima producción de CO₂ se presentan los valores de estas variables en función de la concentración inicial de sacarosa (Fig.7). Ambas variables alcanzan un valor máximo en la concentración de 40 g/L de sacarosa inicial. A partir de esta concentración y hasta 80 g/L los valores de ambas tasas son independientes de la concentración de sacarosa inicial.

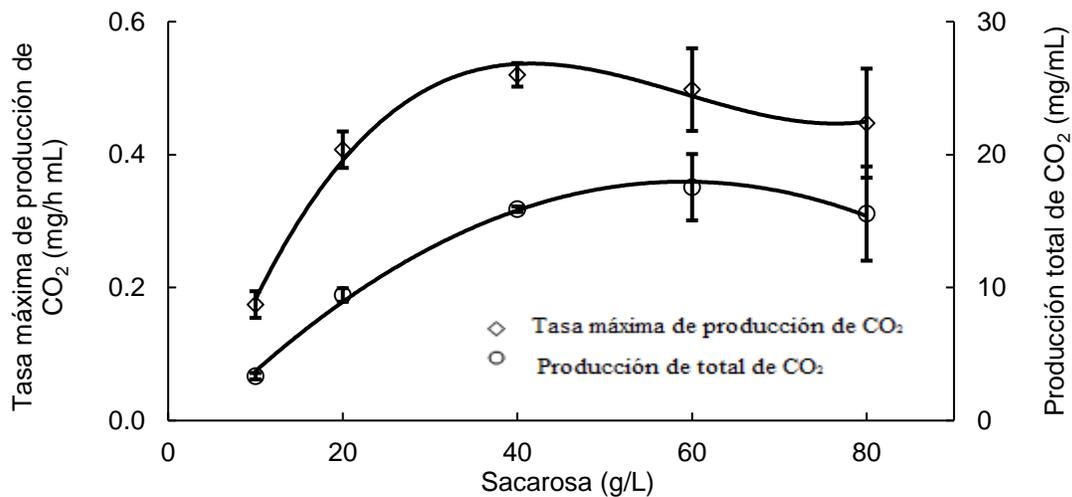


Figura 7. Perfiles de CO₂ en función de la concentración inicial de sacarosa.

Con la prueba de Tukey se demostró que la media de las tasas máximas de producción de CO₂ y consumo de O₂ obtenidas entre 10 y 40 g/L difiere significativamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las medias obtenidas con 20, 40, 60 y 80 g/L debido a que hay mayor variabilidad en las tasas máximas de producción de CO₂ obtenidas en las últimas dos concentraciones (Tabla 4).

Con respecto a la producción total de CO₂ se determinó estadísticamente que la media de la producción total de CO₂ obtenida con 10 g/L de sacarosa inicial no difiere significativamente de la media obtenida a 20 g/L, pero sí de las medias obtenidas con el resto de concentraciones de sacarosa (Tabla 4).

Estos resultados sugieren que a concentraciones superiores de 40 g/L de sacarosa inicial se pueden presentar problemas de estrés osmótico o inhibición por sustrato y, por lo tanto, la tasa máxima y producción de CO₂ no aumentan al aumentar la concentración de sustrato.

Nava (2016) trabajó con concentraciones iniciales de sacarosa de 25 a 300 g/L en CMS y demostró que al cultivar *A. brasiliensis*, la producción de CO₂ aumenta de manera lineal con respecto al aumento de la concentración de sacarosa inicial. Además, sus máximas producciones de CO₂ son alrededor de 3 veces mayores con respecto a los resultados obtenidos en CML.

Con esta comparación se puede inferir que el CML es susceptible de problemas de estrés osmótico o inhibición por sustrato cuando se trabaja con elevadas concentraciones de sustratos, mientras que el CMS no se ve afectado.

Los parámetros cinéticos asociados a la producción de CO₂ (tasa específica de producción de CO₂ (μ CO₂), fase lag, tiempo en el que se alcanza la tasa máxima de producción de CO₂) fueron estimados a partir de los datos de producción de CO₂ obtenidos con el monitoreo en línea del cultivo a través del metabolímetro (Tabla 4). Además, se midió la concentración de azúcares al inicio y al final del cultivo y la biomasa. De este modo, se determinó el porcentaje de conversión y el rendimiento biomasa sustrato.

Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de Tukey para encontrar que parámetros mantienen diferencias significativas entre las condiciones estudiadas.

Tabla 4. Parámetros cinéticos asociados a la producción de CO₂.

Concentración de sacarosa inicial (g/L)	10	20	40	60	80
Tasa máxima de producción de CO ₂ (mg/h mL)	0.17 ^a (0.02)	0.41 ^b (0.03)	0.52 ^b (0.02)	0.50 ^b (0.06)	0.45 ^b (0.08)
Producción de CO ₂ (mg/mL)	3.34 ^a (0.24)	9.44 ^{ab} (0.51)	15.89 ^{bc} (0.21)	17.55 ^c (2.50)	15.57 ^{bc} (3.54)
μ CO ₂ (1/h)	0.19 ^a (0.00)	0.15 ^a (0.01)	0.14 ^{ab} (0.01)	0.14 ^b (0.05)	0.11 ^b (0.06)
Fase lag (h)	27.18 (0.08)	26.71 (0.32)	27.07 (0.20)	27.66 (0.58)	27.71 (0.63)
Tiempo tasa máxima de producción de CO ₂ (h)	41.96 (0.65)	48.79 (0.65)	49.38 (0.06)	50.38 (4.46)	55.96 (11.25)
Producción de biomasa (mg/mL)	3.94 ^a (0.02)	6.55 ^b (0.45)	7.92 ^{bc} (0.19)	9.04 ^c (1.48)	8.82 ^c (3.75)
Conversión de sacarosa (%)	99.69 ^a (0.02)	99.52 ^a (0.06)	96.57 ^a (0.66)	78.66 ^{ab} (8.17)	58.76 ^b (7.08)
Y _{x/s} (g/g)	0.29 ^a (0.00)	0.23 ^a (0.01)	0.14 ^b (0.00)	0.13 ^b (0.00)	0.13 ^b (0.03)

El tiempo total de cultivo fue de 79 horas. Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey).

El valor de la tasa específica de producción de CO₂ (μ CO₂) fue estimado con el modelo exponencial y se encontró que disminuye conforme aumenta la concentración de sacarosa en el medio, pero en las concentraciones más elevadas los valores son similares.

Esto coincide con lo reportado por Nava (2016) quien demostró que la μCO_2 presenta valores parecidos cuando *A. brasiliensis* es cultivado en CMS y utilizando sacarosa como fuente de carbono en concentraciones mayores a 150 g/L. También, Volke y col. (2016) demostraron que la μCO_2 disminuye conforme aumenta la concentración de glucosa cuando *A. brasiliensis* es cultivado en CMS y se mantiene muy parecida cuando la concentración de glucosa es mayor a 100 g/L.

Por su parte, el tiempo de fase lag, que se determinó mediante el logaritmo natural de los datos de producción de CO_2 donde la intersección que se obtiene con el eje de las abscisas en la función lineal corresponde con este parámetro, no presentó diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en el rango de concentraciones estudiadas.

En la tabla 4 se observa que el consumo de sacarosa disminuye (presentando diferencias significativas en las concentraciones 10, 20 y 40 g/L con respecto a 80 g/L) a medida que aumenta la concentración de ésta en el medio de cultivo.

Favela-Torres y col. (1998), reportaron un comportamiento similar con el aquí reportado al cultivar *A. niger* 10 en medio líquido con un medio definido y concentraciones crecientes de glucosa (30, 50, 100 g/L). Ellos encontraron que parámetros como la tasa específica de crecimiento, el rendimiento $Y_{x/s}$ y la conversión de sustrato disminuyen a medida que incrementa la concentración de este último en el medio. Además, la producción máxima de biomasa la obtienen en un tiempo máximo de 48 horas y esta disminuye cuanto más alta es la concentración de sustrato. Por otro lado, la fase lag la reportan menor a 20 horas mientras en este trabajo se reporta alrededor de 27 horas. Esta diferencia puede ser debida a la naturaleza de la fuente de carbono ya que, tratándose de sacarosa, *Aspergillus niger* primero tendría que sintetizar invertasa. Otra explicación podría ser que la fuente de nitrógeno que se utilizó en el presente trabajo es una fuente más oxidada (nitrato de sodio) y en el trabajo reportado por Favela-Torres y col. (1998) utilizaron sulfato de amonio y esta fuente es más fácilmente asimilable por el hongo.

9.3. Cinética de producción de invertasa

Con base en los resultados anteriores, se realizó una cinética de crecimiento y de producción de invertasa con el medio con 20 g/L de sacarosa inicial (Fig. 8). Se alcanzó la máxima producción de invertasa (7.3 U/mL) y biomasa (7.97 mg/mL) a las 90 y 72 horas de cultivo,

respectivamente. Al final del cultivo se consumió por completo la fuente de carbono (Fig. 9). El valor de actividad invertasa obtenido fue alrededor de cinco veces mayor que el reportado después de 96 horas de cultivo de *A. niger* en un medio sin optimizar con 50 g/L de sacarosa (AshokKumar y col., 2001). Por otro lado, aún después de optimizar el medio, variando la concentración de la fuente de nitrógeno, fósforo y azufre y, dejando una concentración de sacarosa constante en el medio inicial (20 g/L), la actividad invertasa resultó ser alrededor de cuatro veces menor (120 h de cultivo) que los resultados aquí reportados.

Utilizando los datos de producción de biomasa y de actividad invertasa, se estimaron los coeficientes α y β del modelo de Luedeking-Piret (1959) y se demostró que la producción de invertasa está asociada al crecimiento (Tabla 5).

La máxima tasa específica de crecimiento (μ_{max}) resultó ser mayor que la tasa específica de producción de CO_2 ($0.173 \text{ h}^{-1} \pm 0.007$). Esto puede ser debido a que la producción de CO_2 no está completamente asociada a la producción de biomasa durante todo el tiempo de cultivo. Los coeficientes de mantenimiento y de producto no asociado al crecimiento (m y β) resultaron despreciables debido a que, en los intervalos de sus respectivas desviaciones se encontraba el valor cero.

Tabla 5. Parámetros estimados a través de los modelos logístico, Pirt y Luedeking-Piret para el crecimiento de *A. brasiliensis* a partir de los datos de producción de biomasa y actividad invertasa.

Parámetro	Promedio	R ²
$\mu_{max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.315 (0.001)	0.959
$m \text{ (mgS/mgXh)}^a$	0.030 (0.041)	0.959
$Y_{x/s} \text{ (mgX/mgS)}$	0.300 (0.002)	0.959
$\alpha \text{ (U/mgX)}$	0.524 (0.219)	0.954
$\beta \text{ (U/mgXh)}^b$	0.051 (0.064)	0.954

m y β : Parámetros despreciables debido a que en el intervalo de sus desviaciones se encuentra el cero. Los números entre paréntesis representan la desviación estándar.

No obstante, el coeficiente de producción de invertasa asociado al crecimiento demuestra que la producción de la enzima es asociada al crecimiento (Soto-Cruz y col., 2002).

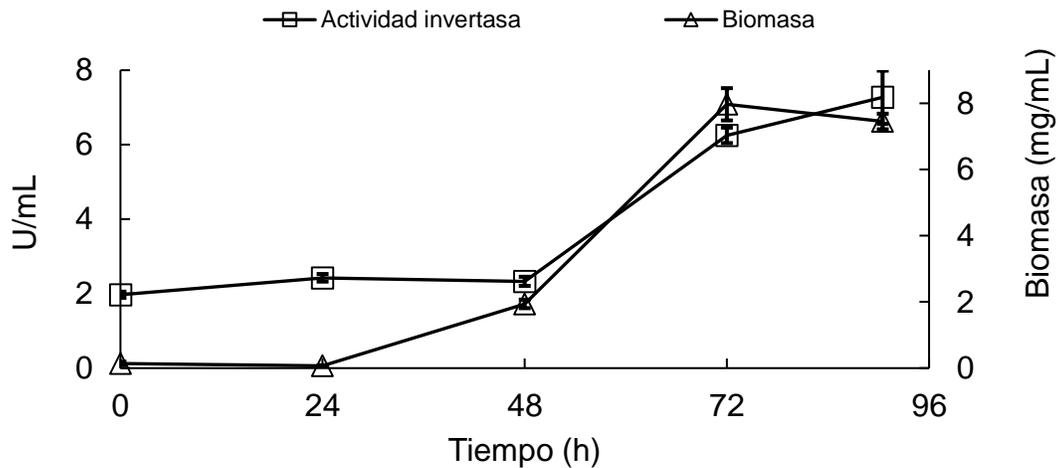


Figura 8. Cinética de actividad invertasa y producción de biomasa por *A. brasiliensis*, con una concentración de sacarosa en el medio inicial 20 mg/mL.

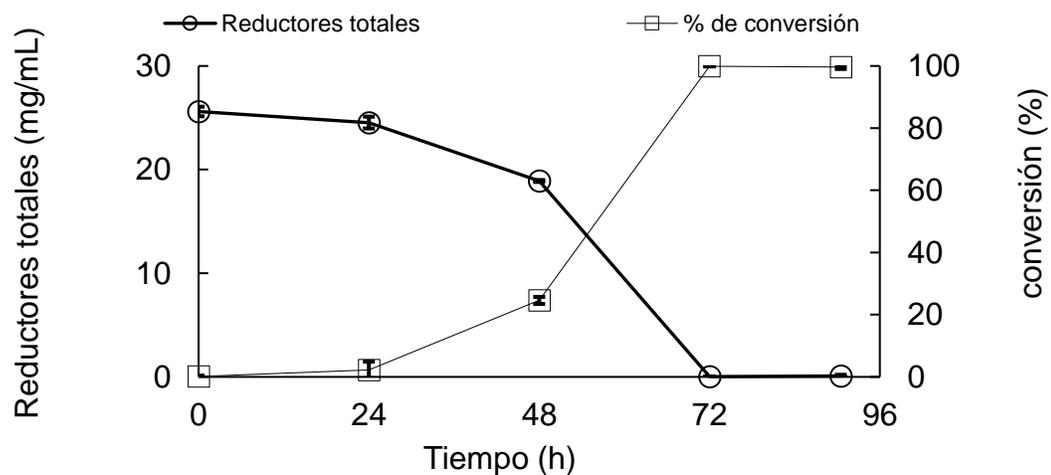


Figura 9. Consumo de azúcares reductores totales determinados como equivalentes de sacarosa. Concentración de sacarosa en el medio inicial 20 mg/mL.

El pH, es un parámetro muy importante en el CML. Para favorecer el crecimiento y la actividad de la invertasa producida se necesita que el pH en el medio esté cercano a los valores óptimos de crecimiento y de actividad. Se ha reportado que la invertasa de *A. niger* es estable a valores de pH de 2.9 a 6.2 y su pH óptimo de actividad se encuentra alrededor de 5 (Naadem y col., 2015). En la figura 10 se presenta el cambio de pH durante el periodo de cultivo. El pH inicial fue de 6.51 y llegó a un valor final de 4.15. Estos resultados coinciden con lo reportado por

Veana y col. (2011) cuando cultivaron *A. niger* en medio Czapek-Dox con sacarosa 12.5 g/L y sugieren que el pH del medio disminuye, pero se mantiene dentro de un intervalo adecuado para el crecimiento (pH: 4-6).

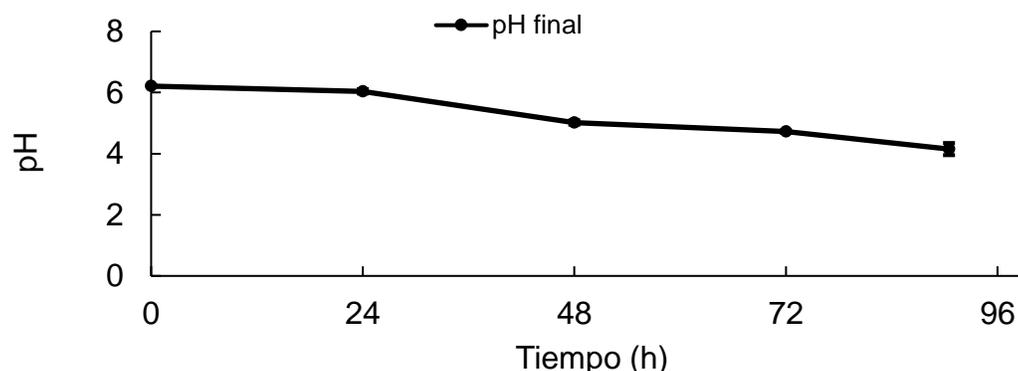


Figura 10. Cambios en el pH durante el tiempo de cultivo.

9.4. Obtención del secretoma

El proteoma es una huella proteica de un cultivo en un estado fisiológico característico (Volke y col., 2016) En un cultivo por lote el estado fisiológico del microorganismo depende de las condiciones y de la edad del cultivo en particular. Es decir, bajo condiciones de cultivo definidas, el estado fisiológico de un cultivo depende del tiempo de incubación. Por lo anterior, y para realizar el estudio comparativo del secretoma de *A. brasiliensis* en función de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, las muestras para el análisis de secretoma se obtuvieron asociado el estado fisiológico a la tasa máxima de producción de CO₂. Como se observa en las Figs. 5 y 6, la tasa máxima de producción de CO₂ se obtiene al final de la fase exponencial de producción de CO₂; es decir, en cultivos jóvenes, en los que se ha producido menos de la mitad del CO₂ obtenido al final del cultivo. Con base en lo anterior, se espera que los cultivos obtenidos en este estado fisiológico tengan niveles bajos de actividad proteolítica (O'donnell y col., 2001). En todos los cultivos realizados, la tasa de producción de CO₂ alcanza un valor máximo en un intervalo entre las 41 y 55 h de cultivo (cerca del 50% del tiempo total de cultivo) lo que permite llevar a cabo el procedimiento de toma de muestras para asegurar estados fisiológicos similares bajo las diferentes condiciones de cultivo. Este es un aspecto muy importante ya que el análisis del secretoma debe asegurar reproducibilidad biológica y analítica.

Las concentraciones de sacarosa seleccionadas para los estudios del secretoma fueron 20, 40, 60 g/L (baja, intermedia y máxima). Se seleccionó 20 g/L ya que, a una concentración menor la cantidad de proteína producida era insuficiente para su separación por 2D-PAGE. Por otra parte, en una concentración superior a 60 g/L se observó que la tasa máxima de producción de CO₂ es independiente de la concentración de sacarosa además de que se presenta crecimiento en la pared del matraz (un segundo estado fisiológico). De este modo, se seleccionó 60 g/L como la máxima concentración de sacarosa y 40 g/L como la concentración intermedia.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros estimados de un nuevo análisis respirométrico para las concentraciones de 20, 40 y 60 g/L de sacarosa; estos cultivos fueron detenidos después de alcanzar la máxima tasa de producción de CO₂. Dicha variable y la producción de CO₂ incrementaron a medida que aumentó la concentración de sacarosa. Sin embargo, la tasa específica de producción de CO₂ disminuyó, mostrando un comportamiento similar al reportado por Volke y col. (2016) donde el mayor valor se obtiene con 30 g/L de glucosa y disminuye en las concentraciones superiores hasta llegar 180 g/L.

La actividad invertasa disminuyó desde 3.9 a 0.82 U/mL al aumentar la concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L. Estos resultados son similares con los reportados por Romero-Gómez y col. (2000), quienes compararon la producción de invertasa en tres cepas de *A. niger*, empleando un medio con sacarosa (100 g/L) y encontraron que después de 60 h de cultivo alcanzó la máxima actividad invertasa (1.1 U/mL).

Este comportamiento en la actividad enzimática sugiere que con concentraciones mayores a 20 g/L de sacarosa se reprime la síntesis de invertasa. Así mismo, Robledo-Olivo y col. (2009) demostraron que al cultivar *A. niger* Van Tieghem con concentraciones superiores a 25 g/L de sacarosa, se reprime la síntesis de invertasa alcanzando un máximo de 4 U/mL a las 50 h de cultivo.

Tabla 6. Parámetros cinéticos asociados a la producción de CO₂ en las concentraciones seleccionadas para el análisis del secretoma.

Concentración de sacarosa inicial (g/L)	20	40	60
Tasa máxima de producción de CO ₂ (mg/h mL)	0.46 ^a (0.01)	0.64 ^b (0.08)	0.63 ^b (0.00)
Producción de CO ₂ (mg/mL)	4.22 ^a (0.22)	8.56 ^b (0.19)	9.38 ^b (0.49)
μCO ₂ (1/h)	0.17 ^a (0.00)	0.12 ^b (0.01)	0.11 ^b (0.0)
Fase lag (h)	28.22 (0.18)	27.59 (0.41)	27.86 (0.27)
Tiempo tasa máxima de producción de CO ₂ (h)	47.64 (1.98)	51.25 (2.45)	53.04 (1.33)
Conversión de sacarosa (%)	80.27 ^a (0.81)	66.28 ^b (0.55)	65.20 ^b (2.36)
Actividad invertasa (U/mL)	3.90 (0.56)	2.96 (0.11)	0.82 (0.51)

Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey). Los números entre paréntesis representan la desviación estándar.

9.5. Separación de proteínas por peso molecular en geles SDS-PAGE

La tabla 7 presenta los valores de concentración de proteína cuantificados para las tres condiciones de cultivo (20, 40 y 60g/L); la cantidad de proteína extracelular concentrada aumenta a medida que aumenta la concentración de sacarosa en el medio inicial.

Tabla 7. Cuantificación de proteína extracelular concentrada.

Sacarosa inicial (g/L)	# unidades experimentales	Proteína (μg/mL)
20	8	80.6 (16.4)
40	2	423.7 (6.9)
60	3	577.2 (12.3)

Determinación con método BCA. Los números entre paréntesis representan la desviación estándar.

Con la finalidad de observar la reproducibilidad en las muestras biológicas se realizaron geles SDS-PAGE de dos muestras por duplicado (Fig. 11). Se demostró la reproducibilidad entre las réplicas biológicas y analíticas, y que predominó la presencia de proteínas de alto peso molecular; éstas últimas, disminuyen cuando aumenta la concentración de sacarosa en el medio. De igual manera, se distinguen bandas intensas y bien definidas alrededor de 150 y 75 kDa. Estas bandas sugieren la presencia de dos subunidades de invertasa, ya que esta enzima ha sido reportada en especies de *Aspergillus* con dos subunidades de 71 a 116 kDa (Hocine

y col., 2000). Estos resultados difieren de Nava (2016), quien reportó una distribución homogénea de las proteínas en cada carril, con mayor intensidad en la zona de bajo peso molecular. Esta diferencia sugiere que el secretoma obtenido en CML es diferente que el obtenido en CMS, lo cual puede deberse entre otras cosas, a modificaciones postraduccionales, isoformas de las proteínas, y modificaciones químicas durante el procesamiento, que pueden resultar en proteólisis (Duquesnoy y col., 2009).

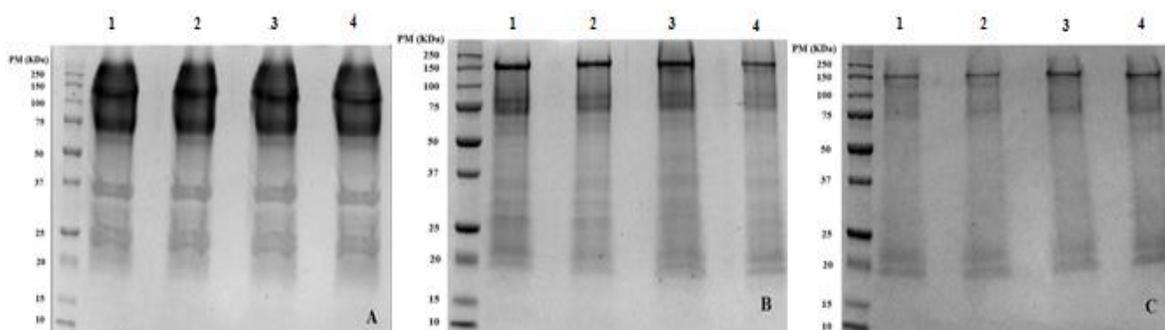


Figura 11. Geles SDS-PAGE de los extractos proteicos extracelulares. A) 20 g/L sacarosa inicial. B) 40 g/L sacarosa inicial. C) 60 g/L sacarosa inicial. Carriles 1,2 y 3,4 son replicas analíticas de dos réplicas biológicas diferentes. En cada carril se cargaron 90 μ g de proteína.

9.6. Separación de proteínas por geles 2D-PAGE

En una primera etapa, se separaron proteínas en un rango de pH de 3-10, encontrando principalmente proteínas ácidas (pI : 3-5). Sin embargo, en las imágenes de los geles se observó poca resolución que no permitiría un buen análisis vía “software”. Por este motivo, se decidió separar las proteínas en un rango de pH de 4-7. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Han y col. (2010), ya que ellos reportan proteínas ácidas con mejor separación en un rango de pH de 4-7, cuando cultivaron *A. terreus* con concentraciones de sacarosa inicial de 30-100 g/L en CML.

A partir de un análisis de cuatro replicas (dos biológicas y dos analíticas) de los geles 2D-PAGE de los extractos proteicos extracelulares obtenidos con 20, 40 y 60 g/L de sacarosa inicial, realizado con el software PDQuest se llegó a los geles maestro (Fig. 12).

En los tres geles maestro, uno para cada concentración inicial de sacarosa, se observa que las proteínas ácidas se encuentran en mayor abundancia; además hay presencia de varias isoformas de proteínas de elevado peso molecular y poca presencia de proteínas neutras y alcalinas que se quedaron aglomeradas en el extremo superior derecho de cada gel (pH: 7).

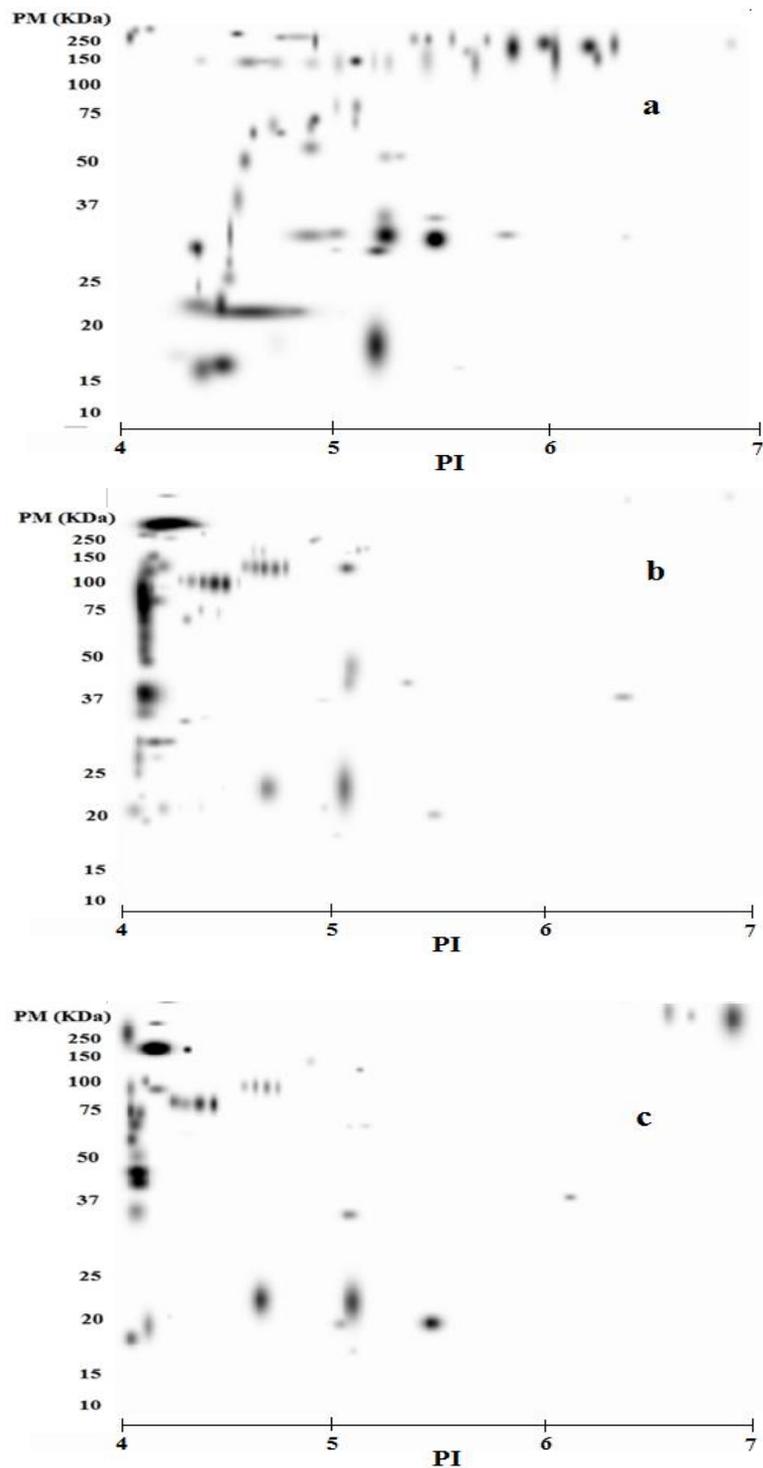


Figura 12. Geles maestros de los extractos proteicos extracelulares de *A. brasiliensis* obtenidos por CML con concentraciones iniciales de sacarosa. (a) 20 g/L, (b) 40 g/L y (C) 60 g/L. La separación por punto isoeléctrico se hizo con IPG con un rango de pH de 4 a 7 y la separación por peso molecular se hizo con geles SDS-PAGE con T=12%.

Al comparar los geles maestro, se encontró que el número de “spots” disminuye a medida que incrementa la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, coincidiendo con los resultados reportados por Han y col. (2010), quienes demostraron que la secreción de proteínas por *A. terreus* disminuye cuando se cultiva en medio líquido con elevadas concentraciones de glucosa y sacarosa. Sin embargo, puede resaltarse que los niveles de secreción de proteínas reportados para *A. brasiliensis* en CMS con concentraciones crecientes de glucosa y sacarosa son inversos a los aquí reportados, mostrando que la elevada concentración de la fuente de carbono no tiene efectos adversos sobre la secreción de proteínas cuando se cultiva en CMS (Salgado, 2015; Nava, 2016).

El análisis cuantitativo de los geles con el software PDQuest demostró la presencia de un total de 176 “spots” que se distribuyeron de la siguiente manera: 71 en la condición de 20 g/L de sacarosa, 64 en la condición de 40 g/L, y 41 en la condición de 60 g/L. Las condiciones 60 y 40 g/L mostraron mayor similitud en la distribución de los “spots” con respecto a la condición de 20 g/L (Fig. 13).

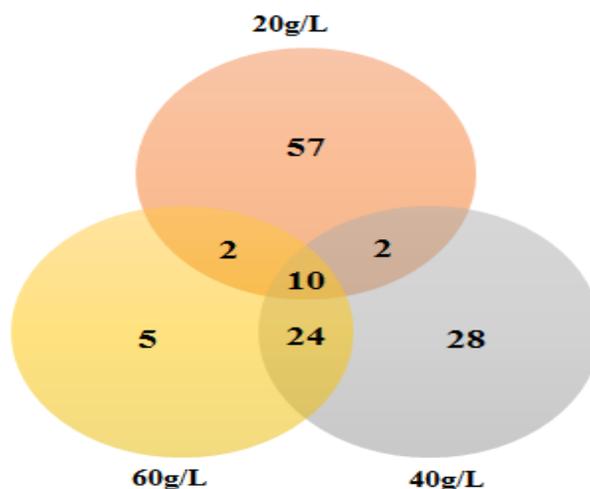


Figura 13. Distribución de los spots identificados en cada condición.

9.7. Selección de “spots” y análisis por LC-MS/MS

Una vez realizado el análisis de los geles se procedió a seleccionar los “spots” de acuerdo a los siguientes criterios (Carrillo y col., 2016):

- Cambio en la intensidad normalizada de un spot identificado en las tres concentraciones.

- Que el “spot” aparezca solo en una concentración.
- Que el “spot” esté presente en dos de las tres concentraciones.

Un último criterio considerado fue el coeficiente de variación (C.V.) de la intensidad normalizada de los “spots”. Este coeficiente se determinó dividiendo la desviación estándar entre el promedio de cada uno de los “spots” (cada “spot” por cuadruplicado). De este modo, se definieron dos categorías para recuperar los spots: % C.V: 0-25 y 25-50.

Con los criterios definidos, se seleccionaron 28 “spots, se recuperaron y analizaron por LC-MS/MS (Tabla 8). Para demostrar si había diferencias significativas en la intensidad normalizada de los “spots” presentes en dos o en las tres condiciones se realizó un ANOVA y prueba de Tukey con $\alpha=0.05$. A continuación (Fig. 14 y Tabla 7), se presenta la distribución de los “spots” seleccionados.

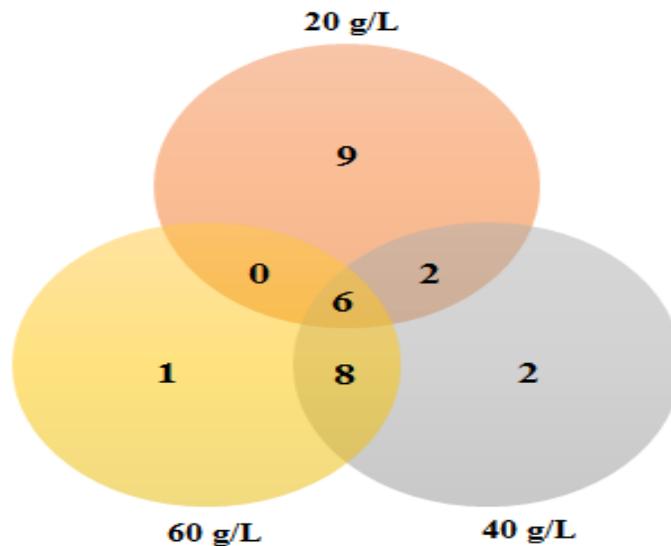


Figura 14. Distribución de los spots seleccionados para el análisis LC-MS/MS.

Tabla 8. Características de los “spots” seleccionados para análisis LC-MS/MS.

Condición g/L	Nombre “spot”	Intensidad	*C.V %	Fold	Cambio en la abundancia	Imagen “spot” 20 g/L	Imagen “spot” 40 g/L	Imagen “spot” 60 g/L
20	SSP8001	85,100	75.80	60/20: 3.82 40/20: 2.81 Probabilidad: 0.10				
40	SSP7001	238,782	75.39					
60	SSP9002	325,446	29.45					
20	SSP2002	667,966	52.99	60/20: 0.17 40/20: 0.35 Probabilidad: 0.02 20#60				
40	SSP3002	241,522	58.30					
60	SSP4202	116,479	59.01					
20	SSP1001	1,600,800	56.35	60/20: 0.14 40/20: 0.12 Probabilidad: 0.01 20#40,60				
40	SSP0101	186,582	160.90					
60	SSP2101	226,010	14.57					
20	SSP5502	236,715	41.20	60/20: 0.21 40/20: 0.18 Probabilidad: 4.98E-03 20#40,60				
40	SSP6604	42,433	99.56					
60	SSP7903	49,642	76.80					

*(C.V: Coeficiente de variación; ND: No detectado; Probabilidad: valor determinado mediante ANOVA, menor a 0.05 significa que hay diferencias significativas; círculos rojos para señalar “spots”).

Tabla 8. Características de los “spots” seleccionados para análisis LC-MS/MS (continuación).

Condición g/L	Nombre “spot”	Intensidad	*C.V %	Fold	Cambio en la abundancia	Imagen “spot” 20 g/L	Imagen “spot” 40 g/L	Imagen “spot” 60 g/L
20	SSP4502	142,870	125.86	60/20: 0.24 40/20: 2.07 Probabilidad: 0.01 40#60				
40	SSP6602	296,188	25.69					
60	SSP7901	34,572	44.74					
20	SSP6201	265,117	24.75	60/20: 0.49 40/20: 0.85 Probabilidad: 0.30				
40	SSP7203	226,212	74.36					
60	SSP9401	130,930	36.96					
20	SSP8301	942,386	7.70	40/20:0.08 Probabilidad: 3.26E-06 20#40				
40	SSP7202	74,887	36.78					
60	ND	ND	ND					
20	SSP5402	254,453	48.60	40/20: 0.03 Probabilidad: 9.14E-03 20#40				
40	SSP6201	7,498	91.57					
60	ND	ND	ND					

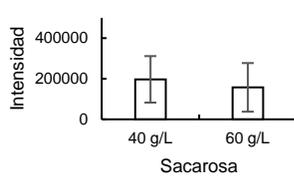
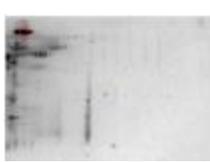
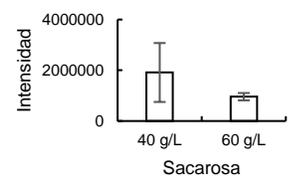
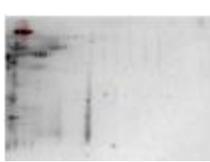
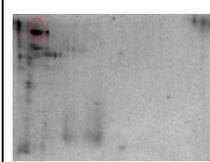
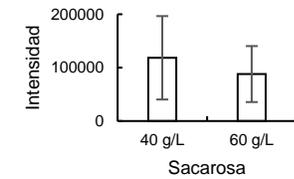
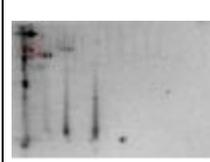
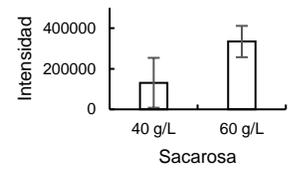
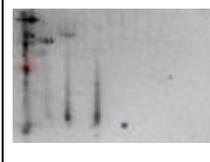
*(C.V: Coeficiente de variación; ND: No detectado; Probabilidad: valor determinado mediante ANOVA, menor a 0.05 significa que hay diferencias significativas; círculos rojos para señalar “spots”).

Tabla 8. Características de los “spots” seleccionados para análisis LC-MS/MS (continuación).

Condición g/L	Nombre “spot”	Intensidad	*C.V %	Fold	Cambio en la abundancia	Imagen “spot” 20 g/L	Imagen “spot” 40 g/L	Imagen “spot” 60 g/L
20	ND	ND	ND	60/40: 4.96 Probabilidad: 0.32				
40	SSP6003	2,664	84.23					
60	SSP9001	13,225	147.56					
20	ND	ND	ND	60/40: 0.64 Probabilidad: 0.11				
40	SSP5502	310,420	34.48					
60	SSP6702	197,234	30.13					
20	ND	ND	ND	60/40: 0.44 Probabilidad: 4.48E-03 40#60				
40	SSP5501	627,725	23.42					
60	SSP5703	278,792	20.75					
20	ND	ND	ND	60/40: 0.71 Probabilidad: 0.38				
40	SSP4502	285,789	47.08					
60	SSP5702	202,643	55.82					

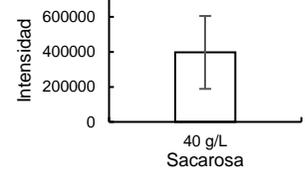
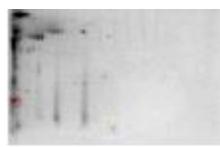
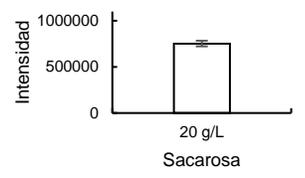
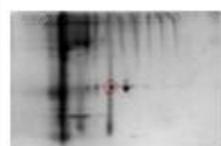
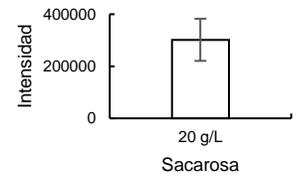
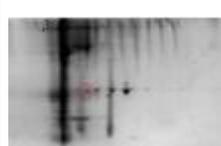
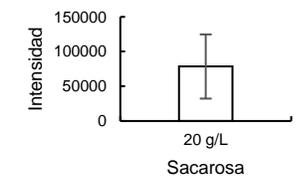
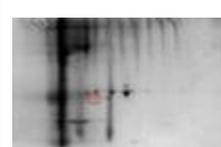
*(C.V: Coeficiente de variación; ND: No detectado; Probabilidad: valor determinado mediante ANOVA, menor a 0.05 significa que hay diferencias significativas; círculos rojos para señalar “spots”).

Tabla 8. Características de los “spots” seleccionados para análisis LC-MS/MS (continuación).

Condición g/L	Nombre “spot”	Intensidad	*C.V %	Fold	Cambio en la abundancia	Imagen “spot” 20 g/L	Imagen “spot” 40 g/L	Imagen “spot” 60 g/L
20	ND	ND	ND	60/40: 0.80 Probabilidad: 0.65				
40	SSP4501	196,975	58.15					
60	SSP4601	157,492	76.06					
20	ND	ND	ND	60/40: 0.50 Probabilidad: 0.15				
40	SSP3904	1,912,215	60.76					
60	SSP5901	959,355	15.04					
20	ND	ND	ND	60/40: 0.74 Probabilidad: 0.54				
40	SSP3601	118,442	65.92					
60	SSP5801	87,956	59.59					
20	ND	ND	ND	60/40: 2.55 Probabilidad: 0.03 40≠60				
40	SSP2304	130,805	93.97					
60	SSP3502	334,107	23.12					

*(C.V: Coeficiente de variación; ND: No detectado; Probabilidad: valor determinado mediante ANOVA, menor a 0.05 significa que hay diferencias significativas; círculos rojos para señalar “spots”).

Tabla 8. Características de los “spots” seleccionados para análisis LC-MS/MS (continuación).

Condición g/L	Nombre “spot”	Intensidad	*C.V %	Fold	Cambio en la abundancia	Imagen “spot” 20 g/L	Imagen “spot” 40 g/L	Imagen “spot” 60 g/L
20	ND	ND	ND	ND				
40	SSP2102	396,836	52.45					
60	ND	ND	ND					
20	SSP6401	752,889	4.00	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					
20	SSP5401	301,542	26.80	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					
20	SSP5201	78,492	58.90	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					

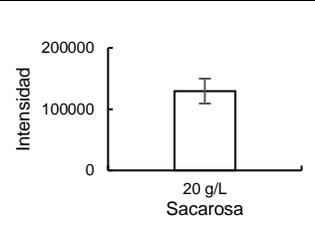
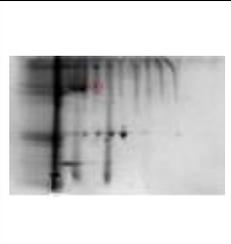
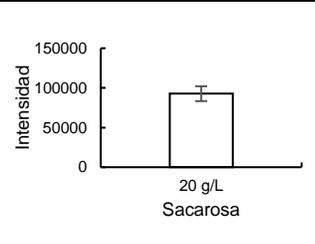
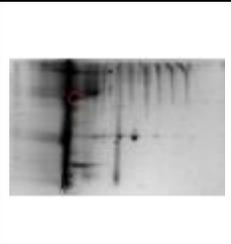
*(C.V: Coeficiente de variación; ND: No detectado; Probabilidad: valor determinado mediante ANOVA, menor a 0.05 significa que hay diferencias significativas; círculos rojos para señalar “spots”).

Tabla 8. Características de los “spots” seleccionados para análisis LC-MS/MS (continuación).

Condición g/L	Nombre “spot”	Intensidad	*C.V %	Fold	Cambio en la abundancia	Imagen “spot” 20 g/L	Imagen “spot” 40 g/L	Imagen “spot” 60 g/L
20	SSP8401	92,797	17.42	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					
20	SSP9401	100,277	1.33	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					
20	SSP6601	138,984	41.13	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					
20	SSP8801	91,036	16.47	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					

*(C.V: Coeficiente de variación; ND: No detectado; Probabilidad: valor determinado mediante ANOVA, menor a 0.05 significa que hay diferencias significativas; círculos rojos para señalar “spots”).

Tabla 8. Características de los “spots” seleccionados para análisis LC-MS/MS (continuación).

Condición g/L	Nombre “spot”	Intensidad	*C.V %	Fold	Cambio en la abundancia	Imagen “spot” 20 g/L	Imagen “spot” 40 g/L	Imagen “spot” 60 g/L
20	SSP6501	129,503	15.69	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					
20	SSP3501	92,708	10.09	ND				
40	ND	ND	ND					
60	ND	ND	ND					

*(C.V: Coeficiente de variación; ND: No detectado; Probabilidad: valor determinado mediante ANOVA, menor a 0.05 significa que hay diferencias significativas; círculos rojos para señalar “spots”).

9.8. Identificación y caracterización de proteínas

Para identificar las proteínas sometidas a digestión trípica y análisis por LC-MS/MS se usó la base de datos del proteoma de la cepa *Aspergillus niger* CBS 513.88.

Con la información obtenida del análisis de espectrometría de masas se realizó la comparación (“Blast”) de secuencias de péptidos con las de proteínas encontradas en bases de datos. Con la herramienta “Protein Blast” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se identificaron 30 proteínas provenientes de los 28 “spots” seleccionados (Tabla 9). Para cada proteína identificada se obtuvo la siguiente información:

- Porcentaje de identidad
- Porcentaje de cobertura
- Número de identificación
- Número de Aminoácidos
- Gen

Para obtener información sobre las funciones biológicas y moleculares de las proteínas, así como su localización celular, peso molecular y punto isoeléctrico teóricos se emplearon las bases de datos “AspGD” (<http://www.aspergillusgenome.org/>), “UniProt” (<http://www.uniprot.org/>) y “ExPASy” (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Para proteínas con actividad enzimática se empleó la base de datos “KEGG” (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>), con la cual se obtuvo información relevante, como el número de clasificación de las enzimas y rutas metabólicas en las que participan.

También se identificó la familia a la que pertenecen las proteínas (<http://pfam.xfam.org/>), y las vías de secreción clásica “Signal P 4.1 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y no convencionales “Secretome P 2.0 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>).

Tabla 9. Características de las proteínas identificadas a partir del secretoma de *A. brasiliensis*.

Concentración (g/L)	Nombre del gen	Nombre	Función biológica	No. EC	pl	PM (kDa)	% de cobertura	% de identidad	SecP	*Loc
20, 40, 60	An11g03740	Oxidoreductasa con dominio de unión a FAD	Procesos de oxidación-reducción	1.-.-.-	4.4	61.3	100	50	0.85	CCD
20, 40, 60	An03g00460	Oxigenasa dependiente de FAD	Procesos de oxidación-reducción, biosíntesis de asperfuranona, biosíntesis de fumiquinazolina C	1.5.3.6	4.8	54.7	92	84	0.78	Ext
20, 40, 60	An01g14740	Glucosa oxidasa	Procesos de oxidación-reducción, metabolismo de alcohol	1.1.3.4	5.1	65.6	100	93	0.86	Int
20, 40, 60	An09g05940	Sulfidril oxidasa	Procesos de oxidación-reducción, respuesta celular a micotoxinas, biosíntesis de gliotoxina	1.-.-.-	5.5	44.0	100	100	0.70	Ext
20, 40, 60	An01g01820	Catalasa R	Procesos de oxidación-reducción, respuesta a estrés oxidativo	1.11.1.6	5.7	81.0	77	92	0.75	Int
20, 40, 60	An03g06550	Glucamilasa	Procesos de metabolismo de polisacáridos	3.2.1.3	4.0	68.3	100	100	0.85	Ext
20	An12g08280	Inulinasa	Procesos de catabolismo de sacarosa	3.2.1.26	5.1	59.2	100	97	0.86	Ext
20, 40, 60	An03g00940	Endo-1,4-beta-xilanasa F1	Procesos de catabolismo del xilano	3.2.1.8	6.6	35.5	84	58	0.76	Ext
20, 40, 60	An01g00780	Endo-1,4-beta-xilanasa A	Procesos de catabolismo del xilano	3.2.1.8	5.1	24.1	72	63	0.98	Ext
20	An01g11010	Glicosidasa crf1	Procesos de metabolismo de carbohidratos	3.2.1.-	3.8	40.0	100	69	0.69	Ext
20	An07g07530	Glicosidasa crf2	Adhesión de simbionte a huésped, organización de la pared celular fúngica, crecimiento del organismo unicelular como un hilo de células unidas: patogénesis	3.2.1.-	4.1	41.6	100	69	0.69	Ext
40, 60	An07g09330	1,4-beta-D-glucan celobiohidrolasa B	Procesos de catabolismo de glucano	3.2.1.91	3.9	48.2	100	73	0.86	CCD

*(ND: Datos no disponibles; SecP: SecretomeP >0.6 indica que las proteínas pueden ser secretadas por vías no convencionales; CCD: componente celular desconocido, Ext: extracelular, Int; intracelular; pl y PM determinados con AGD y UniProt; % de cobertura y % de identidad determinados con BlastP).

Tabla 9. Características de las proteínas identificadas a partir del secretoma de *A. brasiliensis* (continuación).

Concentración (g/L)	Nombre del gen	Nombre	Función biológica	No. EC	pl	PM (kDa)	% de cobertura	% de identidad	SecP	*Loc
20, 40, 60	An11g03340	Alfa-amilasa A tipo 1/2	Procesos de catabolismo de carbohidratos	3.2.1.1	4.0	55.2	100	100	0.85	Ext
40, 60	An15g02300	alfa-N-arabinofuranosidasa B	Procesos de metabolismo de L-arabinosa, Procesos de catabolismo de pectina	3.2.1.55	4.0	53.0	96	100	0.88	Ext Int
20, 40, 60	An18g03570	Beta-glucosidasa A	Procesos de catabolismo de carbohidratos	3.2.1.21	4.4	93.2	98	75	0.75	Ext Int
20, 40	An02g04900	Endopoligalacturonasa C	Procesos de catabolismo de pectina	3.2.1.15	6.8	37.8	72	100	0.52	Ext
40	An14g02760	Endoglucanasa A	Procesos de catabolismo de glucano y xiloglucano	3.2.1.4	4.3	25.9	100	72	0.87	CCD
20, 40, 60	An16g06800	Endoglucanasa B	Procesos de catabolismo de glucano	3.2.1.6	4.3	45.3	100	56	0.33	Ext
20	An03g05290	glucan endo-1,3-beta-glucosidasa egIC	Procesos de metabolismo de carbohidratos	3.2.1.58	4.1	46.3	84	97	0.61	Ext
20	An03g06220	1,3-beta-glucanosiltransferasa (gel3)	Procesos de metabolismo de carbohidratos	2.4.1.-	4.8	65.9	100	48	0.58	Ext
20, 40, 60	An10g00400	1,3-beta-glucanosiltransferasa (gel1)	Proceso de biosíntesis de beta-glucano de la pared del ascosporo, ensamblaje de prospóras tipo ascospora, respuesta celular a fármacos, formación de conidios, biosíntesis de la pared celular de tipo fúngico (1-> 3) -beta-D-glucano, organización de pared celular, respuesta al frío, respuesta al estrés salino	ND	4.5	48.5	100	70	0.40	Ext
20, 40, 60	An01g01540	Trehalasa ácida	Procesos de catabolismo de trehalosa, respuesta celular a desecación, etanol y congelamiento	3.2.1.28	4.6	116.2	100	100	0.79	Ext

*(ND: Datos no disponibles; SecP: SecretomeP >0.6 indica que las proteínas pueden ser secretadas por vías no convencionales; CCD: componente celular desconocido, Ext: extracelular, Int; intracelular; pl y PM determinados con AGD y UniProt; % de cobertura y % de identidad determinados con BlastP).

Tabla 9. Características de las proteínas identificadas a partir del secretoma de *A. brasiliensis* (continuación).

Concentración (g/L)	Nombre del gen	Nombre	Función biológica	No. EC	pl	PM (kDa)	% de cobertura	% de identidad	SecP	*Loc
2, 40, 60	An14g02470	Tripeptidil-peptidasa sed2	Procesos de proteólisis	3.4.14.9	5.4	65.7	73	100	0.76	CCD
40, 60	An14g04710	Endopeptidasa aspártica de tipo aspergillopepsina A	Proteólisis	3.4.23.18	4.2	41.3	100	53	0.80	Ext
20	An04g01230	Proteína ecm33	Patogénesis, respuesta celular a deficiencia de nutrientes, a fármacos, a estímulo biótico	ND	4.1	41.1	100	89	0.71	Ext
20, 40, 60	An10g00800	Purina nucleósido permeasa	Transporte de nucleósidos, transporte transmembrana	ND	4.6	43.6	100	100	0.90	Int
20	An16g08870	Triacil glicerol lipasa	Actividad hidrolasa	3.1.1.3	5.2	59.3	100	95	0.80	ND
20, 40, 60	An02g00190	Amidasa	Actividad amidasa	3.5.1.4	4.6	63.1	100	95	0.79	Intr
20, 40, 60	ipuA	Cadena A, estructura cristalina de isopululanasa	Actividad isopululanasa	3.2.1.57	4.8	61.5	100	83	0.78	Ext
20	An01g12550	mannosil-oligosacarido alfa-1,2-manosidasa 1B	Procesos de esporulación asexual, glicosilación ligada a N-terminal	3.2.1.113	4.6	55.9	67	100	0.49	Ext

*(ND: Datos no disponibles; SecP: SecretomeP >0.6 indica que las proteínas pueden ser secretadas por vías no convencionales; CCD: componente celular desconocido, Ext: extracelular, Int; intracelular; pl y PM determinados con AGD y UniProt; % de cobertura y % de identidad determinados con BlastP).

De las 30 proteínas identificadas, 4 son intracelulares, 2 están reportadas como intracelulares y extracelulares, de 5 no se encontró información sobre la localización y las 19 proteínas restantes fueron extracelulares.

La mitad de las proteínas identificadas son proteínas cuya función es metabolizar carbohidratos, se encontraron 5 proteínas que participan en procesos de oxidación-reducción. Únicamente se identificaron 2 proteínas con función de proteólisis y 2 con función de patogénesis, las seis proteínas restantes contaron con función diferente cada una (Fig.15).

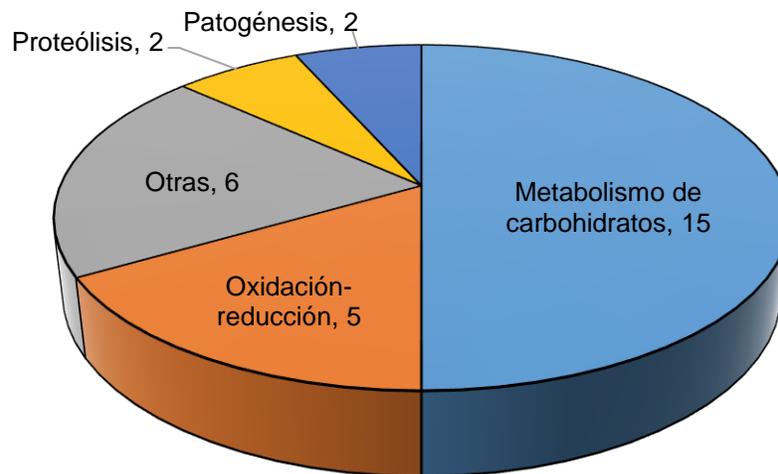


Figura 15. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a su función biológica.

Con respecto a la secreción de proteínas, 27 proteínas presentaron evidencia de tener secuencias de péptido señal; es decir, presentan evidencia de que son secretadas por la vía convencional a través del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y endosomas mediante el reconocimiento de secuencias específicas que señalizan que deben ser secretadas. La glicosidasa crf2, la endopeptidasa aspártica de tipo aspergillopepsina A y la cadena A: estructura cristalina de isopululanasa no presentaron evidencia de tener péptido señal. Sin embargo, con la base de datos “Secretome P 2.0 server” se encontró que pueden ser secretadas por vías no convencionales (Tabla 8).

El efecto de la concentración inicial de sacarosa en el secretoma de *A. brasiliensis* no se evaluó mediante un análisis de abundancia de las proteínas debido a que, durante la escisión del

mismo “spot” expresado en las tres concentraciones (20, 40 y 60 g/L), se seleccionó el más intenso para representar las tres concentraciones de sacarosa. Sin embargo, mediante el análisis de actividad enzimática reportado en la sección 9.4 se demostró el efecto de la concentración inicial de sacarosa sobre la actividad invertasa (primera actividad hidrolítica en el catabolismo de la sacarosa).

El metabolismo de la sacarosa juega un papel importante en el desarrollo de los microorganismos y su respuesta al estrés, principalmente por la generación de azúcares que son empleados como fuente de carbono para el crecimiento y la síntesis de diferentes compuestos como proteínas. Además, la sacarosa misma o sus productos de hidrólisis participan como señal en la regulación de diversos genes (Yong-Ling, 2014).

De hecho, el consumo de glucosa (producto de la hidrólisis de sacarosa) puede ocurrir por dos vías: degradación catabólica a través de la vía de la glucólisis o por oxidación extracelular mediada por la glucosa oxidasa (Lu y col., 2010).

A continuación, se presenta una ruta general del metabolismo de la sacarosa donde se señalan algunas de las enzimas identificadas por LC-MS/MS. Se diseñó con base en la ruta metabólica general de metabolismo de sacarosa y almidón propuesta por la base de datos KEGG para *A. niger*. La sacarosa es hidrolizada por la inulinasa produciendo D-fructosa y D-glucosa. La D-fructosa es transformada a D-glucosa-6P y posteriormente se transforma en glucosa uracilo-difosfato (UDP-glucosa), que participa como sustrato en el metabolismo de azúcares-nucleótidos y puede ser utilizado como precursor de lipopolisacáridos y glicoesfingolípidos (Volke y col., 2016). La D-glucosa es metabolizada por la vía de la glucólisis o puede ser transformada a almidón y trehalosa que, al final son hidrolizados por la glucoamilasa y la trehalasa respectivamente, dando como producto nuevamente D-glucosa (Fig. 16).

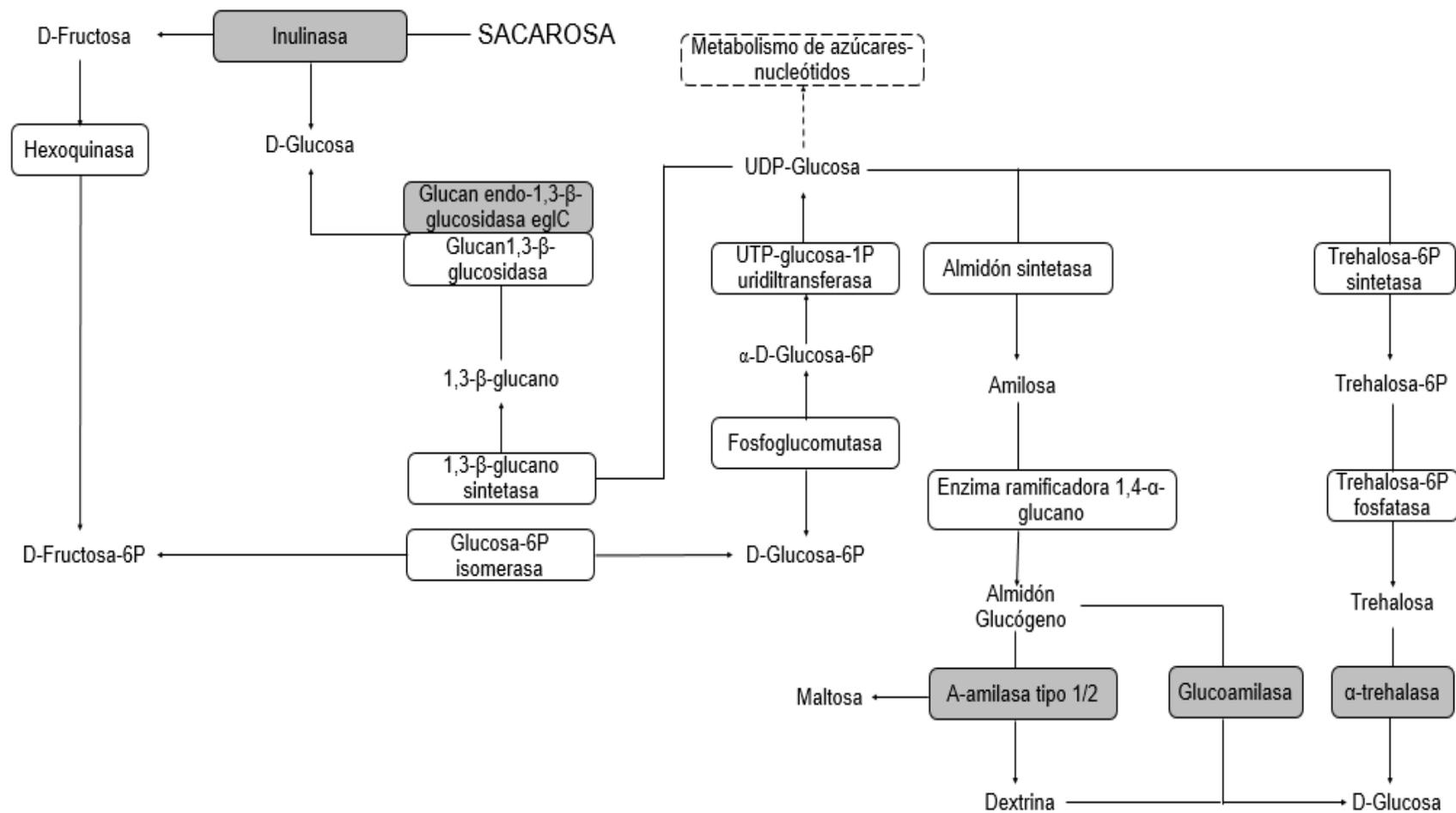


Figura 16. Ruta general del metabolismo de sacarosa por *A. brasiliensis*. Recuadros sombreados corresponden a enzimas del secretoma identificadas por LC-MS/MS.

9.8.1. Proteínas que participan en el metabolismo de carbohidratos

Algunas de las proteínas que se identificaron, son enzimas que se sintetizan a nivel constitutivo y que participan en el metabolismo de polisacáridos, como la glucoamilasa (GlaA) y la alfa amilasa (AamA) con punto isoeléctrico (pI) de 4.0 (ambas) y peso molecular teóricos de 68.3 y 55.2 kDa, respectivamente. Estas dos enzimas catalizan la hidrólisis de almidón y previamente se reportaron dos isoformas de alfa amilasa y tres isoformas de glucoamilasa por Carrillo y col. (2016) en un estudio del secretoma de *A. niger* 10 con pI entre 4-5 y 3-5 y peso molecular de 50 y 75-100 kDa, respectivamente. La secreción de diferentes isoformas de estas dos enzimas está influenciada por la concentración inicial de sustrato (120 g/L glucosa) en el medio de cultivo además de modificaciones postraduccionales (Carrillo y col., 2016). La xilanasa es una enzima que participa en la hidrólisis del xilano. En 1988, Wong y col. clasificaron las xilanasas de dos formas, de acuerdo a sus productos de hidrólisis: xilanasa que libera arabinosa y xilanasa que no libera arabinosa. Los hongos son capaces de producir estos dos tipos de xilanasa; aunado a esto, los elevados niveles de producción de xilanasa los hace importantes a nivel industrial (Polizeli y col., 2005). En este trabajo se encontraron dos isoformas de xilanasa, la endo-1,4-beta-xilanasa F1 y la endo-1,4-beta-xilanasa A (XynA y Xyn B) con punto isoeléctrico y peso molecular teóricos de 6.6, 35.5 kDa y 5.1, 24.0 kDa, respectivamente. Ambas pertenecen a las xilanasas que no liberan arabinosa como producto de la hidrólisis.

La inulinasa es una isoforma de la invertasa con actividad hidrolítica sobre inulina; sin embargo, en presencia de sacarosa presenta actividad invertasa. Se ha demostrado que *A. brasiliensis* en CMS sintetiza tres isoformas de inulinasa y dos isoformas de invertasa. Todas estas isoformas difieren en el peso molecular, debido posiblemente al grado de glicosilación de cada enzima (Nava, 2016). En el presente trabajo únicamente se encontró una inulinasa con peso molecular teórico de 59.1 kDa y punto isoeléctrico de 5.1. De igual forma se identificaron otras enzimas previamente reportadas: β -glucosidasas (Volke y col., 2016; Ferreira de Oliveira y col., 2011), trehalasa (Nava, 2016) que participan en el metabolismo de sacarosa y polisacáridos. La isopulalanasa (IpuA) es otra de las enzimas identificadas que ha sido reportada con aplicación en industrias de jarabes de glucosa y maltosa por su capacidad para degradar almidón a glucosa o maltosa (Malviya y col., 2010).

9.8.2. Proteínas que participan en reacciones de oxidación-reducción

Las enzimas Glucosa oxidasa (GoxC) y catalasa R (CatR) fueron identificadas en el secretoma de *A. brasiliensis* como enzimas intracelulares. Sin embargo, se encontró que éstas pueden ser secretadas por vías no convencionales (Tabla 9). Se trata de enzimas que participan en procesos de oxidación-reducción que han sido reportadas en el secretoma de *A. niger* por Lu y col. (2010), y por Ferreira de Oliveira y col. (2011) cuya presencia extracelular puede ser justificada porque cuando la glucosa es oxidada a ácido gluónico que se metaboliza a través de la vía de las pentosas fosfato se requiere la enzima GoxC. Como uno de los productos de dicha reacción se produce peróxido de hidrógeno, que es degradado por la catalasa, evitando así el daño oxidante en las células.

También se identificó sulfidril oxidasa (Sox), lo que sugiere la presencia de glutatión reducido que fue oxidado a glutatión disulfuro, con la liberación de peróxido de hidrógeno (Lu y col., 2010; Ferreira de Oliveira y col., 2011).

9.8.3. Proteínas con función de patogénesis

La glicosil fosfatidil inositol (GPI) proteína ecm33 y la glicosilasa crf2 han sido reportadas en el secretoma de *A. terreus* y *A. brasiliensis* como proteínas ancladas a la pared celular (Han y col., 2010; Volke y col., 2016). En *C. albicans* se han reportado como componentes de la membrana plasmática con función de patogénesis, respuesta a estímulos bióticos y respuesta a deficiencia de nutrientes, mientras que en *A. fumigatus* se han reportado con función de respuesta a fármacos.

9.8.4. Proteínas con función proteolítica

En el secretoma de *A. brasiliensis* se identificaron dos proteasas, incluyendo la endopeptidasa aspártica de tipo aspergillopepsina A (PepA) y la Tripeptidil-peptidasa sed2. Previamente se encontró que la PepA fue secretada por *A. niger* cuando fue cultivado con maltosa como fuente de carbono (Lu y col., 2010). Por su parte, Oda y col. (2006) reportaron que *A. oryzae* secreta dicha enzima únicamente en condiciones de CMS. Además, se demostró que esta enzima es de las proteasas más abundantes que secreta *A. niger* cuando existe deficiencia de nutrientes en el medio de cultivo (Braakma y col., 2010).

9.8.5. Proteínas bajo expresadas

De las 30 proteínas identificadas, 3 se encontraron bajo-expresadas con el aumento de la concentración de sacarosa: glucoamilasa (GlaA), glucosa oxidasa (GoxC) y endopoligalacturonasa C (PgaB). La GlaA y la GoxC fueron encontradas en múltiples spots: SSP2002, SSP3002, SSP4202, SSP8301 y SSP7202, posiblemente debido a modificaciones postraduccionales que originaron isoformas de las enzimas, o a modificaciones químicas durante el procesamiento de las muestras que originaron ruptura entre aminoácidos de las enzimas (Duquesnoy y col., 2009).

Se ha reportado que la glucosa juega dos papeles en la síntesis de enzimas degradadoras de polímeros; por un lado, como producto de la hidrólisis del almidón, puede inducir la expresión del gen *glaA* que codifica para la glucoamilasa. Sin embargo, al ser un carbohidrato fácilmente metabolizable y al acumularse en el medio de cultivo (CML) en concentración mayor a 3.6 g/L se convierte en represor del gen *glaA* de *A. niger* (Ganzlin y Rinas, 2008). También está reportado que la síntesis de glucoamilasa extracelular por *A. terreus* en CML es reprimida cuando la concentración de glucosa en el medio es mayor a 2.2 g/L (Ghosh y col., 1990). En la Tabla 8 se aprecia que la intensidad de los spots mencionados en esta sección disminuye de forma gradual al aumentar la concentración de sacarosa en el medio. Estos resultados indican que la síntesis de la glucoamilasa fue reprimida por la acumulación de glucosa en el medio.

Por otro lado, la bajo-expresión de la GoxC sugiere la regulación metabólica de esta enzima. Lo anterior sugiere que la glucosa del medio no fue metabolizada en el exterior de la célula (oxidada a ácido gluónico e incorporada a la vía de pentosas fosfato). La vía más probable de metabolismo de la glucosa es la intracelular, para lo cual, ésta es fosforilada a D-glucosa-6P y en este punto pudo ser metabolizada por la vía de la glucólisis para producir energía (ATP) o por la vía de las pentosas fosfato dando como producto ribosa-5P empleada para la síntesis de ácidos nucleicos (Volke y col., 2016).

La PgaB también fue encontrada en múltiples spots (SSP5402, SSP6201 y SSP6401) que difieren en su ubicación horizontal; es decir, se encuentran en peso molecular similar, pero difieren en el punto isoeléctrico, lo que significa que probablemente se trate de isoformas de

esta enzima. La bajo-expresión sugiere que la acumulación de glucosa en el medio reprime la síntesis de esta enzima, ya que está reportado que la producción de poligalacturonasa de *Aspergillus sp.* En CML disminuye cuando la concentración de glucosa en el medio es superior a 5 g/L (Aguilar y Huitron, 1987).

10. Conclusiones

- La medición en línea de la producción de CO₂ por respirometría permitió determinar un tiempo de muestreo del secretoma de *A. brasiliensis* tal que permitiera un estado fisiológico definido. La tasa máxima de producción de CO₂ fue tomada como criterio para garantizar la reproducibilidad del muestreo de los extractos proteicos extracelulares destinados al análisis del secretoma.
- Concentraciones de sacarosa mayores a 40 g/L, causaron una disminución en la tasa de producción de CO₂, producción de CO₂, tasa específica de producción de CO₂ y la producción de biomasa.
- Bajo las condiciones estudiadas de CML se demostró que la invertasa de *A. brasiliensis* es un producto asociado al crecimiento.
- El efecto de la elevada concentración de sacarosa se reflejó en los niveles de actividad invertasa, los cuales disminuyen con concentraciones de sacarosa superiores a 20 g/L.
- La abundancia de proteínas de alto peso molecular secretadas disminuye conforme aumenta la concentración de sacarosa en el medio.
- La mitad de las proteínas secretadas por *A. brasiliensis* son enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos siendo sintetizadas a nivel constitutivo, con excepción de la inulinasa que se induce por la presencia de sacarosa.
- *A. brasiliensis* resultó ser productor de Catalasa R extracelular haciéndose esta enzima presente cuando es cultivado con sacarosa en 20, 40 y 60 g/L.
- Las enzimas glucoamilasa (GlaA), glucosa oxidasa (GoxC) y endo-poligalacturonasa C (PgaB) resultaron fuertemente bajo expresadas con el incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

11. Referencias

- Aguilar, G. & Huitron, C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme and Microbial Technology*, 9 (11), 690-696. DOI: 10.1016/0141-0229(87)90129-3.
- Alegre, A.C., Texeira, M.L., Terenzi H.F., Jorge, J.A. & Souza, L.H. (2009). Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 (3), 612-622. DOI: 10.1590/S1517-83822009000300025.
- Alves, J.N., Joao, A. & Luis, H.S.G. (2013). Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emericela nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. *Advances in Microbiology*, 3 (5), 421-429, DOI: DOI: 10.4236/aim.2013.35057.
- Andjelković, U., Milutinović-Nikolić, A., Jović-Jovičić, N., Banković, P., Bajt, T., Mojović, Z., Vujčić, Z. & Jovanović, D. (2015). Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellite nanoclays. *Food Chemistry*, 168, 262-269. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.055.
- Aranda, C. Robledo, A., Loera, O., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez, R. & Aguilar, C.N. (2006). Fungal Invertase Expression in Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 229–233.
- Arencibia, D., Gámez, R. and Rosario, L. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos*. 1st ed. [ebook] Finlay Ediciones, pp.1-14. Available at: https://www.researchgate.net/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos [Accessed 10 Jul. 2017].
- Aro, N., Pakula, T. & Penttila, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell Wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (4), 719-739. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.11.006.

Ashokkumar, B., Kayalvizhi, N. & Gunasekaran P. (2001). Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 36 (4), 331-338. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00204-7.

Aslam, A., Haq, U.I. & Ali, S. (2013). Purification and characterization of two invertases from mutant strain of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Pakistan Journal of Botany*, 45 (1), 285-291

Awad, G.E., Amer, H., El-Gammal, E.W., Esawy, M.a. & Elnashar, M.M. (2013). Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. *Carbohydrate Polymers*, 93 (2),740–746. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.12.039.

Aziz, S., Jalal, F., Nawaz, M., Niaz, B., Ali, F., Memon, M., Latif, F., Nadeem, S. & Rajoka, M. (2011). Hyperproduction and thermal characterization of a novel invertase from a double mutant derivative of *Kluyveromyces marxianus*. *Food Technology and Biotechnology*, 49 (4), 465–73.

Bhatti, H.N., Asgher, M., Abbas, A., Nawaz, R. & Sheikh, M.A. (2006). Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13), 4617-4623. DOI: 10.1021/jf053194g.

Belcarz, A., Ginalska, G, Lobarzewski, J. & Penel, C. (2002). The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594 (1), 40-53. DOI: 10.1016/S0167-4838(01)00279-5.

Beroviè, M. & Popovic, M. (2001). Characterisation of gas mixed bioreactors in submerged citric acid fermentation. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 15 (2), 65–69.

Boddy, L.M., Bergès, T., Barreau, C., Vainstein, M.H., Dobson, M.J. & Peberdy, J.F. (1993). Purification and Characterization an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Current Genetics*. 24 (1-2), 60-66. DOI: 10.1007/BF00324666.

Braaksma, M., Martens-Uzunova, E.S., Punt, P.J. & Schaap, P.J. (2010). An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. *BMC Genomics*, 11, 584. DOI: 10.1186/1471-2164-11-584.

Candiano G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. & Righetti, P.G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25 (9), 1327-1333. DOI: 10.1002/elps.200305844.

Callegari, E. & Navarrete, M. (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>.

Carrillo-Sancen, G., Carrasco-Navarro, U., Tomasini-Campocoso, A., Corzo, G., Pedraza-Escalona, M. & Favela-Torres, E. (2016). Effect of glucose as a carbon repressor on the extracellular proteome of *Aspergillus niger* during the production of amylases by solid state cultivation. *Process Biochemistry*, 51 (12), 2001-2010. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.09.001.

Chávez, F.P., Rodríguez, L., Díaz, J., Delgado, J.M. & Cremata, J.A. (1997). Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis* comparison with natural and recombinant yeast invertases. *Journal of Biotechnology*, 53 (1), 67-74. DOI: 10.1016/S0168-1656(97)01663-5.

Dezsi, C.K. (2011). Optimization of invertase production by yeast strains from the genus *Saccharomyces*. *Acta Univ Cibiniensis Ser E: Food Technology.*, 15 (2), 11-18.

Dhananjay, S.K. & Mulimani, V.H. (2008). Purification of α -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology letters*, 30 (9), 1565-1569. DOI: 10.1007/s10529-008-9722-5.

Duquesnoy, I., Pascale, G., Nadaud, I., Brandlard, G., Piquet-Pissaloux, A. & Ledoigt, G. (2009). Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As(V) and As(III) induced stress using a proteomics approach. *Plant science*, 176 (2), 206-213. DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.10.008.

Esawy, M.A., Kansoh, A.L., Kheiralla, Z.H., Ahmed, H.E., Kahil, T.A.K. & El-Hameed, E.K. (2014). Production and Immobilization of Halophilic Invertase Produced from Honey Isolate *Aspergillus niger* EM77 (KF774181). *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 36-45. DOI: 10.6000/1927-3037.2014.03.02.1.

Favela-Torres, E. Cordova-López, J., García-Rivero, M. & Gutierrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, 33 (2), 103-107. DOI: 10.1016/S0032-9592(97)00032-0.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. & Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 (4926), 64–71. DOI: 10.1126/science.2675315.

Ferreira de Oliveira J.M.P., Passel, M.W.J., Schaap, P.J. & Graaff, L.H. (2011) Proteomic Analysis of the Secretory Response of *Aspergillus niger* to D-Maltose and D-Xylose. *PLoS ONE*, 6 (6): e20865. DOI: 10.1371/journal.pone.0020865.

Fernández, R., Maresma, B., Juárez, A. & Martínez, J. (2004). Production of fructooligosaccharides by β fructofuranosidase from *Aspergillus sp* 27H. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79 (3), 268-272. DOI: 10.1002/jctb.967.

Ganzlin, M. & Rinas, U. (2008). In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled biorreactor cultivation techniques. *Journal of Biotechnology*, 135 (3), 266-271. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.04.005.

García-Serralde, R.I & Prado-Barragán L.A. (s/a). Métodos de conservación de cepas de la planta de fermentación en medio sólido. Universidad Autónoma Metropolitana.

Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. & Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21 (6), 1037-1053. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1037::AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V

Gosh, A., Chatterjee, B. & Das, A. (1990). Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *Microbiology*, 136, 1307-1311, DOI: 10.1099/00221287-136-7-1307.

Gracida Rodríguez, J., Favela-Torres, E., Prado-Barragán, A., Huerta-Ochoa, S. and Saucedo-Castañeda, G. 2005. Production of Invertases. *Enzyme Technology*. Editors, C. Webb, C.R. Soccol and C. Larroche. Asiatech Publishers, New Delhi. pp. 449-463

Guimaraes, L.H.S., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L. & Jorge, J.A. (2007). Production and characterization of a thermostable extracellular β -d-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 42 (1), 52–57. Doi: 10.1016/J.Enzmictec.2007.07.021.

Hansen, G. H., Lüberck, M., Frisvad, J.C., Lüberck, P.S. & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50 (9), 1327-1341. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.05.017.

Haq, I. & Ali, S. (2005). Invertase production from a hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from dates. *Pakistan Journal of Botany*, 37 (3), 749-759.

Harvey, M. & McNeil, B. (1993). Liquid Fermentation Systems and Product Recovery of *Aspergillus*. *Biotechnology Handbooks 7*. New York: *Smith JE: Plenum Press*, pp. 141-176. DOI: 10.1007/978-1-4615-2411-3_5.

Hashizume, H., Tanase, K., Shiratake, K., Mori, H. & Yamali, S. (2003). Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese peer fruit. *Phytochemistry*, 63 (2), 125-129. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00107-9.

Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B. & Xu, S. (2000) Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS 0023. *Journal of Biotechnology*, 81 (1), 73–84. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00277-7.

Karas, M. & Hillenkamp, F. (1998). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60 (20), 2299-2301. DOI: 10.1021/ac00171a028.

Kaur, N. & Sharma, A.D. (2005). Production, optimization and characterization of extracellular invertase by an actynomicete strain. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 64 (7), 515-519.

Kim, Y., Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2007). Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 44 (9), 886-895. DOI: 10.1016/j.fgb.2006.12.001.

Klein, R.D., Deibel, M.R., Sarcich, J.L., Zurcher-Neely, H.A., Reardon, I.M. & Heinrikson, R.L. (1989). Purification and Characterization of Invertase from a Novel Industrial Yeast, *Schwanniomyces Occidentalis*. *Preparative Biochemistry*, 19 (4), 293-319. DOI: 10.1080/10826068908544919.

Kniemeyer, O. (2011). Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics*, 11 (15), 3232-3243. DOI: 10.1002/pmic.201100087.

Krüger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Gluckmann, M. & Karas, M. (2000). Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Analytical Chemistry*, 73 (24), 5812-5821. DOI: 10.1021/ac010827r.

Krull, R., Wucherpfenning, T., Esfandabadi, M.E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D.C., Kampen, I. & Kwade, A. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 163 (2), 112-123. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.024.

Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V. & Yadavilli, K.S. (2013). Invertase and its applications - A brief review. *Journal of pharmacy research*, 7 (9), 792-797. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.07.014.

- Kurakake, M., Ogawa, K., Sugie, M., Takemura, A., Sugiura, K. & Komaki, T. (2008). Two Types of β -Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 591-596. DOI: 10.1021/jf072762k.
- Kurakake, M., Masumoto, R., Maguma, K., Kamata, A., Saito, E., Ukita, N. & Komaki, T. (2010). Production of Fructooligosaccharides by β -Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (1), 488-492. DOI: 10.1021/jf903303w.
- Lilley, K.S., Razzaq, A. & Dupree, P. (2002). Two dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 (1), 46–50. DOI: 10.1016/S1367-5931(01)00275-7.
- Linde, D., Macias, I., Fernández-Arrojo, L., Plou, F.J., Jiménez, A. & Fernández-Lobato, M. (2009). Molecular and Biochemical Characterization of a β -Fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (4), 1065-1073. DOI: 10.1128/AEM.02061-08.
- Lu, X., Sun, J., Nimtz, M., Wissing, J., Zeng, A.P. & Rinas, U. (2010). The intra and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microbial Cell Factories*, 9 (23). DOI: 10.1186/1475-2859-9-23.
- Luedeking, R. & Piret, E.L. (1959). A kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1 (4). 393-412. DOI: 10.1002/jbmt.390010406.
- Malakar, R., Tiwari, A. & Malviya, S.N. (2010). Pullulanase: A potential enzyme for industrial application. *International Journal of Biomedical Research*, 1 (2). 10-20.
- Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E. & Burton, A.L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1 (2), 127-132. DOI: 10.1016/0003-2697(60)90004-X.
- Mishra, N.C. (2010). Introduction to Proteomics: Principles and Applications. *Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, ProQuest ebrary*, pp. 3-26. Web. 24 February 2016.

Muramatsu, K., Onodera, S., Kikuchi, M. & Shiomi, N. (1993). Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57 (10), 1681-1685. DOI: 10.1271/bbb.57.1681.

Nadeem, H., Rashid, M.H., Riaz, M., Asma, B., Javed, M.R. & Perveen, R. (2009). Invertase from hyper producer strain of *Aspergillus niger*: physiochemical properties, thermodynamics and active site residues heat of ionization. *Protien Peptide Letters*, 16 (9), 1098–1105. DOI: 10.2174/092986609789055322

Nadeem, H., Rashid, M.H., Siddique, M.H., Azeem, F., Muzammil, S., Javed, M.R., Ali, M.A., Rasul, I. & Riaz, M. (2015). Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process Biochemistry*, 20 (8), 1202–1210. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.04.015.

Naumoff, D.G. (2001). β -Fructosidase Superfamily: Homology With Some α -L-Arabinases and β -D-Xylosidases. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 42 (1), 66-76. DOI: 10.1002/1097-0134(20010101).

Nava, S.G & col. (2016). *Análisis comparativo del secretoma de A. brasiliensis cultivado en medio sólido con diferentes concentraciones de sacarosa*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M., Bhat, M.K. & Hoschke, Á. (2005). Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochemistry*, 40 (7), 2461-2466. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.09.012.

Ning, Y., Wang, J., Chen, J., Yang, N., Jin, Z. & Xu, X. (2010). Production of neofructooligosacharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology*, 101 (19), 7472-7478. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.026.

O'Mullan, P.J., Chase, T. & Eveleigh, D.E. (1992). Purification and some properties of extracellular Invertase B from *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 38 (3), 341–346.

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. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (5), 3448-3457. DOI: 10.1128/AEM.72.5.3448-3457.2006.

O'Donnell, D. L., Wang, J., Xu, D., Ridway, T., Gu, M., & Moo-Young. (2001). Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 187-193.

Olusanya, O. & Olutiola, P.O. (1994). The purification and characterization of intra-cellular invertase obtained from pathogenic *Escherichia coli*. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 23 (3), 291–299.

Pandey, A. (1992). Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. *Process Biochemistry*, 27 (2), 109-117. DOI: 10.1016/0032-9592(92)80017-W.

Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22 (3), 189-259. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2003.09.005.

Paper, J. M., Scott-Craig, J.S., Adhikari, N.D., Cuomo, C.A. & Walton, J.D. (2007). Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics*, 7 (17), 3171-3183. DOI: 10.1002/pmic.200700184.

Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, 61 (1), 100-111. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770.

Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M. & Bañó, C. (2007). Fundamentos de Bioquímica. *Valencia España: Universidad de Valencia*, pp. 92-93.

Pessoni, R.A., Braga, M.R. & Figueiredo-Ribeiro, R.C. (2007). Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. *Journal of Mycology*, 99 (4), 493-503. DOI: 10.1080/15572536.2007.11832543.

Plascencia-Espinosa, M., Santiago-Hernández, A., Pavón-Orozco, P., Vallejo-Becerra, V., Trejo-Estrada, s., Sosa-Peinado, A., Benitez.Cardoza, C.G. & Hidalgo-Lara, M.E. (2014).

Effect of deglycosylation on the properties of thermophilic invertase purified from the yeast *Candida guilliermondii* Mplla. *Process Biochemistry*, 49 (9), 1480-1487. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.05.022.

Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A & Amorim, D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 (5), 577-591. DOI: 10.1007/s00253-005-1904-7.

Prado-Barragán & col. (1999). Avances en Purificación y Aplicación de enzimas en Biotecnología. *Editorial Universidad Autónoma Metropolitana*, Unidad Iztapalapa. México.

Qureshi, A.S., Khushk, I., Bhutto, M.A., Dahot, M.U., Hap, I., Bano, S. & Iqbal., H. (2012). Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophilus* EFRL 03. *African Journal of Biotechnology*, 11 (47), 10736-10743. DOI: 10.5897/AJB11.4303.

Rashad, M.M. & Nooman, M.U. (2009). Production, purification and characterization of extracellular invertase from NRRL Y-12632 by solid-state fermentation of red carrot residue. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3 (3), 1910-1919.

Roitsch, T. & González, M.C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*, 9 (12), 606-613. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.10.009.

Romero-Gómez, S.J., Augur, C. & Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 22 (15), 1255-1258. DOI: 10.1023/A:1005659217932.

Rubio, C.M. & Maldonado, C.M. (1995). Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*, 31 (2), 80–83.

Rubio, M. Runco, R. & Navarro, A. (2002). Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 61 (6), 605–609. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00336-9.

Rubio, M.C. & Navarro, A.R. (2006) Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (4), 601–606. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.011.

Rustiguel, C., Jorge, J.A. & Guimarães, L.H. (2015). Characterization of a thermo-tolerant mycelial β -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4 (3), 362–369. DOI: 10.1016/j.bcab.2015.05.004.

Rustiguel, C., Oliveira, A.H., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. & Guimarães, L.H. (2011). Biochemical properties of an extracellular β -d-fructofuranosidase II produced by *Aspergillus phoenicis* under solid-state fermentation using soy bran as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology* 14(2):1–10. DOI: 10.2225/vol14-issue2-fulltext-1.

Salgado-Bautista, D.A. y col. (2015). *Análisis comparativo del secretoma de A. brasiliensis obtenido con diferentes concentraciones de glucosa en medio sólido*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

Shafiq, K., Ali, S. & Haq, I. (2004). Kinetic analysis of nutritional strategies for invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* kr 18. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 1 (1), 25-30.

Shankar, T., Thangamathi, P., Rama, R. & Sivakumar, T. (2013). Optimization of invertase production using *Saccharomyces cerevisiae* MK under varying cultural conditions. *International Journal of Biochemistry Biophysics*, 1(3), 47–56. DOI: 10.13189/ijbb.2013.010301.

Shevchenko A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V. & Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1 (6), 2856-2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.

Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C. & Pandey, Ashok. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (7), 541-549. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.010.

Sivakumar, T., Ravikumar, M., Prakash, M. & Shanmugaraju, V. (2013). Production of extracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from grapes. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 1 (2), 72-83.

Soto-Cruz, N., Favela-Torres, E. & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of Growth, Lactate Consumption, and Volatile Fatty Acid Production by *Megasphaera elsdenii* Cultivated in Minimal and Complex Media. *Biotechnology Progress*, 18 (2). 193-200. DOI: 10.1021/bp010189y.

Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S. & van Dijk, J.M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3), 515-547. DOI: 10.1128/MMBR.64.3.515-547.2000.

Uma, C., Gomathi, D., Muthulakshmi, C. & Gopalakrishnan, V.K. (2010). Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. *Advances Biology Research*, 4 (1), 31–36.

Uma, C., Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M. & Palamiswamy, M. (2012). Production and properties of invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SmF using pomegranate peel waste as substrate. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 144 (2), 605-611. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60282-2.

Vaisntein, M. & Peberdy, J. (1991). Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. *Journal of General Microbiology*, 137 (2), 315-321 DOI: 10.1099/00221287-137-2-315.

Van Schie, P.M. & Fletcher, M. (1999). Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (11), 5082-5088.

Vargas, W.A. & Salerno, G.L. (2010). The Cinderella story of sucrose hydrolysis: Alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles. *Plant Science*, 178 (1), 1–8. DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.09.015.

Veana, F., Aguilar, C.N., Viader-Salvadó, J.M. & Rodríguez-Herrera, R. (2011). Invertasa del género *Aspergillus* y su impacto biotecnológico. *Biotecnología*, 15 (1), 11-29.

Veana, F., Aguilar, C. N. & Rodríguez-Herrera, R. (2011). Kinetic studies of invertase production by xerophilic *Aspergillus* and *Penicillium* strains under submerged culture. *Micología Aplicada Internacional*, 23 (2), 37-45.

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S.J., Díaz-Godínez, G. & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering*, 13 (2-3), 157-167. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00128-6.

Volke-Sepulveda, T., Salgado-Bautista, D., Bergmann, C., Wells, L., Gutierrez-Sanchez, G. & Favela-Torres, E. (2016). Secretomic Insight into Glucose Metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in Solid-State Fermentation. *Journal of Proteome Research*, 15 (10), 3856-3871. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00663.

Walker, J.M. (2009). *Methods in Molecular Biology*. Life sciences. Göttingen , Germany: *Humana Press*, pp 6-11. DOI: 10.1007/978-1-4939-3106-4.

Wallis, G.L.F., Hemming, F.W. & Peberdy, J.F. (1997). Secretion of two β -fructofuranosidases by *Aspergillus niger* growing in sucrose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 345 (2), 214–222. DOI: 10.1006/abbi.1997.0228.

Wesley, E. & Donald, F. (1983). Purification and properties of the β -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *FEBS Letters*, 160 (1-2), 16-20. DOI: 10.1016/0014-5793(83)80927-2.

Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M. y Fenn, J.B. (1985). Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* 57 (3), 675–679. DOI: 10.1021/ac00280a023.

Winter, H. & Huber, S.C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 35 (4), 253–289. DOI: 10.1080/10409230008984165.

Workman, M., Andersen, M. R., & Thykaer, J. (2013). Integrated Approaches for Assessment of Cellular Performance in Industrially Relevant Filamentous Fungi. *Industrial Biotechnology*, 9 (6), 337-344. DOI: 10.1089/ind.2013.0025.

Xiang, L., Le, R.K., Bolouri-Moghaddam, M.R., Vanhaecke, M., Lammens, W., Rolland, F. & Van den, E.W. (2011). Exploring the neutral invertase–oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62 (11), 3849-3862. DOI: 10.1093/jxb/err069.

Xu, Z.W., Li, Y.Q., Wang, Y.H., Yang, B. & Ning, Z.X. (2009). Production of β -fructofuranosidase by *Arthrobacter sp.* and its application in the modification of stevioside and rebaudioside A. *Food Technology and Biotechnology*, 47 (2), 137-143.

Yong-Ling, R. (2014). Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 33-67. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040251.

Yoon, M.H., Choi, W.Y., Kwon, S.J. & Yi, S.H. (2007). Purification and properties of intracellular invertase from alkalophilic and thermophilic *Bacillus cereus* TA-11. *Journal of Applied Biology and Chemistry*, 50 (4):196–201.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00240

Matricula: 2153804170

ANALISIS COMPARATIVO DEL SECRETOMA DE *Aspergillus brasiliensis* OBTENIDO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA
DR. GERARDO CORZO BURGUETE
DR. RICARDO HERNANDEZ MARTINEZ
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO



CARLOS GUERRERO URRUTIA
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
DE: CARLOS GUERRERO URRUTIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

VOCAL

DR. GERARDO CORZO BURGUETE

VOCAL

DR. RICARDO HERNANDEZ MARTINEZ

SECRETARIO

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO