



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

**Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis*
obtenido en cultivo líquido y sólido**

TESIS

Para obtener el grado de doctor en biotecnología

PRESENTA

M. en B. Daniel Alfonso Salgado Bautista

Director:

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores:

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Ciudad de México a 10 de julio del 2020

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

**Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis*
obtenido en cultivo líquido y sólido**

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR:

A handwritten signature in blue ink, consisting of a long horizontal stroke followed by a complex, looped flourish.

Dr. Ernesto Favela Torres

Director de tesis

AGRADECIMIENTOS.

Al gran dador de vida por darme la oportunidad de existir.

A mi esposa Juana por estar a mi lado, motivándome siempre a dar lo máximo en todo que me proponga a realizar.

A Ernesto Favela por su invitación, ya hace muchos años, para formar parte del equipo de la pp4, agradezco tu paciencia y tus enseñanzas.

A la Dra. Tania, Dr. Figueroa y Dr. Ulises por sus consejos y comentarios durante el desarrollo de este trabajo, me enseñaron a trabajar en equipo.

Al Dr. Callegari, por la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, y agradezco a su familia por recibirnos con los brazos abiertos.

A los pedritos por pasar un buen rato de distracción.

Y a todos los compañeros que me han enseñado con sus comentarios durante toda mi formación.

RESUMEN

Aspergillus brasiliensis tiene una alta similitud con *Aspergillus niger*, productor de ácido cítrico y de una amplia gama de enzimas; lo que lo hace un microorganismo de interés industrial. Generalmente, la caracterización de diversos microorganismos se realiza en cultivo líquido. El cultivo sólido presenta ventajas sobre el cultivo líquido, como: baja represión catabólica y menor inhibición por sustrato, pero la mayoría de los estudios comparativos se han enfocado en proteínas específicas, generalizando los resultados para diversas condiciones. Es por esto, que se caracterizó el secretoma de *A. brasiliensis* en ambos sistemas de cultivo para ampliar el panorama de los procesos que se realizan en la célula a partir de todas las proteínas expresadas en un tiempo y condición determinada. Se usó glucosa a diferentes concentraciones, para evitar la inducción de proteínas por azúcares específicos, permitiendo identificar aquellas proteínas que participan en el crecimiento a altas concentraciones de sustrato. En la primera sección del escrito, se presenta el efecto de la concentración del medio sobre las variables analizadas. Los valores de los parámetros cinéticos de la producción de CO₂ fueron mayores en cultivo sólido, y a su vez, la producción de proteína se relacionó con el nivel de ramificación de las hifas. El secretoma fue más complejo en cultivo sólido que en cultivo líquido, identificando 242 y 62 proteínas, respectivamente; y clasificadas como únicas, abundantes no reguladas y reguladas. El primero grupo constó de 17 y 87 proteínas en cultivo líquido y sólido, respectivamente. En el segundo grupo, el número de proteínas abundantes no reguladas fue mayor en cultivo líquido (22) que en cultivo sólido (9). Y en el último grupo, 146 proteínas se regularon por aumentar la concentración de glucosa en cultivo sólido, y 23 proteínas en cultivo líquido. También, las proteínas se clasificaron por su metabolismo/función principal, sobresaliendo proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos y redox, principalmente en cultivo sólido. De igual manera, un alto número de proteínas intracelulares se identificó en cultivo sólido, éstas podrían ser proteínas *moonlighting* y candidatas para el estudio de mecanismos de secreción no convencional. En una segunda sección, la comparación de la ramificación y la concentración de proteína de ambos cultivos con 60 g/L, no mostró diferencias significativas, sin embargo, el número de proteínas en cultivo sólido incrementó 1.4 veces. Por lo tanto, *A. brasiliensis* secreta un complejo sistema de proteínas que disminuyen las condiciones de estrés, optimizan el crecimiento y remodelamiento de la pared celular, así como, aquellas que permiten incrementar la secreción de proteínas, ya sea por vía convencional o no convencional en cultivo sólido, mientras que, en cultivo líquido, las proteínas secretadas sólo permiten el mantenimiento de la célula.

ABSTRACT

Aspergillus brasiliensis has higher similarity with *Aspergillus niger*, producer of citric acid and a wide range of enzymes; making this microorganism of industrial interest. Generally, the characterization of diverse microorganisms is carried out by submerged fermentation. Solid-state fermentation presents advantages over submerged fermentation, such as: lower carbon catabolite repression and substrate inhibition, but the majority of comparative studies have been focused on specific proteins, generalizing the results to different conditions. For this reason, the secretome of *A. brasiliensis* was characterized in both systems of culture to extend the outlook of the processes that are done in the cell from of point all the expressed proteins in a specific time and condition. Glucose was used at different concentrations to avoid the induction of proteins by specific sugars, allowing the identification of those proteins that participate in the growth at higher substrate concentrations. The first section of this work presents the effect of the concentration of media on the analyzed variables. The values of the kinetic parameters of CO₂ production were greater in solid-state fermentation, and in turn, the production of protein was linked with the level of branching of the hyphae. The secretome was more complex in solid-state fermentation than submerged fermentation, with a total of 242 and 62 identified proteins, respectively; which were classified as unique, non-regulated abundant and regulated. In the first group, 17 and 87 proteins were found in submerged and solid-state fermentation, respectively. In the second group, the number of non-regulated abundant proteins was greater in submerged fermentation (22) than solid-state fermentation (9). In the last group, 146 proteins were regulated to increase the glucose concentration in solid-state fermentation, with 23 proteins in submerged fermentation. All proteins were classified for their metabolism and main function, exceling proteins associated with carbohydrate and redox metabolism, mainly in solid-state fermentation, these proteins could be moonlighting proteins and candidates to study the non-conventional secretion mechanisms. In the second section, the comparison of the branching and protein concentration of both cultures with 60 g/L, did not showed significant differences, however, the number of proteins in solid-state fermentation increased 1.4-fold. Thus, *A. brasiliensis* secreted a complex system of proteins that reduce the stress conditions, optimize the growth and remodeling of cell wall, and allow increase the secretion of proteins either by conventional or non-conventional pathway in solid-state fermentation, while in submerged fermentation, the secreted proteins only allow the maintenance of cell.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Importancia del género <i>Aspergillus</i>	3
2.2. <i>Aspergillus niger</i>	5
2.3. <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC9642	5
2.4. Ventajas del cultivo sólido sobre el cultivo líquido	6
2.4.1. Comparación del cultivo sólido y cultivo líquido	7
2.4.2. Morfología de los hongos filamentosos	10
2.4.3. Represión catabólica en cultivo sólido	11
2.5. Secreción de proteínas	12
2.6. Antecedentes de la proteómica y sus aplicaciones en hongos filamentosos	13
2.7. Herramientas utilizadas en proteómica	15
2.7.1. Separación de proteínas en geles uni- y bidimensionales	15
2.7.2. Digestión triptica	16
2.7.3. Espectrometría de masas	16
2.8. Antecedentes directos	20
3. JUSTIFICACION	23
4. HIPOTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general	24
5.2. Objetivos particulares	24
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1. Cepa y conservación	25
6.1.1. Microorganismo	25
6.1.2. Propagación de la cepa	25
6.1.2.1. Producción de preinóculo	25
6.1.2.2. Preparación del inóculo	25
6.2. Medio de cultivo	26
6.2.1. Cultivo sólido	26
6.2.1.1. Esterilización del material	26
6.2.1.2. Preparación del cultivo	26

6.2.2. Cultivo líquido.....	27
6.2.3. Estimación de parámetros cinéticos.....	27
6.2.4. Cultivos para análisis morfométrico.....	27
6.2.4.1. Cultivo sólido.....	27
6.2.4.2. Cultivo líquido.....	28
6.2.4.3. Captura de imágenes para análisis morfológico de <i>A. brasiliensis</i>	28
6.2.4.4. Análisis morfométrico.....	28
6.3. Recuperación de la proteína extracelular.....	28
6.3.1. Cultivo sólido.....	28
6.3.2. Cultivo líquido.....	29
6.3.3. Concentración y diálisis de proteína para análisis secretómico.....	29
6.4. Separación de proteína por SDS-PAGE.....	29
6.5. Digestión trípica.....	30
6.6. LC-MS/MS.....	31
6.7. Análisis bioinformático.....	32
6.8. Clasificación y regulación de proteínas identificadas.....	33
6.9. Procedimientos analíticos.....	33
6.9.1. Humedad.....	33
6.9.2. pH.....	33
6.9.3. Glucosa.....	33
6.9.4. Proteína.....	34
6.9.5. CO ₂	34
6.9.6. Biomasa.....	34
6.10. Análisis estadístico.....	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
7.1. Efecto de la concentración de glucosa sobre parámetros asociados al crecimiento de <i>A. brasiliensis</i>	35
7.1.1. Selección de la concentración de glucosa y análisis respirométrico.....	35
7.1.2. Morfología de crecimiento de <i>A. brasiliensis</i> en cultivos sólido y líquido.....	42
7.2. Separación unidimensional del secretoma de <i>A. brasiliensis</i> en cultivos sólido y líquido.....	46
7.3. Descripción del secretoma de <i>A. brasiliensis</i> en cultivo sólido y líquido.....	47
7.3.1. Proteínas únicas identificadas en el secretoma.....	60
7.3.2. Identificación de proteínas intracelulares en el secretoma de <i>A. brasiliensis</i>	62

7.3.3. Enzimas y proteínas sin función enzimática del secretoma de <i>A. brasiliensis</i> en ambos cultivos	66
7.3.4. Proteínas hipotéticas en el secretoma de <i>A. brasiliensis</i>	67
7.3.5. Abundancia relativa de cada grupo de clasificación	68
7.3.6. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo con el metabolismo principal...	70
7.3.6.1. Proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos	70
7.3.6.2. Proteínas asociadas al metabolismo redox y al estrés	73
7.3.6.3. Proteínas clasificadas como componente/proceso celular	76
7.3.6.4. Proteínas asociadas a síntesis de proteínas	79
7.3.6.5. Proteínas asociadas al metabolismo de lípidos	80
7.3.6.6. Proteínas asociadas al metabolismo de aminoácidos	81
7.4. Comparación de resultados entre cultivo sólido y líquido con 60 g/L	81
8. CONCLUSIONES	86
8.1. Conclusión general	86
8.2. Conclusiones parciales	86
9. PERSPECTIVAS	88
10. BIBLIOGRAFÍA	89
11. ANEXOS	104
11.1. Anexo 1	104
11.2. Anexo 2	119
11.3. Anexo 3	126
11.4. Anexo 4	127

Índice de tablas.

Tabla 1. Resultados comparativos de bioprocesos en cultivo sólido y líquido.....	8
Tabla 2. Reportes de análisis proteómicos a algunas especies de <i>Aspergillus</i>	14
Tabla 3. Parámetros estimados a partir de la producción de CO ₂ en cultivos líquido y sólido (Salgado, 2015).....	37
Tabla 4. Parámetros medidos en la máxima tasa de producción de CO ₂ en ambos cultivos con diferentes concentraciones de glucosa.....	39
Tabla 5. Proteínas identificadas y clasificadas del secretoma de <i>A. brasiliensis</i> en cultivo líquido y sólido	51
Tabla A1. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas únicas identificadas en cultivo líquido.....	104
Tabla A2. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas únicas identificadas en cultivo sólido.....	105
Tabla A3. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas abundantes no reguladas identificadas en cultivo sólido.....	108
Tabla A4. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas abundantes no reguladas identificadas en cultivo líquido.....	109
Tabla A5. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas reguladas identificadas en cultivo sólido.....	110
Tabla A6. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas reguladas identificadas en cultivo líquido.....	117

Índice de figuras.

Figura 1. Flujo de trabajo simplificado para la identificación de proteínas a través de un análisis proteómico basado en la separación en gel	15
Figura 2. Mecanismo de ionización del ESI (Ho et al., 2003).....	17
Figura 3. Espectrofotómetros de masas usados en estudios del proteoma (Aebersold y Mann, 2003).....	19
Figura 4. Ejemplo de corte de los carriles del SDS-PAGE para la digestión trípica.....	30
Figura 5. Tasa de producción de CO ₂ y producción de CO ₂ de <i>A. brasiliensis</i> ATCC9642 en cultivo líquido con concentraciones de glucosa de 10 a 180 g/L.....	36
Figura 6. Tasa producción de CO ₂ y producción de CO ₂ por <i>A. brasiliensis</i> ATCC9642 en cultivo sólido con concentraciones de glucosa de 30 a 180 g/L.....	37
Figura 7. Cultivo líquido con 100 g/L y 180 g/L, los círculos rojos muestran la biomasa crecida en la pared del matraz a las 90 horas.....	38
Figura 8. Ramificación de <i>A. brasiliensis</i> en cultivo sólido y líquido con tres concentraciones de glucosa en muestras tomadas al tiempo de la máxima tasa de producción de CO ₂ (MTPCO ₂).....	43
Figura 9. Nivel de ramificación de las hifas de <i>A. brasiliensis</i> y producción de proteína en función de la concentración.....	44
Figura 10. Separación de 50 µg de proteína extracelular proveniente de CS en geles SDS-PAGE (T=12%).....	46
Figura 11. Separación de 50 µg de proteína extracelular proveniente de CL en geles SDS-PAGE (T=12%).....	46
Figura 12. Diagrama de Venn del secretoma de <i>A. brasiliensis</i> ATCC9642 en cultivo líquido y en cultivo sólido.....	48
Figura 13. Número de proteínas en función de la concentración de glucosa inicial, número de proteínas en función del nivel ramificación	49

Figura 14. Metabolismo/proceso principal de las proteínas identificadas en ambos cultivos.....	49
Figura 15. Proteínas únicas identificadas por concentración de glucosa en cultivo sólido y líquido...60	
Figura 16. Distribución de proteínas únicas encontradas en el secretoma de <i>A. brasiliensis</i> bajo las tres condiciones evaluadas en cultivo sólido y líquido.....	61
Figura 17. Número de proteínas intracelulares identificadas en el secretoma de <i>A. brasiliensis</i> en función de la concentración de glucosa en ambos cultivos.....	63
Figura 18. Distribución de proteínas típicamente intracelulares encontradas en el secretoma de <i>A. brasiliensis</i> bajo las tres condiciones evaluadas en cultivo sólido.....	64
Figura 19. Distribución de la cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas en cultivo líquido (azul) y sólido (naranja).....	68
Figura 20. Cuenta espectral ponderada de las proteínas presentes en el secretoma obtenido en cultivo líquido.....	69
Figura 21. Cuenta espectral ponderada de las proteínas presentes en el secretoma obtenido en cultivo sólido.....	70
Figura 22. Contenido de humedad inicial en función de la concentración de glucosa en cultivo sólido.....	73
Figura 23. Parámetros asociados al crecimiento de <i>A. brasiliensis</i> en cultivo líquido y sólido con 60 g/L.	82
Figura 24. Producción de CO ₂ en cultivo líquido (blanco) y sólido (gris) con 60 g/L.....	83
Figura 25. Diagrama de Venn correspondiente a las proteínas secretadas en ambos cultivos por <i>A. brasiliensis</i> a 60 g/L.....	83
Figura 26. Clasificación de proteínas únicas de cada tipo de cultivo a 60 g/L.....	84
Figura 1A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos en cultivo líquido.....	119

Figura 2A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al metabolismo redox en cultivo líquido.....	119
Figura 3A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas diversos procesos celulares en cultivo líquido.....	120
Figura 4A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al procesamiento/proteólisis de proteínas en cultivo líquido.....	120
Figura 5A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al metabolismo de aminoácidos en cultivo líquido.....	120
Figura 6A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas clasificadas como misceláneos en cultivo líquido.....	120
Figura 7A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos en cultivo sólido.....	121
Figura 8A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al metabolismo redox en cultivo sólido.....	122
Figura 9A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas procesos celulares en cultivo sólido.....	122
Figura 10A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas a procesamiento de proteínas/proteólisis en cultivo sólido.....	123
Figura 11A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de aminoácidos en cultivo sólido.....	123
Figura 12A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de lípidos en cultivo sólido.....	124
Figura 13A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de nucleótidos en cultivo sólido.....	124
Figura 14A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de cofactores y vitaminas en cultivo sólido.....	124
Figura 15A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de energía en cultivo sólido.....	124
Figura 16A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas a mecanismos de defensa a estrés en cultivo sólido.....	125

Figura 17A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de ácidos nucleicos en cultivo sólido.....	125
Figura 18A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas componentes celulares en cultivo sólido.....	125
Figura 19A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas clasificadas como misceláneos en cultivo sólido.....	125
Figura 20A. Ejemplo de medición de la ramificación de <i>A. brasiliensis</i> con 60 g/L en cultivo líquido (imagen izquierda), el cuadro rojo indica la hifa que se utilizó para medir el número de puntas. La imagen derecha es un incremento de la imagen para observar la hifa medida junto con sus respectivas regiones apicales, la hifa medida (limitada por el entorno rojo) fue de 576 μm , la cual presentó 10 puntas (círculo rojo).....	126

1. INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos es frecuente para la obtención de productos con interés comercial. En particular, los hongos filamentosos son empleados para la producción de enzimas, antibióticos o ácidos orgánicos (El-Enshasy, 2007).

Dentro de los hongos filamentosos, los pertenecientes al género *Aspergillus* suelen ser los más utilizados en la industria alimentaria, la industria textil, en la biomedicina y en biorremediación de suelos (Mojsov, 2016). *Aspergillus niger* es considerado uno de los mejores secretores de proteínas, destacando la producción de amilasas, celulasas, pectinasas, invertasas, entre otras, y es muy utilizado a nivel mundial para la producción de ácido cítrico (Papagianni, 2007).

Generalmente, la producción de metabolitos se realiza en condiciones de cultivo líquido (CL), en los que el control de algunos parámetros como el pH o la temperatura, así como, el escalamiento de reactores no es complicado. Por otro lado, la optimización y caracterización de los procesos en cultivo sólido (CS) ha tomado importancia desde hace unos años debido a las ventajas que presenta sobre el CL; sobresaliendo la baja represión catabólica (RC) y la baja inhibición por sustrato, las cuales permiten una alta producción de metabolitos (Viniestra-González y Favela-Torres, 2006); además, se estima que los costos de operación en CS son menores que en CL (Castilho et al., 2000).

Los estudios comparativos entre ambos cultivos han permitido identificar las ventajas que presenta el CS sobre el CL; no obstante, las razones por las cuales el CS presenta estas ventajas aún no son totalmente claras. Se debe tener en cuenta que dichos estudios se han enfocado en el estudio de proteínas específicas, lo que ha ocasionado una generalización de resultados y la sugerencia de diversas ideas acerca de los procesos que se llevan a cabo en cada tipo cultivo, sin considerar que cada sistema es multivariable. Actualmente, el desarrollo y mejoramiento de diversas técnicas, como la separación de proteínas por geles uni- o bidimensional (SDS-PAGE o 2D-PAGE), cromatografía líquida (LC), espectrometría de masas (MS), así como, el uso de herramientas bioinformáticas que contienen una gran cantidad de información acerca de genes y proteínas de diversos organismos, han permitido el desarrollo de la proteómica, utilizada para la caracterización de proteínas a gran escala, las cuales son obtenidas en una condición y un tiempo definido (Yu et al., 2010). El análisis del proteoma ayuda a determinar el impacto de las condiciones del cultivo sobre la fisiología y bioquímica microbiana (Kniemeyer, 2011).

A partir de lo mencionado anteriormente, en este trabajo se caracterizó el secretoma de *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642 proveniente del CS y CL como estrategia para describir y, eventualmente entender, algunas de las diferencias reportadas en ambos tipos de cultivo. Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento, se determinó el nivel de ramificación, y se identificaron las proteínas secretadas en ambos tipos de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa inicial.

El trabajo descrito a continuación presenta cuatro secciones principales. La primera sección es el marco teórico, donde se muestra información bibliográfica relacionada con algunos estudios comparativos entre CS y CL utilizando principalmente hongos filamentosos; también hay una descripción de algunos resultados obtenidos por estudios proteómicos usando hongos del género *Aspergillus*, así como la definición de algunas técnicas utilizadas para la identificación de proteínas y las diferencias entre algunos mecanismos de secreción. La segunda describe las técnicas empleadas para la obtención de resultados. Después, en la tercera sección se describen y discuten los resultados obtenidos. Este apartado está dividido en dos secciones: la primera muestra el efecto del tipo de cultivo y la concentración de glucosa inicial sobre el crecimiento de *A. brasiliensis*, la producción de proteínas extracelulares, el nivel de ramificación del micelio y el secretoma producido. En la segunda parte se comparan los resultados obtenidos a la misma concentración de glucosa inicial (60 g/L) en ambos tipos de cultivo. Finalmente, se presenta la conclusión y algunas perspectivas para completar el trabajo y obtener mayor información para comprender mejor las ventajas del CS.

2. MARCO TEÓRICO

En este apartado se describen algunos resultados reportados en la bibliografía donde se emplean hongos filamentosos, principalmente del género *Aspergillus*. Así como, algunas características de cada uno de los tipos de cultivo y de las herramientas utilizadas para el análisis global de proteínas.

2.1. Importancia del género *Aspergillus*

En diversos campos como la medicina, la industria alimentaria, ambiental o farmacéutica, el uso de los hongos de filamentosos es de suma importancia debido a la gran capacidad para secretar una gran variedad de metabolitos que son de interés comercial, como son: ácidos orgánicos, proteínas, antibióticos, polisacáridos entre otros (El-Enshasy, 2007; Mojsov, 2016). Además, el estudio de algunos hongos es necesario, debido a la capacidad patógena que presentan sobre otros organismos, por ejemplo, en humanos y plantas (Doyle, 2011).

Dentro de los hongos filamentosos, el género *Aspergillus* es uno de los más destacados dentro de la industria e investigación. Tan solo en el 2014 se identificaron 339 especies pertenecientes a este género (Samson et al., 2014). A continuación, se mencionan algunas de las especies más estudiadas:

- *Aspergillus nidulans* es considerado un excelente modelo de estudio para análisis genéticos, los cuales han aportado información relevante en un amplio rango de procesos biológicos como son: reparación del ADN, polaridad celular, ciclo celular, desarrollo de esporas, mecanismos de señalización, entre otros (Todd et al., 2007). Además de ser un microorganismo patógeno para humanos debido a la producción de aflatoxinas (Hedayati et al., 2007; Wang et al., 2019).
- *Aspergillus niger* es considerado el principal productor de ácido cítrico a nivel mundial (Papagianni, 2007). También secreta una gran diversidad de enzimas como celulasas, hemicelulasas, pectinasas, amilasas, inulinasas y lipasas, que junto con *A. oryzae* presentan los mayores porcentajes de proteínas extracelulares dentro del género *Aspergillus* (Pel et al., 2007).
- *Aspergillus oryzae* es considerado un gran secretor de enzimas (Pel et al., 2007); es por esto que se considera importante en la producción a nivel industrial, sobresaliendo su uso en las industrias de fermentación tradicional japonesa (Machida et al., 2008).

- *Aspergillus fumigatus* es considerado el principal causante de la aspergilosis, presenta una capacidad de sobrevivir y crecer en diversas condiciones ambientales, su capacidad invasiva es estudiada para el desarrollo de nuevas medicinas antifúngicas (Anjo et al., 2017; Kwon-Chung y Sugui, 2013), así como, para la producción de componentes anticancerígenos (Bladt et al., 2013).
- *Aspergillus carbonarius* es un hongo productor de aflatoxinas encontradas en productos fermentados como la cerveza o el vino, debido a su crecimiento en la materia prima para la elaboración de estas bebidas (Shukla et al., 2017). Se encuentra relacionado con *A. niger*, *A. brasiliensis* y con otros hongos de la sección *Nigri* (Andersen et al., 2008; Meijer et al., 2011).
- *Aspergillus terreus* es empleado para la obtención de fármacos que ayudan a la disminución del colesterol como la pravastatina, simvastatina y lovastatina. A su vez, es estudiado debido a que también puede causar aspergilosis (Andersen et al., 2008; Han et al., 2010).
- *Aspergillus brasiliensis* ha sido usado para estudios de biodegradación de hexadecano (Volke-Sepúlveda et al., 2006; Volke-Sepúlveda et al., 2003), y para la producción de poligalacturonasa (Zeni et al., 2011).

Se sabe que los hongos *Aspergillus* secretan un amplio espectro de enzimas que participan en la degradación de polisacáridos, lípidos y proteínas que provienen de plantas, siendo la celulosa, hemicelulosa y pectina, los principales polisacáridos en la pared celular vegetal, y el almidón e inulina, los principales polisacáridos de almacenamiento (Coutinho et al., 2009). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que no únicamente pueden hidrolizar materia biodegradable: la cutinasa que hidroliza la cutina, componente estructural de lípidos en la cutícula de las plantas, es utilizada para la degradación de ésteres sintéticos como fibras sintéticas de tereftalato de polietileno (mejor conocido como PET) y otros plásticos como la policaprolactona (Bermúdez-García et al., 2017; Maeda et al., 2004). También, se ha reportado la degradación de hidrocarburos como el hexadecano (Volke-Sepúlveda et al., 2006), presente en la fracción alifática del petróleo crudo y principal componente del diesel. Este último estudio fue realizado con *A. brasiliensis* ATCC9642, la misma cepa que se utilizó en este trabajo.

A. niger y *A. brasiliensis* presentan una alta similitud genómica y fenotípica, por lo cual los reportes acerca de *A. niger* son de utilidad para entender resultados obtenidos con *A. brasiliensis*. A continuación, se realiza una breve descripción de ambas especies.

2.2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es considerado un microorganismo GRAS (*generally regarded as safe*) (Varga et al., 2007), es el principal productor de ácido cítrico a nivel mundial, logrando producir hasta más de 200 g/L usando cepas sobre-productoras (Steiger et al., 2019). Este hongo es un gran productor de enzimas extracelulares junto con *A. oryzae*; principalmente, enzimas clasificadas como activas de carbohidratos (*CAZy-carbohydrate-active enzymes*) (Pel et al., 2007), las cuales tienen diversas aplicaciones en la industria.

Debido a la importancia industrial de *A. niger*, secuenciar su genoma fue necesario. La cepa *A. niger* CBS 513.88 fue la primera en ser secuenciada, su genoma está conformado de 33.9 *Mpb* y con un análisis informático se estimó que tiene 14,165 genes que codifican para proteínas (Pel et al., 2007). La comparación de secretomas provenientes de diferentes *Aspergillus* han demostrado que *A. niger* junto con *A. glaucus* presentan altos porcentajes de proteína únicas en su secretoma, 27.3 % y 26.9 %, respectivamente (Vivek-Ananth et al., 2018).

Este hongo filamentoso pertenece a la sección *Nigri* de los *Aspergillus*. Esta sección es uno de los grupos con mayor dificultad para su identificación y clasificación, debido a la falta de diversidad en las características morfológicas, a la plasticidad fenotípica, y a la influencia significativa de las condiciones del cultivo sobre el fenotipo (Houseknecht et al., 2008; Varga et al., 2007).

Algunas de las especies que se encuentran clasificadas dentro de la sección *Nigri* junto con *A. niger* son: *A. tubingensis*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. vadensis*, *A. costaricensis*, *A. piperis*, *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger*, *A. ibericus* y *A. brasiliensis* (Varga et al., 2007), este último presenta una elevada similitud con *A. niger*.

2.3. *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642

Aspergillus brasiliensis presenta una alta similitud con *A. niger*, este se encuentra siendo usado también en la industria por su capacidad de producir enzimas (MycoCosm, JGI). Las esporas de *A. brasiliensis* son las únicas que pueden germinar sobre D-galactosa siendo una de las diferencias notables con respecto al resto de los *Aspergillus* de la sección *Nigri*, además de presentar una mayor actividad α -arabinofuranosidasa (ABF) y β -xilosidasa (BXL) (Meijer et al., 2011).

La complicada caracterización e identificación de los hongos pertenecientes a la sección *Nigri* ocasionó que la cepa ATCC9642 fuera clasificada al principio como *A. niger*. La actual cepa *A.*

brasiliensis ATCC9642 fue depositada a ATCC (*American Type Culture Collection*) por W. H. Weston como *A. niger* ATCC9642; sin embargo, fue renombrada en el 2008 (Houseknecht et al., 2008). Se encontró que existe el 1% de diferencia en las pares de bases dentro de la región *ITS* (*internal transcribed spacer*) y sutiles diferencias morfológicas en los conidios cuando se compararon ambos hongos (Houseknecht et al., 2008; Varga et al., 2007). De acuerdo con la información presentada en el sitio Web de ATCC, la cepa 9642 es empleada sobre adhesivos para pruebas de resistencia bacteriana o fúngica, en la degradación de plásticos, en la producción de enzimas como la pululano isopululanasa, 4-glucanohidrolasa, lactoileglutatin glioxalasa, y en pruebas de agentes antimicrobianos, principalmente.

Algunos estudios con *A. brasiliensis* se han enfocado a la producción de poligalacturonasa (Gomes et al., 2011), así como, a la degradación de plásticos como el poliéster alifático sintético (Sky-Green®) (Iwashita et al., 1999) y el di-2-etilhexil adipato (*DEHA*) (Nalli et al., 2006). No obstante, su uso no se limita a la síntesis de proteínas y la degradación de plásticos, esta cepa podría ser una candidata para procesos de biorremediación en la degradación de hexadecano, donde altas concentraciones de este hidrocarburo son consumidas en condiciones de CS (Volke-Sepúlveda et al., 2003; Volke-Sepúlveda et al., 2006).

A continuación, se presentan las ventajas y desventajas de los cultivo sólido y líquido.

2.4. Ventajas del cultivo sólido sobre el cultivo líquido

Generalmente, la producción de metabolitos y enzimas por diferentes microorganismos, ya sea a nivel industrial o investigación, es realizada en condiciones de CL. Desde hace unos años se ha observado que, al comparar el CL con el CS, este último presenta diversas ventajas que lo han convertido un tema de investigación.

El CS se define como el cultivo donde las células microbianas crecen sobre una superficie sólida constituida de material poroso, el cual puede ser inerte o biodegradable que a la vez puede ser utilizado como fuente de nutrientes, que asemeja su hábitat natural (Hölker y Lenz, 2005; Viniestra-González et al., 2003). Los soportes biodegradables generalmente son residuos agroindustriales empleados como soporte-sustrato, los cuales presentan una heterogeneidad y complejidad de nutrientes, que en ocasiones dificultan la interpretación de resultados. En cambio, el uso de soportes inertes e insolubles han sido de gran ayuda durante la caracterización y comprensión de los efectos de los nutrientes durante el proceso de crecimiento de los

microorganismos. La humedad del CS oscila entre 30-85%, rango suficiente para mantener las funciones de proveer nutrientes, eliminar desechos metabólicos y mantener estructuras biológicas organizadas a nivel molecular y celular (Machado de Castro et al., 2018). Ya que, un alto porcentaje de humedad puede ocasionar deficiencias en la transferencia de O₂ que podría inducir el crecimiento bacteriano, y por otra parte, si hay un bajo contenido de humedad, se reduce la transferencia de nutrientes, lo que ocasionaría una deficiencia en el crecimiento microbiano (Pandey, 2003). Por lo general, el CS ha sido empleado para el estudio de hongos filamentosos, debido a sus capacidades de crecer sobre superficies con baja actividad de agua, la cual influye sobre su fisiología, y producción de metabolitos y proteína (Gomes et al., 2018; Romero, 2001).

Por otro lado, el CL se puede definir como el medio de cultivo en el que los nutrientes se encuentran solubles en agua y los microorganismos crecen sumergidos, manteniéndose en constante agitación. En este tipo de cultivo, la obtención de los productos de interés y la manipulación de parámetros como el pH o la temperatura, así como, el escalamiento de reactores resulta ser fácil de manejar (Raimbault, 1998). Esto último, suelen ser desventajas para el CS; sin embargo, este tipo de cultivo presenta también ciertas ventajas sobre el CL que a continuación se enlistan (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006; Hölker y Lenz, 2005).

- Alta producción de biomasa
- Alta producción de proteína
- Menor inhibición por sustrato
- Alta estabilidad de los productos obtenidos
- Baja o ausencia de represión catabólica
- Uso de materiales agroindustriales
- Bajos costos de operación
- Alta transferencia de oxígeno

En el siguiente apartado se mencionan algunos reportes comparando los principales resultados obtenidos para cada tipo de cultivo.

2.4.1. Comparación del cultivo sólido y cultivo líquido

En la Tabla 1, se indican resultados obtenidos durante la comparación del crecimiento de algunos microorganismos entre CS y CL. Estos resultados indican las ventajas observadas en CS; sin embargo,

en algunos casos se debe tener en cuenta que las unidades de comparación son distintas en el mismo estudio. En ocasiones, realizar una comparación directa entre CL y CS resulta ser difícil debido a que cada tipo de cultivo posee características únicas (Hölker y Lenz, 2005); por lo que es necesario establecer criterios de comparación y unidades medibles para ambos sistemas.

Tabla 1. Resultados comparativos de bioprocesos en cultivo sólido y líquido.

Microrganismo	Sustrato	Producto	Resultado	Ventaja	Referencia
<i>Bacillus Licheniformis</i> M27	*Almidón 0.1-0.2% en CL *ST en CS *ST+10% de otros sustratos en CS	α-amilasa CS (ST) CL (0.2% almidón)	13 860 U/g ST vs. 480 U/mL	Alta producción de enzima y menor RC e IS en CS	(Ramesh y Lonsane, 1991)
<i>A. niger</i> CH4	Pectina + glucosa, sacarosa o ácido galacturónico	Pectinasas	3 y 11 veces más endo- y exo- pectinasa (CS), respectivamente. 14 veces más productividad de endo-pectinasa en CS (U/g h vs. U/mL h)	Alta producción y productividad, menor RC en CS	(Solís-Pereira et al., 1993)
<i>A. niger</i> PKL 104	ácido tánico	Tanasa	680 mg proteína total (CS) 375 mg proteína total (CL) 20% y 52% de la tanasa total es intracelular en CL y CS, respectivamente. En 3 días la mayor actividad en CS, 6 días para CL con 150 U/mL y 60 U/mL, respectivamente	Alta producción, secreción y estabilidad de la tanasa de CS Alto porcentaje intracelular en CL a los 7 días	(Lekha y Lonsane, 1994)
<i>A. niger</i> CH4	Pectina + sacarosa	Pectinasas	Endo-pectinasa 0.06 (CS) vs. 0.01 (CL) U/mL h; Exo-pectinasa 0.14 (CS) vs. 0.0002 (CL) U/mL h; Pectin liasa 0.008 (CS) vs. 0.0002 (CL) U/mL h	Mayor productividad en CS	(Acuña-Argüelles et al., 1995)
<i>A. niger</i> 10	Glucosa	Biomasa	Altas concentraciones (30-450 g/L) y rápido crecimiento y consumo de glucosa en CS	Baja IS, rápida y mayor producción de biomasa	(Favela-Torres et al., 1998)
<i>A. niger</i> CFTRI 1105	ST+ glucosa	α-amilasa	Rápido crecimiento y alta actividad en CS (medio 150 g/L de glucosa) Alrededor de 3000 U/mg de materia seca final vs. 125 U/mL	Baja RC	(Nandakumar et al., 1999)
<i>A. niger</i> Aa20, N402 y C28B25	Sacarosa	Invertasa	X _{max} 34 ± 5 g/L en CS y 11 ± 0.3g/L en CL) Productividad enzimática: 87 ± 33 U/L h en CS y 20 ± 2.3 U/L h, respectivamente	Alta producción de biomasa y productividad en CS	(Romero-Gómez et al., 2000)
<i>A. niger</i> Aa20	Ácido tánico Ácido tánico + glucosa	Tanasas	Actividad: 221 ± 116 IU/L h en CS y 52 ± 17 IU/L h en CL	Alta productividad y baja RC en CS	(Aguilar et al., 2001)
<i>A. brasiliensis</i> ATCC9642 (<i>A. niger</i>)	Hexadecano	Biomasa y consumo	Biomasa con 45 g/L (CS): 0.89 ± 0.07 g/L día y con 40 g/L (CL) 0.03 ± 0.02 g/L día; Consumo: 1.42 ± 0.00 g/L día en CS y 0.15 ± 0.03 g/L día en CL	Alta producción de biomasa y mayor consumo de hexadecano en CS	(Volke-Sepúlveda et al., 2003)
<i>A. oryzae</i> NRRL 1808, 6270, 1989, <i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 1768, 1132, <i>P. pinophilum</i> NRRL 106 y <i>P. aculeatum</i> NRRL 2129	ST, cascarilla de arroz, salvado de arroz, grano de elaboración gastado, torta de aceite de coco, torta de almendra de palma, torta de aceite de sésamo, polvo de semillas	Proteasas	Actividad enzimática: alrededor de 12 U/g ss y 7 U/g ss en CL	Alta actividad proteolítica con fuentes de carbono específicas	(Sandhya et al., 2005)

Microrganismo	Sustrato	Producto	Resultado	Ventaja	Referencia
<i>A. oryzae</i> RIB40	de jaca y torta de aceite de oliva	Proteína (concentración y diversidad) Biomasa	Proteína CS: 53.7 ± 1.36 mg/g bs a las 32 h 77.3 ± 2.60 mg/g bs a las 40 h Proteína CL: 13.2 ± 2.60 mg/g bs a las 32 h 11.9 ± 0.89 mg/g bs a las 40 h Biomasa seca: 77.3 ± 2.6 mg/g en CS y 11.9 ± 0.89 mg/g en CL; Mayor número de spots en CL, sugiriendo mayor número de proteínas	Mayor producción de proteína y biomasa en CS; mayor diversidad de proteínas en CL	(Oda et al., 2006)
<i>B. subtilis</i> DM-03, DM-04	Cáscara de papa	Biosurfactantes	<i>B. subtilis</i> DM-03: 80.0±9 mg/g ss en CL y 67.0±6 mg/g ss en CS; <i>B. subtilis</i> DM-04: 23.0±5.0 mg/g ss en CL y 20.0±2.5 mg/g ss en CS	No hay diferencias significativas entre ambos cultivos	(Das y Mukherjee, 2007)
<i>A. fumigatus</i> SMN1	Paja de trigo	Glucanasas	Proteína: 114 ± 18.6 µg/mL en CS y 51 ± 12.2 µg/mL en CL Actividad: 1 044 ± 281 IU/mL en CS y 321 ± 109 IU/mL en CL Q10: 1.46 en CS y 1.8 en CL	Alta producción de proteínas, mayor estabilidad y actividad enzimática en CS	(Saqib et al., 2010)
<i>A. niger</i>	Ácido tánico	Tanasas	Actividad: 1 861.64 U/mL en CS y 14.76 U/mL en CL, ambos en el extracto crudo Tanasa identificada de 102 y 105 kDa en CL y CS, respectivamente; tanasa de CL más estable a pH de 5-7 y a 70 °C Tanasa de CS con mayor actividad específica (5.5 veces más que CL)	Alta producción y productividad en CS, mayor estabilidad de la tanasa de CL Existencia de variaciones estructurales	(Renovato et al., 2011)
<i>Neurospora sitophila</i>	Paja de trigo	Biomasa Proteínas	Producción de biomasa (g glucosamida/g sustrato): 0.25 en CS y 0.6 en CL, alrededor de 7 días Proteína: 43 mg/g sustrato vs. 0.41 mg/g de sustrato a los 4 días Mayor actividad celulasa en CS Un número similar de proteínas secretadas, pero con funciones distintas	Alta producción de biomasa, proteína y actividad enzimática en CS Diferentes perfiles de proteínas secretadas	(T. Liu et al., 2014)
<i>A. oryzae</i> ΔligD::loxP, niaD ⁻ , sC ⁻ , pyrG ⁻	Almidón + glucosa	Amilasas	La delección de <i>creA</i> y <i>creB</i> incrementan la actividad amilasa en CL La delección de <i>creA</i> y <i>creA/creB</i> incrementan la actividad amilasa en CS, únicamente <i>creB</i> no tiene un efecto	Diferentes mecanismos de RC	(Ichinose et al., 2014)
<i>A. oryzae</i> ΔligD::loxP, niaD ⁻ , sC ⁻ , pyrG ⁻	Madera de haya, carboximetilcelulosa p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido	Xilanasas β-glucosidasa	La actividad xilanasas y β-glucosidasa incrementan >100 veces después de la delección de <i>creA</i> y <i>creA/creB</i> en CL, respecto a la cepa silvestre. En CS, incrementa >7 veces con la doble delección; La delección de <i>creA</i> o <i>creB</i> no afecta la expresión de la endo-β-glucanasa en contraste con xilanasas y β-glucosidasa	Existen mecanismos de RC para cada proteína y tipo de cultivo	(Ichinose et al., 2018)

ST= Salvado de trigo; RC= Represión catabólica; IS= Inhibición por sustrato; g ss= gramo de sustrato seco; gbs= gramo de biomasa seca

En resumen, en la mayoría de los estudios se ha demostrado mayores rendimientos de los productos esperados y mayor productividad; las principales razones que justifican la alta productividad de proteína y metabolitos en CS, es que en este tipo de cultivo hay una alta disponibilidad de O₂, una baja inhibición por sustrato y una baja RC (Viniegra-González et al., 2003). En el caso de la producción de la proteína, la morfología que desarrollan los hongos filamentosos

durante su crecimiento también tiene que ser considerada, debido a que es un variable que depende de la ramificación (Gomes et al., 2018; Zhang y Zhang, 2016).

2.4.2. Morfología de los hongos filamentosos

La morfología de los hongos filamentosos es una de las variables que se debe considerar durante el diseño de procesos, ya que esta depende de las condiciones del cultivo (Wucherpennig et al., 2011). Por ello, se debe tener en cuenta que diversas variables pueden afectar considerablemente los niveles de ramificación de las hifas, entre estas variables se encuentra el pH, la temperatura o la agitación para el caso de CL (Bocking et al., 1999; Dynesen y Nielsen, 2003).

Generalmente, la morfología que desarrollan los hongos filamentosos en CL es la aglomeración de las hifas formando estructuras conocidas como *pellets*, aunque el crecimiento de micelio disperso también es posible (Veiter et al., 2018). La difusión de los nutrientes dependerá de la densidad de biomasa que exista en el pellet (Zhang y Zhang, 2016). La formación de pellets se ve influenciada por diversos factores como el tamaño de inóculo, pH, el nivel de oxígeno disuelto, agitación, agentes nucleantes, aditivos, metales traza, temperatura, tipo de reactor, entre otros más. Los *pellets* formados por *A. niger* se han clasificado como coagulativos, ya que sus esporas forman agregados durante las primeras 6-8 h de cultivo, para posteriormente germinar (Zhang y Zhang, 2016).

Por otra parte, el crecimiento del hongo en CS resulta ser en forma de micelio desagregado; en el cual las hifas se extienden sobre y dentro del soporte sólido (Gomes et al., 2018; Villena y Gutiérrez-Correa, 2007), asemejando el crecimiento en condiciones naturales. Se ha planteado que la ramificación de las hifas durante el crecimiento micelial es importante, ya que incrementa el área superficial mejorando la adquisición de nutrientes. Además, se favorece la fusión de hifas, proceso que suele ser importante para el intercambio de nutrientes y señalización entre hifas de la misma colonia (Harris, 2008). Para que el hongo filamentoso pueda crecer sobre y dentro del soporte, éste tiene que ser poroso (Barrios-González, 2012). En CS, las hifas forman una capa de biomasa sobre el soporte, la cual se define como una red tridimensional compuesta de tres zonas donde interaccionan las hifas con los poros del soporte: la primera consiste en hifas aéreas y poros llenos de aire llamada capa superior, la segunda llamada capa inferior contiene hifas densamente compactadas que se encuentran en contacto con los poros llenos de líquido y la tercera son las hifas que han penetrado el soporte (Barrios-González, 2012; Gomes et al., 2018; Oostra et al., 2001).

Sin importar el tipo de cultivo, se sabe que existe una relación positiva entre la hiper-ramificación de las hifas con la secreción de proteína, lo que se traduce en que a un mayor número de puntas mayor secreción de proteína (Gomes et al., 2018; Villena y Gutiérrez-Correa, 2007). Sin embargo, la comparación de la morfología de crecimiento en ambos tipos de cultivo utilizando el mismo medio de cultivo no ha sido reportada.

2.4.3. Represión catabólica en cultivo sólido

Una de las principales ventajas que presenta el CS al compararse con el CL es la baja represión catabólica (RC). Algunos estudios que demuestran menor RC en CS que en CL se presentan en la Tabla 1.

La RC se puede definir como el proceso de inhibición del catabolismo de fuentes alternativas de energía (por ejemplo: polisacáridos) cuando se dispone de otra fuente de carbono más fácilmente asimilable (frecuentemente glucosa) en el medio de cultivo (Adnan et al., 2018; Viniegra-González y Favela-Torres et al., 2006). La baja RC en CS es atribuida a la presencia de gradientes microscópicos entre los agregados de masa celular o un cambio en la permeabilidad celular a los azúcares (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006). No obstante, no está totalmente claro cómo se lleva a cabo la RC a nivel metabólico en CS (Carrillo-Sancen et al., 2016).

Se ha propuesto que la RC en hongos filamentosos es regulada por el factor de transcripción CreA, el cual garantiza una compatibilidad óptima con el sustrato que sea más fácil de asimilar. Para llevar a cabo la RC por medio de CreA es necesario que existan altos niveles de transcripción de CreA, transporte de glucosa, y la presencia parcial de CreB (Mäkelä et al., 2018). Pero CreA no es el único mecanismo en este proceso, ya que se ha reportado con *A. nidulans* que la represión de α -ramnosidasa es llevada a cabo por medio de algún mecanismo independiente a CreA (Tamayo-Ramos et al., 2012). También, se ha reportado que CreA no afecta significativamente el orden en que los azúcares como D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-ácido galacturónico y maltosa sean consumidos por *A. niger* (Mäkelä et al., 2018). La actividad α -amilasa por *A. oryzae* se vio incrementada en CS y en CL cuando fueron suprimidos los genes *creA* y *creB*, sugiriendo que eliminar CreA y CreB se puede suprimir la RC (Ichinose et al., 2014), por otra parte, la producción de endo- β -glucanasa en ambos cultivos, no se ve afectada por la supresión de *creA* y *creB*, sugiriendo una maquinaria alterna a CreA y CreB para su represión (Ichinose et al., 2018). Por lo tanto, se puede sugerir que algunas enzimas no son reguladas por el

mecanismo de CreA o que este mecanismo es desactivado cuando los hongos filamentosos crecen en condiciones de CS.

2.5. Secreción de proteínas

Una de las características de *A. niger* es la capacidad de secretar una alta cantidad y variedad de proteínas a la región extracelular. El número de proteínas aproximado en el proteoma de *A. niger* es alrededor de 14 000 (Vivek-Ananth et al., 2018). De las cuales, se ha estimado de manera bioinformática que secreta entre 691 a 881 proteínas, donde alrededor del 90% presenta péptido señal (Tsang et al., 2009), principal característica para diferenciar entre la secreción convencional de la no-convencional (Miura y Ueda, 2018). El péptido señal es una secuencia de aminoácidos que se encuentran en la parte N-terminal de la proteínas que serán liberadas a la región extracelular, consta en promedio de 16-30 aminoácidos, en ocasiones alcanzan hasta los 50 aminoácidos, por lo que, no existen similitudes entre secuencias (Kapp et al., 2013). Sin embargo, la identificación de tres partes en la secuencia es fundamental para determinar la presencia del péptido señal: la primera es una región hidrofílica cargada positivamente (región N), la segunda es una región central hidrofóbica (región H) compuesta de 5-15 residuos y la tercera (región c) con el sitio de corte para la peptidasa señal (SPasa) (Kapp et al., 2013). Esta secuencia se puede predecir a partir del análisis de una secuencia de aminoácidos utilizando el programa SignalP, Psort y TargetP (Miura y Ueda, 2018; Nielsen, 2017);

El proceso de secreción inicia en el retículo endoplásmico (RE), donde las proteínas se pliegan y pueden ser modificadas por glicosilación, puentes disulfuro, fosforilación o ensamblaje de subunidades. Después son dirigidas al aparato de Golgi a través de vesículas transportadoras para ser modificadas (glicosilación o procesamiento de péptidos) y empaquetadas en vesículas secretoras para llevarlas a la membrana plasmática de donde serán secretadas (Conesa et al., 2001; Miura y Ueda, 2018).

A pesar de que un alto número de proteínas presentan péptido señal para ser secretadas a la región extracelular, algunos estudios proteómicos han identificado proteínas que pueden ser liberadas por mecanismos no-convencionales (Carrillo-Sancen et al., 2016; Miura y Ueda, 2018; Stock et al., 2012; Volke-Sepulveda et al., 2016). Los mecanismos de secreción no-convencional no son totalmente claros y además parecen ser bastante complejos. Shoji et al., (2014) mencionan algunos ejemplos de secreción no-convencional, indicando que la más utilizada por los hongos es la secreción vesicular.

La exocitosis (transporte de vesículas a la membrana plasmática) se lleva a cabo en la punta de las hifas y ha tomado importancia por su relación con el crecimiento celular y la secreción de proteínas (Shoji et al., 2014). Este proceso, además de observarse en las puntas de las hifas, ocurre en los septos (Hayakawa et al., 2011). La secreción vesicular es necesaria para la liberación de macromoléculas a la región extracelular. Entre las moléculas que son transportadas por vesículas, se encuentran proteínas, lípidos, polisacáridos y pigmentos, los cuales son componentes utilizados por diversos hongos patógenos para la invasión del huésped (Rodrigues et al., 2011). Las vesículas secretadas por *Saccharomyces cerevisiae* presentan enzimas como glucanasas, glucanosiltransferasas, proteínas de choque térmico y peptidasas (Ferreira de Oliveira et al., 2010), incluso enzimas asociadas con la ruta glicolítica y el metabolismo oxidativo pueden ser secretadas a través de vesículas (Miura y Ueda, 2018).

Diversas proteínas intracelulares identificadas en los secretomas de diversos hongos se han considerado producto de lisis celular por envejecimiento o procesamiento de la muestra (Li et al., 2013), o como resultado de la secreción no-convencional. Algunas de estas proteínas son reportadas como alérgenos, los cuales generalmente participan en la interacción huésped-patógeno (Miura y Ueda, 2018). Este tipo de proteínas multifuncionales son denominadas proteínas *moonlight* (Amblee y Jeffery, 2015). Dentro de las proteínas *moonlight*, se ha reportado que enzimas como la enolasa, triosafosfato isomerasa y alcohol deshidrogenasa provenientes de *C. albicans* interactúan con el huésped, además de ser parte del mecanismo contra especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Serrano-Fujarte et al., 2016). Mientras que, la proteína ribosomal RPL44 que participa en la traducción de ARNm, es expresada para soportar condiciones de estrés abiótico por parte de *A. glaucus* (Liu et al., 2014).

Es por estas razones que el descartar proteínas consideradas intracelulares que fueron identificadas en un secretoma puede resultar en la pérdida de información relevante para el entendimiento de los procesos de adaptación de algunos organismos.

2.6. Antecedentes de la proteómica y sus aplicaciones en hongos filamentosos

El uso de diversas técnicas para análisis y separación de proteínas, y el uso de las secuencias genómicas han permitido el desarrollo de la proteómica (Ferreira de Oliveira et al., 2010). La proteómica es una herramienta que permite analizar de una manera global los patrones de expresión de las proteínas, posibilitando un mejor entendimiento de los cambios que ocurren durante la adaptación a diversas condiciones ambientales (Kim et al., 2007). Para ello, se utilizan un

conjunto de técnicas que con el tiempo ha mejorado, entre éstas se encuentran: la separación de proteínas en geles uni- o bidimensionales, la cromatografía líquida, la digestión de proteínas en solución (método libre de gel) o en gel, el análisis de péptidos por espectrometría de masas, y el uso de bases de datos a través de la bioinformática. El mejoramiento y la optimización de dichas técnicas analíticas han permitido el incremento de estudios proteómicos que han sido de utilidad para la identificación de proteínas fúngicas que participan durante los procesos de infección, en la producción de metabolitos secundarios, en el metabolismo y en el desarrollo morfológico, así como, la identificación de nuevas o mejores proteínas de interés biotecnológico (Doyle, 2011).

Es por estas razones que utilizar la proteómica como herramienta para la identificación de proteínas a gran escala en un tiempo o estado fisiológico determinado aporta información acerca del metabolismo o de la fisiología de los cultivos. La posibilidad de determinar el estado fisiológico de un cultivo utilizando la respirometría ha sido de ayuda para comparar los secretomas de *A. niger* y *A. brasiliensis* obtenidos en CS, a pesar de crecer en diferentes concentraciones de sustrato (Carrillo-Sancen et al., 2016; Volke-Sepulveda et al., 2016). Sin embargo, no hay estudios donde se realice una comparación de las proteínas expresadas en CS y CL, utilizando la respirometría como herramienta para establecer el estado fisiológico del microorganismo; y a la vez, pocos trabajos se han enfocado en la comparación entre ambos tipos de cultivos usando un análisis proteómico. El primero en realizarlo fue Oda et al., (2006), quien comparó el secretoma de *A. oryzae* entre ambos sistemas, encontrando que los mecanismos de secreción y expresión de proteínas difiere entre CS y CL. Estos resultados nos indican que la proteómica puede ayudar a comprender mejor las diferencias entre ambos cultivos, así dilucidando las razones por las cuales el CS presenta mayores ventajas sobre CL.

La Tabla 2 resume algunos estudios realizados donde la proteómica es utilizada para la identificación de proteínas provenientes de hongos filamentosos correspondientes al género *Aspergillus*.

Tabla 2. Reportes de análisis proteómicos a algunas especies de *Aspergillus*.

<i>Microorganismo</i>	<i>Cultivo</i>	<i>Proteoma</i>	<i>Referencia</i>
<i>A. fumigatus</i>	Líquido	Membrana	(Bruneau et al., 2001)
<i>A. oryzae</i>	Líquido	Intracelular	(Nandakumar y Marten, 2002)
<i>A. flavus</i>	Líquido	Extracelular	(Medina et al., 2005)
<i>A. fumigatus</i>	Superficial	Superficie de conidios	(Asif et al., 2006)
<i>A. oryzae</i>	Sólido/líquido	Secretoma	(Oda et al., 2006)
<i>A. nidulans</i>	Líquido	Intracelular	(Kim et al., 2007)
<i>A. fumigatus</i>	Superficial	Intracelular	(Gautam et al., 2008)
<i>A. fumigatus</i>	Líquido	Proteoma	(Cagas et al., 2011)

Microorganismo	Cultivo	Proteoma	Referencia
<i>A. niger</i>	Superficial/ líquido	Secretoma	(Krijgsheld et al., 2012)
<i>A. oryzae</i>	Sólido	Secretoma	(Zhang et al., 2012)
<i>A. fumigatus</i>	Sólido	Secretoma	(Adav et al., 2010)
<i>A. nidulans</i>	Líquido	Fosfoproteoma	(Ramsubramaniam et al., 2014)
<i>A. flavus</i>	Superficial	Proteoma	(Zhang et al., 2015)
<i>A. niger</i>	Sólido	Secretoma	(Carrillo-Sancen et al., 2016)
<i>A. fumigatus</i>	Superficial	Proteoma de conidios	(Anjo et al., 2017)
<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. nidulans</i> y <i>A. oryzae</i>	N. D.	Secretoma	(Vivek-Ananth et al., 2018)
<i>A. flavus</i>	Superficial/líquido	Proteoma	(Wang et al., 2019)

N.D. = No disponible

Desde el inicio de la proteómica, las técnicas de identificación y separación de proteínas han ido mejorando para tener resultados más precisos y lograr caracterizar mejor cada una de las proteínas que conforman el proteoma. Por ello, se siguen empleando herramientas fundamentales como son los geles de poliacrilamida, la espectrometría de masas y la bioinformática, que a continuación se describen brevemente.

2.7. Herramientas utilizadas en proteómica

Para llevar a cabo la identificación de las proteínas utilizando la proteómica, diversas herramientas son utilizadas. Un esquema general de un estudio proteómico basado en separación a través de geles de poliacrilamida se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Flujo de trabajo simplificado para la identificación de proteínas a través de un análisis proteómico basado en la separación en gel.

2.7.1. Separación de proteínas en geles uni- y bidimensionales

La separación de un complejo de proteínas puede realizarse por geles unidimensionales o bidimensionales. El uso de geles unidimensionales forma parte de la estrategia *Gel-LC*. La cual consiste en separar las proteínas sólo por su peso molecular (Brunelle y Green, 2014) en geles de poliacrilamida de una dimensión (*SDS-PAGE*), seguido por el corte de cada carril en tres regiones (o más dependiendo del rango dinámico) de peso molecular coincidentes entre carriles. Esta metodología permite corroborar el perfil de las proteínas en cada muestra, resolver la posible limitación proveniente del rango dinámico de las proteínas (capacidad para identificar proteínas que se encuentren con una gran diferencia en la concentración) y eliminar posibles interferentes presentes (detergentes, inhibidores de proteasas, pH y concentración elevada de sales) que puedan afectar la actividad de la proteasa utilizada durante el proceso de digestión. Los péptidos obtenidos

son separados por cromatografía líquida y analizados por *MS*; el análisis de todas las proteínas presentes a gran escala es llamado “*shotgun*” (Freson, 2019). Esta metodología es utilizada comúnmente y fue la que se empleó en este trabajo en particular. Por otro lado, la separación bidimensional se realiza por peso molecular y punto isoelectrico a través de geles *2D-PAGE*; este último es muy utilizado para la identificación de modificaciones postraduccionales (Chevalier, 2010).

Posteriormente, para observar la distribución de las proteínas en cualquiera de los dos tipos de geles, se puede realizar tinción con plata, métodos basados en fluorescencia o azul de Coomassie (Rabilloud, 2009), este último es el más reportado por tener mayor compatibilidad con la espectrometría de masas (Dyballa y Metzger, 2009).

2.7.2. Digestión trípica

La digestión trípica es la más utilizada para la obtención de péptidos para su análisis por espectrometría de masas; aunque existen otras proteasas que suelen ser usadas como alternativas, generalmente son usadas en conjunto para el mejoramiento de resultados (Tsiatsiani y Heck, 2015). La tripsina corta la secuencia de aminoácidos en la unión de Arg-Lys, dando péptidos cortos entre un rango de 0.5- 3 KDa (Tsiatsiani y Heck, 2015), que son más fáciles de analizar por *MS*.

2.7.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una herramienta que nos ayuda a estudiar generalmente biomoléculas, destacando las proteínas (Domon y Aebersold, 2006). Un espectrómetro de masas está conformado de una fuente de iones, un analizador de masas encargado de separar y estimar la relación masa/carga (m/z) de los analitos ionizados y un detector que registra el número de iones en cada valor m/z , lo cual es mostrado posteriormente de manera gráfica como espectro de masas, el cual indica la abundancia relativa de las señales de acuerdo con su proporción m/z (Aebersold y Mann, 2003; Ho et al., 2002). Las dos técnicas de ionización suave más utilizadas para la obtención de iones provenientes de biomoléculas es por *MALDI* (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y *ESI* (*Electrospray Ionization*), ambos son acoplados a una variedad de analizadores de masas que incrementan la calidad, resolución y sensibilidad en la identificación de péptidos de una secuencia proteica (Aebersold y Mann, 2003; Domon y Aebersold, 2006).

- *MALDI*: Para realizar el análisis de los péptidos, la muestra es mezclada con una matriz, constituida generalmente por moléculas con anillos aromáticos, como son: el ácido 2,5-dihidroxibenzóico, el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico o el ácido sinapínico (Wysocki et al.,

2005). Dicha matriz incrementa y/o mejora la ionización. La muestra cristalizada es vaporizada y ionizada, por medio de pulsaciones láser, y a través de un tubo de tiempo de vuelo (*TOF*), se separan los iones en el tiempo, diferenciando los iones más ligeros (viajan más rápido) de los más pesados (más lentos), y al final, un detector permite determinar eficientemente la m/z (también llamada masa observada).

- *ESI*: El proceso por *ESI* consta principalmente de tres pasos, el primero la dispersión de pequeñas gotas cargadas generadas a través del uso de una corriente eléctrica de alto voltaje y bajo amperaje, segundo la evaporación del solvente (fenómeno de solvatación o deshidratación) y tercero la inyección de los iones provenientes de las gotas altamente cargadas (Figura 2). Para generar y transferir los iones a partir de la solución hasta la fase gaseosa, como se mencionó anteriormente, es necesario energía eléctrica. El espectrómetro de masas puede ser programado para definir que iones extraer (positivos o negativos), dependiendo de las características de ionización de cada molécula de interés (en el caso particular de los péptidos, el mayor porcentaje de estos se ionizan con carga positiva). Los iones extraídos, son detectados en el analizador de masas (el cuadrupolo más usado) registrando la m/z (Ho et al., 2002). Algunas de las ventajas del *ESI* respecto de *MALDI* son: a) permite generar iones con diferentes estados de carga como +2, +3, +4 (a diferencia de *MALDI* que generalmente son +2) y b) permite utilizar la muestra en forma líquida, previo a la separación mediante cromatografía mono o bidimensional, lo cual mejora la resolución de muestras complejas (*MALDI* requiere usar *LC-MALDI* para generar fracciones y luego cada una de estas colocarlas en cada spot) (Wysocki et al., 2005).

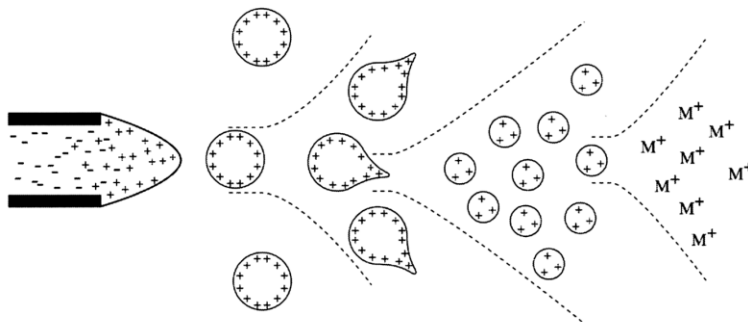


Figura 2. Mecanismo de ionización del *ESI* (Ho et al., 2003).

Como se mencionó, la fuente de iones se encuentra acoplada a los analizadores de masas que determinaran la m/z , utilizando campos eléctricos y/o magnéticos para manipular iones en un cuerpo dependiente de la masa (Lin et al., 2003). Algunos de los comúnmente utilizados son: el cuadrupolo (Q), trampa de iones cuadrupolo (QIT), tiempo de vuelo (ToF) y $FT-ICR$ (*Fourier transform ion cyclotron resonance*) (El-Aneed et al., 2009). Sin embargo, para el mejoramiento del análisis por espectrometría de masas, diversos equipos se modifican con más de un analizador de masas, conociéndose como espectrofotómetros híbridos (Carrasco Navarro, 2017; Aebersold y Mann, 2003). A continuación, se muestran y describen los analizadores de masas mostrados en la Figura 3 (Aebersold y Mann, 2003):

- a) En el instrumento conocido como tiempo de vuelo (TOF) con reflector: los iones se aceleran a alta energía cinética y se separan a lo largo de un tubo de vuelo como resultado de sus diferentes velocidades. Los iones se dan la vuelta en un reflector, que compensa las ligeras diferencias en la energía cinética, y luego afecta a un detector que amplifica y cuenta los iones que llegan.
- b) El instrumento tiempo de vuelo/tiempo de vuelo ($TOF-TOF$): incorpora una celda de colisión entre dos secciones TOF . Los iones de una m/z se seleccionan en la primera sección TOF , fragmentadas en la celda de colisión, y las masas de los fragmentos se separan en la segunda sección TOF .
- c) En el instrumento triple cuadrupolo ($Q3$): Los espectrómetros de masa cuadrupolo seleccionan por campos eléctricos que varían en el tiempo entre cuatro cilindros, lo que permite una trayectoria estable sólo para iones de una m/z deseada en particular. Los iones de una m/z determinada se seleccionan en una primera sección ($Q1$), son fragmentados en una celda de colisión ($q2$), y los fragmentos separados en $Q3$. En la trampa de iones lineales, los iones se capturan en una sección cuádruple, representada por el punto rojo en la $Q3$. Luego se excitan a través de un campo eléctrico resonante y los fragmentos son escaneados, creando el espectro de masas en tándem.
- d) Un instrumento cuadrupolo-tiempo de vuelo ($Q-TOF$): combina la parte frontal de un instrumento cuádruple triple con una sección TOF con refractron o reflector y al final un detector para medir la masa de los iones.
- e) En un instrumento trampa de iones (*Ion Trap*) captura los iones como en el caso de la trampa de iones lineal, fragmentos de iones de una m/z particular, y luego escanea los fragmentos para generar el espectro de masa en tándem.

f) El instrumento *FT-MS* (*Fourier Transform-Mass spectrometry*) también atrapa los iones, pero lo hace con la ayuda de campos magnéticos fuertes. La Figura 3 muestra la combinación de *FT-MS* con la trampa de iones lineal para el aislamiento eficiente, la fragmentación y la detección de fragmentos en la sección *FT-MS*.

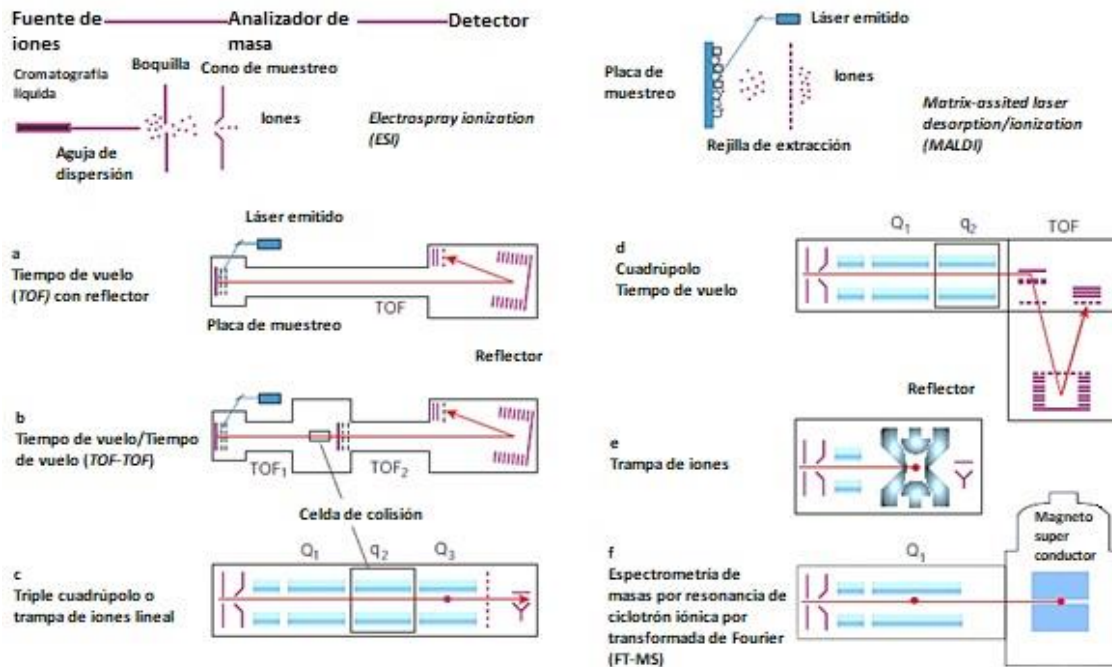


Figura 3. Espectrómetros de masas usados en estudios del proteoma. Los paneles superiores izquierdo y derecho representan el proceso de ionización e introducción de muestras en ionización por *electrospray* (ESI) y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). (imagen modificada de Aebersold y Mann, (2003)).

2.7.4. Herramientas bioinformáticas

Las secuencias peptídicas obtenidas por espectrometría de masas son analizadas por diversos motores de búsqueda que permiten la identificación de los más probables péptidos presentes, y como resultado final, las proteínas, algunos de los más usados son: MASCOT, SEQUEST, X!Tandem y Andromeda que se interconectan o usan dentro de programas como Proteome Discoverer (Thermo-Fisher Scientific), TPP (Trans-Proteomic Pipeline) (Seattle Proteome Center), MaxQuant (Max-Planck-Institute), entre otros (Shteynberg et al., 2013; Yuan et al., 2014). Las alineaciones en estos motores se realizan con secuencias de proteínas almacenadas en bases de datos como NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>), donde se encuentra una gran cantidad de información asociada a las proteínas de interés, si su genoma correspondiente ésta secuenciado. Otra base de datos que es de gran utilidad durante la caracterización funcional de las

proteínas identificadas es KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>), la cual vincula información genómica con información funcional de orden superior. La primera es almacenada en la base de datos GENES, que es una colección de catálogos de genes para genomas completa y parcialmente secuenciados con anotaciones actualizadas de las funciones genéticas. La segunda se almacena en la base de datos PATHWAY, que contiene representaciones gráficas de procesos celulares, como el metabolismo, el transporte de membrana, la transducción de señales y el ciclo celular (Kanehisa, 2000).

La predicción de la localización intracelular o extracelular de una proteína se puede realizar con el uso de algoritmos como SignalP o SecretomeP, asociadas al CBS (*Center Biological Sequence Analysis*, <http://www.cbs.dtu.dk>). La primera estima si una proteína es secretada por vía convencional, prediciendo si éstas presentan péptido señal, el cual indica si serán secretadas (Nielsen, 2017). La segunda plataforma, SecretomeP, da una aproximación de que proteínas pueden ser secretadas por mecanismos no convencionales, los cuales han sido observados de manera experimental y reportados, este servidor se encuentra diseñado para bacterias y células de mamíferos (Lonsdale et al., 2016); sin embargo, ha sido empleado para algunos hongos (Liu et al., 2014; Shah et al., 2009; Volke-Sepulveda et al., 2016).

A continuación, se describe la diferencia entre ambos procesos de secreción observado en diversos organismos.

2.8. Antecedentes directos

El estudio de *A. niger* en CS se ha realizado desde hace años en el laboratorio de fermentaciones en estado sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana, con el fin de comprender algunas de las diferencias entre los cultivos sólido y líquido.

Como se ha mencionado previamente, una de las ventajas del CS, es el uso de altas concentraciones de fuente de carbono sin observar RC o inhibición por sustrato. A partir de estas ventajas, algunos de los estudios se han enfocado en la utilización de altas concentraciones de fuente de carbono o la combinación de polisacáridos junto con algún represor catabólico para la producción de enzimas de interés comercial.

En 1993, Solís-Pereira et al. evaluaron la producción de pectinasas de *A. niger* CH4 en CS y CL, utilizando pectina como inductor de la síntesis de pectinasas y, glucosa, sacarosa y ácido

galacturónico como fuentes de carbono y energía. Los resultados muestran una disminución en la producción de exo y endo-pectinasas en CL cuando se adicionó glucosa o sacarosa, mientras que, la productividad incrementó en CS, además de un rápido consumo de las fuentes de carbono, concluyendo que no existe RC para la síntesis de pectinasas en CS.

En 1995, se evaluó la producción de pectinasas por *A. niger* CH4 (Acuña-Argüelles et al., 1995) en CS y CL, utilizando pectina como inductor y sacarosa como fuente de carbono y energía; concluyendo que las pectinasas producidas en CS presentaron mayor estabilidad a pH y temperatura, así como una mayor afinidad al sustrato por parte de la pectin liasa y la endo-pectinasa.

En 1996, Solis-Pereyra et al. compararon la producción de pectinasas por *A. niger* CH4 en CS utilizando concentraciones de glucosa de 100-450 g/L, y encontraron que la síntesis de pectinasa disminuye a concentraciones iniciales de glucosa tan altas como 350 y 450 g/L. Este estudio demostró la capacidad que tiene *A. niger* para metabolizar, en tiempos relativamente cortos (< 48 h), concentraciones muy elevadas de glucosa en CS; lo que demostró la ausencia de inhibición del crecimiento en presencia de altas concentraciones de sustrato en este tipo de cultivo.

En 1998, Favela et al. evaluaron el crecimiento de *A. niger* 10 en tres tipos de cultivo, superficial, sólido y líquido, encontrando distintos perfiles de crecimiento, sobresaliendo el CS por el rápido crecimiento de *A. niger*; además de no inhibirse por las elevadas concentraciones de glucosa utilizadas entre 30-450 g/L.

Estudios posteriores encontraron ventajas similares; por ejemplo, mayor producción de enzimas y baja represión catabólica de la síntesis de tanasa en CS por *A. niger* Aa-20 (Aguilar et al., 2001); mayor consumo y biodegradación de hexadecano por *A. brasiliensis* (*A. niger*) ATCC9642, utilizando concentraciones de 45-180 g/L en CS (Volke-Sepúlveda et al., 2003).

Generalmente, los estudios realizados se enfocan en la producción y determinación de actividad de proteínas específicas, tratando de explicar las ventajas del CS basándose en análisis de proteínas de manera individual. Posteriormente, el uso de la proteómica dio un nuevo panorama para la comprensión de los procesos que se desarrollan en CS. En el 2016, Carrillo-Sancen et al. y Volke-Sepúlveda et al. analizaron el secretoma de *A. niger* 10 y *A. brasiliensis* ATCC9642 expresado en CS, respectivamente. Para el primer estudio, se evaluó la secreción de amilasa en concentraciones crecientes de glucosa con una concentración fija de almidón, encontrando que *A.*

niger 10 secreta proteínas intracelulares y varias isoformas de amilasa. De manera similar, en un segundo estudio de Carrillo-Sancen et al., (2016), identificaron un sistema complejo de proteínas que participan sinérgicamente durante el crecimiento de la célula, en donde una gran proporción de ellas fueron identificadas como proteínas intracelulares. Sin embargo, en nuestro laboratorio no se había utilizado la proteómica como herramienta para establecer algunas diferencias entre los cultivos sólido y líquido y, eventualmente, explicar a que se deben las diferencias hasta ese momento reportadas.

3. JUSTIFICACION

El CL es ampliamente utilizado para fines de investigación y obtención de productos industriales; sin embargo, el CS presenta ventajas en términos de mayor producción y productividad, y menor represión catabólica de algunas enzimas, así como, una menor inhibición del crecimiento por sustrato. A pesar de que estas ventajas del CS se conocen desde hace más de dos décadas, los mecanismos subyacentes no son del todo claros. Esto se debe principalmente a que la mayoría de los estudios comparativos entre ambos sistemas utilizan la producción, productividad o actividad de unas pocas proteínas como variable de respuesta, y extrapolan los resultados a procesos complejos para entender las diferencias entre ambos sistemas de cultivo.

Con el uso de la proteómica se puede obtener información importante para relacionar el secretoma con el estado fisiológico y metabólico de los cultivos bajo diferentes condiciones. Por lo que, el análisis del secretoma de *A. brasiliensis* proveniente de CS y CL aportará información relevante para comprender los mecanismos que permiten que el CS presente algunas ventajas sobre el CL.

4. HIPOTESIS

El análisis secretómico permitirá comprender algunas de las razones por las cuales el cultivo sólido presenta ciertas ventajas sobre el cultivo líquido.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar las proteínas que constituyen el secretoma de *A. brasiliensis* obtenido en CS y CL, para comprender algunas diferencias fisiológicas y metabólicas entre ambos tipos de cultivo.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar cinéticamente el crecimiento de *A. brasiliensis* en CS y CL con diferente concentración de glucosa.
- Obtener el secretoma para cada condición de cultivo para identificar y describir las proteínas que lo conforman, mediante un análisis bioinformático.
- Identificar y discutir las diferencias en los secretomas obtenidos en diferente tipo de cultivo con diferente concentración de glucosa.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepa y conservación

6.1.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa *A. brasiliensis* ATCC9642 (previamente *A. niger* ATCC 9642) (Houseknecht et al., 2008). La cepa se conservó en tubos crioprotectores usando glicerol al 20% (v/v) a -20 °C y liofilizada en ampollitas.

6.1.2. Propagación de la cepa

La propagación de *A. brasiliensis* para la obtención del inóculo se realizó en dos etapas. La primera consistió en la activación de la cepa (preinóculo) y la segunda, la propagación del preinóculo para la obtención del inóculo final.

6.1.2.1. Producción de preinóculo

La activación de la cepa se realizó tomando una crioperla impregnada con esporas conservadas en los tubos crioprotectores con glicerol al 20 % (v/v). La crioperla se colocó en un tubo de ensayo (dimensiones 1.9 cm x 17.5 cm) inclinado con 10 mL de PDA y con tapón de algodón. Una vez colocada sobre la superficie de PDA, fue movida para distribuir las esporas sobre el medio. El cultivo se incubó 7 días a 30 °C.

6.1.2.2. Preparación del inóculo

Al concluir el tiempo de incubación del preinóculo, se adicionaron al tubo inclinado 10 mL de Tween al 0.05% (v/v) estéril; el tubo se agitó ligeramente en un vórtex para desprender las esporas, y a la vez, evitar la ruptura del PDA. De la suspensión concentrada de esporas se tomó 1 mL para inocular un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de PDA (cuadruplicado para cultivo líquido y sextuplicado para cultivo sólido); el cultivo se incubó 7 días a 30 °C. Al término del cultivo, la cosecha de esporas se realizó adicionando 30 mL de Tween al 0.05% (v/v) estéril a uno de los matraces Erlenmeyer con 30 mL de PDA, se agitó ligeramente con agitador magnético estéril durante 1 minuto. Posteriormente, la suspensión obtenida se transfirió al siguiente matraz hasta finalizar con el número de extracciones correspondiente para cada tipo cultivo. La suspensión concentrada de esporas provenientes de los cultivos en matraces Erlenmeyer se utilizó como inóculo para CS y CL, las esporas se contaron en una cámara de Neubauer diluyendo la suspensión de esporas 1/10.

6.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el reportado por Hill y Kafer (2001) con una relación C/N=6. La composición del medio basal es (g/L): Glucosa 20, NaNO₃ 6, KCl 0.52, KH₂PO₄ 0.815, K₂HPO₄ 1.045 y MgSO₄·7H₂O 0.52. Por cada litro de medio se adiciona un mililitro de solución de elementos traza con la siguiente composición basal (g/L): FeSO₄·7H₂O 0.005, EDTA 0.05, ZnSO₄·7H₂O 0.022, H₃BO₃ 0.011, MnCl₂·4H₂O 0.005, CoCl₂·6H₂O 0.0016, CuSO₄·5H₂O 0.0016 y (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.0011, pH=6.5 ajustado con HCl al 10% v/v o NaOH al 10% (p/v). Para mantener la proporción de nutrientes, la concentración de sales se incrementó en la misma proporción que la concentración de glucosa usadas para el estudio.

6.2.1. Cultivo sólido

El CS se realizó utilizando perlita (AGROLita, ACCIMIN S. A. C. V.) como soporte inerte. A continuación, se describe el proceso de acondicionamiento del soporte inerte y la preparación del medio para CS. La perlita fue tamizada con tamices No. 10-20, utilizando la fracción retenida por los tamices del No. 16 y 20 (partícula de 0.84-1.70 mm). Posteriormente, se realizaron tres lavados, los primeros dos con agua corriente y el tercero con agua destilada caliente, para finalmente, escurrirla y deshidratar la perlita a 60 °C hasta tener una humedad menor al 3% (p/p).

6.2.1.1. Esterilización del material

El CS se realizó en columnas de vidrio con diámetro interno de 2.15 cm y longitud de 19.59 ± 0.9 cm. La perlita y las columnas fueron esterilizadas por separado a 120 °C durante 15 minutos. Mientras que, el medio de cultivo fue esterilizado a 94 °C durante 15 minutos.

6.2.1.2. Preparación del cultivo

Para preparar el CS sin importar la concentración de glucosa utilizada, la perlita estéril se mezcló con el medio de cultivo inoculado con $1 \cdot 10^7$ esporas/mL, manteniendo una proporción de 1.8 mL de medio más 0.17 ± 0.04 mL de suspensión de esporas por cada gramo de perlita seca (1.8/0.2/1 (v/v/p)). Después, la perlita humedecida con el medio inoculado se introdujo en las columnas de vidrio y se empacó para tener una densidad de empaque de 0.43 ± 0.03 g/cm³. El volumen ocupado de cada columna fue cercano a 50 ± 3.13 cm³. Las columnas fueron conectadas al sistema de respirometría para el monitoreo de la producción de CO₂ en tiempo real (sección 6.9.5). La tasa de aireación fue de 20 mL/min. Las columnas se incubaron a 30 °C. Al menos cuatro réplicas fueron realizadas para cada condición seleccionada para el análisis del secretoma.

6.2.2. Cultivo líquido

El CL se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Hill y Kafer (2001) esterilizado a 94 °C por 15 minutos. El tamaño del inóculo fue de $1 \cdot 10^6$ esporas/mL de medio. Después de inocular el medio de cultivo para cada condición evaluada, los matraces Erlenmeyer se conectaron al sistema de respirometría para cuantificar la producción de CO₂ en tiempo real. La tasa de aireación fue de 20 mL/min. Los matraces se incubaron a 30 °C y una agitación de 200 rpm. Al menos cuatro réplicas fueron realizadas para cada condición seleccionada para el análisis del secretoma.

6.2.3. Estimación de parámetros cinéticos

A partir de los valores de producción de CO₂ por *A. brasiliensis* ATCC9642, se estimaron los siguientes parámetros: fase lag (h), máxima tasa de producción de CO₂ (MTPCO₂, mgCO₂/h mL), tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2} , 1/h) y tiempo en alcanzar la MTPCO₂ (h). La μ_{CO_2} se estimó ajustando los datos con el modelo exponencial ($f CO_2 = CO_{2(inicial)} e^{\mu t}$). Para el análisis de los datos se realizó una prueba ANOVA de un factor, y posteriormente, una prueba de rango múltiple de Duncan utilizando $\alpha=0.05$. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS versión PASW 23 (IBM SPSS-IBM Corp), al menos ocho réplicas fueron utilizadas.

6.2.4. Cultivos para análisis morfométrico

6.2.4.1. Cultivo sólido

Se realizaron microcultivos en condiciones similares al sistema de columna. La preparación del soporte inerte con el medio de cultivo se realizó bajo las condiciones establecidas previamente (Sección 3.2.1.2), humedeciendo 1 g de perlita, pero sin inocular el medio. Después, se colocó una fracción del soporte inerte humedecido con el medio de cultivo en el centro de un portaobjetos y se inoculó por picadura. El cultivo se cubrió con un cubreobjetos. En seguida, los microcultivos se colocaron sobre una varilla de vidrio dentro de una caja Petri con un papel filtro humedecido con agua destilada y se incubó a 30 °C. El tiempo de cultivo fue el tiempo promedio en alcanzar la MTPCO₂ en las columnas. Al concluir la incubación, se retiraron los portaobjetos de las cajas Petri para ser observados directamente en el microscopio óptico (Olympus Corp. BX 50).

6.2.4.2. Cultivo líquido

El medio de CL se inoculó bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente (Sección 3.2.2). El cultivo se incubó a 30 °C a 200 rpm durante el tiempo necesario para alcanzar la MTPCO₂ (Tabla 3). Al concluir el tiempo de incubación, los *pellets* suspendidos en el extracto final fueron diluidos con un buffer fosfato salino (pH 7.4), a una proporción 1:3 (mL de medio cultivado: mL de buffer fosfato salino); posteriormente, se tomó un *pellet* y se colocó sobre un portaobjetos, cortándolo en cuatro partes con un bisturí y separando las partes con una aguja de disección (Colin et al., 2013), se colocó un cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico (Olympus Corp. BX 50).

6.2.4.3. Captura de imágenes para análisis morfológico de *A. brasiliensis*

Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (Olympus Corp. BX 50), el cual está equipado con una cámara Evolution VF Monochrome Cooled, el tiempo de exposición se configuró a 250 ms y la resolución a 64 bit con el programa Image Pro-Plus. Para ambos cultivos, el enfoque se realizó utilizando el objetivo 10x. Para el análisis de imagen se utilizó el programa ImageJ (NIH, Bethesda MD) calibrado a 1.64 pixeles/μm, usando como estándar la cámara Neubauer. Las imágenes se filtraron con el filtro Variance 3D con los siguientes valores: x/y/z radius=2. Para el análisis de las hifas de ambos cultivos, se consideraron puntas terminales con una longitud mayor a 400 μm.

6.2.4.4. Análisis morfométrico

Se midió la longitud de al menos 30 hifas distales con una longitud mayor a 400 μm. Se contó el número de puntas en zona distal. El nivel de ramificación de las hifas se estimó como: Nivel de ramificación = (No. de puntas/longitud total medida) *100. La cual se expresó como número de puntas por cada 100 μm.

6.3. Recuperación de la proteína extracelular

6.3.1. Cultivo sólido

Una vez alcanzada la MTPCO₂, las columnas fueron desconectadas del sistema de respirometría, a continuación, se les adicionaron 35 mL de buffer Tris-HCl (pH 7.2) frío conteniendo 20 μL de cóctel inhibidor de proteasas (P2714, Sigma-Aldrich). Las columnas fueron enfriadas a 4 °C por 30 minutos para detener el metabolismo microbiano. Posteriormente, el buffer de extracción fue recuperado por vacío. Para incrementar la cantidad de proteína extraída se repitió el paso de extracción con un segundo volumen de 25 mL de buffer Tris-HCl (pH 7.2), manteniendo el contacto entre el buffer de

extracción y el cultivo durante 10 minutos. Al término del tiempo de extracción, los dos extractos recuperados se combinaron y congelaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

6.3.2. Cultivo líquido

Inmediatamente después de registrar la MTPCO₂ en el sistema de respirometría, los matraces se desconectaron, se les adicionaron 20 µL de un cóctel inhibidor de proteasas (P2714, Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 30 minutos para detener el metabolismo microbiano. Terminando el tiempo de enfriamiento, el caldo de cultivo fue filtrado a vacío (papel filtro Whatman 41); el extracto protéico se congeló hasta su procesamiento.

6.3.3. Concentración y diálisis de proteína para análisis secretómico

Los extractos extracelulares de ambos cultivos se descongelaron a temperatura ambiente. Se utilizaron 40 mL de extracto para obtener la proteína para los análisis secretómicos y el resto fue guardado para determinar concentración inicial de proteína y pH. El primer paso realizado para concentrar la proteína del extracto protéico fue eliminar residuos de biomasa y/o soporte inerte (en el caso de CS), centrifugando a 7000 rpm durante 15 minutos. Después, fracciones de 10 mL de extracto extracelular se colocaron en tubos Amicon MWCO 10 kDa de 15 mL y se centrifugaron a 7000 rpm por 15 minutos. Entre cada paso se recuperaron alrededor de 1 y 1.5 mL de solución concentrada. Las cuatro fracciones se juntaron y se les adicionó buffer 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) hasta alcanzar un volumen de 10 mL. A continuación, se colocó en los tubos Amicon MWCO 10 kDa de 15 mL y se centrifugó a 7000 rpm por 15 minutos obteniendo un volumen entre 2-2.5 mL de extracto dializado y concentrado, este paso se repite dos veces más. En el último paso, el volumen recuperado de extracto fue menor a 2 mL. El extracto final fue centrifugado nuevamente a 10000 rpm por 2 minutos para eliminar algún residuo sólido suspendido. Una vez determinada la concentración de proteína (Sección 6.9.4) en el extracto concentrado, se separaron y liofilizaron fracciones con 50 µg de proteína. Estas fracciones fueron utilizadas para la separación por electroforesis para el análisis del secretoma.

6.4. Separación de proteína por SDS-PAGE

Las muestras liofilizadas con 50 µg de proteína de cada condición fueron procesadas con el *kit ReadyPrep 2-D cleanup* (1632130, Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del proveedor. El *pellet* obtenido se solubilizó con 30 µL de buffer Laemmli preparado de acuerdo con el manual de Mini-PROTEAN® Tetra Cell-Bio-Rad (Bio-Rad). La muestra se agitó durante 1 minuto en intervalos de 10

minutos hasta llegar a 30 minutos. Luego, la muestra se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos para separar el material insoluble. Posteriormente, la muestra se calentó a 95 °C (Thermomixer Comfort, Eppendorf) por 5 minutos y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Las proteínas desnaturalizadas y el marcador de peso molecular de 10-250 kDa (Bio-Rad) se colocaron en el SDS-PAGE con 12% de acrilamida (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, Bio-Rad). La electroforesis corrió a 300 V (fuente de poder PowerPac Universal, Bio-Rad) hasta que el frente de corrida alcanzó una distancia de 3 cm; todo esto se realizó en frío. A continuación, el gel se lavó tres veces con agua destilada y se adicionaron 50 mL de reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250 (161-0406, Bio-Rad) para revelar las proteínas presentes en cada muestra. El proceso de tinción se realizó en 1 hora. Al finalizar la tinción, el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua destilada, manteniéndose en agitación en un agitador diagonal durante 10 minutos para eliminar el reactivo Coomassie; se realizó un tercer lavado con agua destilada durante 24 horas bajo agitación constante.

Las imágenes de los geles se capturaron con un foto-documentador GelDoc-EZ (Bio-Rad). Previo a la digestión trípica de las proteínas separadas en los geles SDS-PAGE, cada carril se cortó en tres fracciones de 1 cm (Figura 4); y cada una de ellas se cortó en fracciones ~ 1 mm.

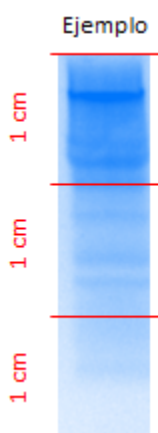


Figura 4. Ejemplo de corte de los carriles del SDS-PAGE para la digestión trípica.

6.5. Digestión trípica

La digestión trípica se realizó en el CINVESTAV Unidad Irapuato siguiendo lo reportado por Shevchenko et al., (2007). Las piezas de gel se lavaron con 200 μ L de agua destilada manteniendo una ligera agitación durante 15 minutos, después se destiñeron con 50 μ L de 100% ACN (acetonitrilo)/ NH_4HCO_3 (1:1 v/v) por 15 minutos, el gel se deshidrató adicionando 50 μ L de ACN al 100% agitando por 15 minutos, después se secó a vacío (Centrivap, Labconco). Las piezas de gel

deshidratadas se rehidrataron con 50 μL de 10 mM DTT (ditiotreitól) en 100 mM NH_4HCO_3 . La reacción de reducción se incubó a 56 °C por 45 minutos; se removió la solución de 10 mM DTT en 100 mM NH_4HCO_3 y las piezas se lavaron con 100% de ACN/100 mM NH_4HCO_3 (1:1, v/v) a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de remover la solución de lavado, las proteínas se alquilaron con 50 μL de 55 mM de iodoacetamida en 100 mM NH_4HCO_3 , la reacción se llevó a cabo en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, las piezas de gel se lavaron con 50% de ACN en 100 mM NH_4HCO_3 por 15 minutos, éstas nuevamente se deshidrataron con 100 % de ACN y se secaron al vacío. A continuación, los fragmentos de gel se rehidrataron con 10 μL de una solución de tripsina de grado de secuenciamiento (Promega, Madison, WI) a una concentración de 10 ng/ μL en 50 mM NH_4HCO_3 incubándose a 4 °C durante 1 hora. Al concluir la rehidratación de los fragmentos de gel, se adicionó 20 μL de 50 mM NH_4HCO_3 para evitar la deshidratación durante la reacción. La digestión triptica se llevó a cabo durante toda la noche a 37 °C. La recuperación de los péptidos en solución se realizó después de centrifugar los fragmentos de gel junto con la solución triptica a 10000 rpm por 2 minutos. Para maximizar la extracción de los péptidos, las piezas de los geles se lavaron primero con 50 μL de 50% ACN en 5% de ácido fórmico y segundo con 100% ACN/5% ácido fórmico (2:1 v/v). En ambos casos se repitió el proceso de centrifugación para recuperar los péptidos. Los sobrenadantes se secaron al vacío y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por LC-MS/MS. Por cada condición se prepararon y analizaron por separado dos réplicas biológicas.

6.6. LC-MS/MS

Después de la digestión triptica, los péptidos obtenidos se disolvieron en 16 μL de una solución al 3% ACN/0.1% ácido fórmico, y se centrifugaron a 10000 rpm por un minuto. Los péptidos fueron separados por cromatografía líquida ultra rendimiento en escala nano (NanoAcquity UPLC, Waters). El análisis de masas se llevó a cabo en un espectrómetro de masas tipo trampa de iones lineal (LTQ) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) y equipado con una fuente de iones *nano electrospray* (*nanoESI*). El proceso de la separación cromatográfica fue el siguiente: a partir de la solución peptídica, se inyectaron 8 μL de la muestra para limpiarla y concentrarla a través de una pre-columna (Symmetry® C18, 5 μm , 180 μm x 20 mm, Waters) usando un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ de 0.1% ácido fórmico durante 1 minuto. Posteriormente, el flujo cambia automáticamente a la columna capilar UPLC (100 μm ID BEH-C18 1.7 μm tamaño de partícula) para separar los péptidos por un gradiente binario (solución A: 0.1% ácido fórmico, solución B: 100% ACN en 0.1% ácido fórmico) con un flujo de 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 35 °C. El gradiente fue programado para que la solución B pasará de 3 a 40 % en 60 minutos, posteriormente en dos minutos llegar hasta 85%, manteniéndose constante

durante 10 minutos, después desciende a 3% en dos minutos y se mantiene por 26 minutos. Los péptidos eluidos entran a la fuente de iones Nano Electrospray del espectrómetro de masas a través de una punta estándar cubierta de sílice (NewObjective, Woburn, MA). El espectrómetro de masas fue operado en modo de adquisición de datos dependiente del precursor con la finalidad de alternar automáticamente entre todos los escaneos (400-1600 m/z) en MS, seguido por la fragmentación y los subsecuentes escaneos Top 5 MS/MS en la trampa de iones lineal con la exclusión dinámica habilitada. La disociación inducida por colisión (CID) empleó helio como gas colisionador con una energía de colisión del 35% y tiempo de activación 10 ms. Para la adquisición de datos se utilizó el programa Xcalibur 2.0.7 software (Thermo Fisher Scientific).

6.7. Análisis bioinformático

Los espectros de masa se obtuvieron con el programa *Proteome Discoverer* versión 1.4 (Thermo-Fisher Scientific) y la búsqueda de los péptidos se realizó con el programa *Sequest* utilizando la información de las secuencias de *Aspergillus brasiliensis* (13042 entradas) obtenidas de la base de datos de *NCBI* (descargada el 9 de febrero del 2017). El programa se configuró de la siguiente manera: carbamido-metilación de cisteína como modificación fija, oxidación de metionina como modificación variable y se consideró la posibilidad de pérdida de sitios de corte (clivaje) hasta un número de 2. La tolerancia al error de masa del precursor fue configurada a 2 Da, y la del fragmento fue de 1 Da, considerando el 1% de tasa de detección falsa (*FDR*) para tener una alta confianza en la identificación de péptidos.

A las proteínas hipotéticas identificadas por *Sequest* se les realizó una búsqueda de ortólogos entre especies, utilizando la herramienta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), específicamente para proteínas (*BLASTp*), que se encuentra en el servidor de *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), limitando la búsqueda sólo con datos de *A. brasiliensis* y *A. niger* (principalmente la cepa CBS 513.88). El porcentaje mínimo de identidad para todas las proteínas fue mayor al 80%. La función de las proteínas identificadas se asignó de acuerdo a la base de datos de *UniProt* (www.uniprot.org) y de *KEGG* (www.genome.jp/kegg). La localización subcelular se identificó con el servidor *WoLF-PSORT* (<http://wolfpsort.org>); mientras que la identificación del péptido señal o la predicción de secreción por mecanismo no convencional fue llevada a cabo con los servidores *SignalP 4.1* (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) y *SecretomeP 2.0* (www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP), respectivamente.

6.8. Clasificación y regulación de proteínas identificadas

Las proteínas identificadas en el secretoma se clasificaron en tres grupos: únicas, abundantes no reguladas y reguladas. Las proteínas únicas fueron consideradas aquellas que sólo se identificaron en una condición para cada tipo de cultivo. Mientras que, la abundancia y la regulación se basó en la cuenta espectral ponderada (CEP) por mL de medio para el CS y CL, el cual se calculó como se indica a continuación:

$$CEP_i = (SpC/L)_i$$

Donde: SpC es la cantidad de espectros de masa para la proteína *i* por mL de extracto proteico y L la longitud estimada (número de aminoácidos) de la proteína *i*. El nivel de regulación de cada proteína con en función de la concentración de glucosa fue estimado al graficar los valores normalizados de la CEP obtenidos para cada condición contra los valores normalizados de la concentración de glucosa. En ambos casos, la normalización fue hecha respecto al máximo valor CEP y la máxima concentración de glucosa. Los datos fueron ajustados con el modelo de regresión de mínimos cuadrados. Las proteínas con $r^2 > 0.75$ fueron consideradas reguladas, y el valor de la pendiente (VP) fue usado para definir si la proteína fue sobre-regulada (VP positiva) o bajo-regulada (VP negativa) (Volke-Sepulveda et al., 2016). Las proteínas con $r^2 < 0.75$ e incluidas en el percentil 90 de todas las proteínas encontradas fueron consideradas como abundantes no reguladas. Debido a la baja concentración de las proteínas incluidas en el percentil 20 que presentaron valores CEP menor a 1.1×10^{-4} para CS y 1.8×10^{-6} para CL no se consideraron para la discusión.

6.9. Procedimientos analíticos

6.9.1. Humedad

Para determinar el contenido de humedad del medio sólido se colocó 1 g de materia húmeda en una termobalanza (Ohaus®, Parsippany, NJ, Estados Unidos). La temperatura de secado fue 130 °C hasta peso constante.

6.9.2. pH

El pH se midió con un potenciómetro (PHS-3BW, Bante instrument). El pH inicial del medio fue ajustado a 6.5 utilizando HCl al 10 % (v/v) o NaCl al 10 % (p/v), de acuerdo con lo requerido.

6.9.3. Glucosa

La glucosa se cuantificó con el *kit* de glucosa oxidasa (SPINREACT, Gerona, España) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

6.9.4. Proteína

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente por el método del ácido bicinonínico (BCA) utilizando *Pierce BCA Protein Assay Kit* (23228, Thermo Scientific), siguiendo el protocolo establecido en el manual del proveedor y utilizando seroalbúmina bovina perteneciente al kit como estándar.

6.9.5. CO₂

Un flujo de aire a 20 mL/min fue alimentado en cada unidad experimental, la concentración de CO₂ en el aire a la salida del cultivo fue usada como medida indirecta del crecimiento celular. El CO₂ del aire fue medido en tiempo real por un sistema de respirometría usado principalmente para CS (Carrillo-Sancen et al., 2016; Martínez-Valdez et al., 2015). El sistema consiste en un sensor de flujo másico (Honeywell, USA) y un sensor infrarrojo para el análisis del CO₂ (United Phosphorus Ltd, India). La adquisición de datos se realiza a través de una plataforma LabView (National Instruments, USA).

6.9.6. Biomasa

En el caso del CL, la biomasa húmeda recuperada por filtración (Whatman 41) fue lavada dos veces con 50 mL de H₂O destilada y cuantificada gravimétricamente en base seca (60 °C, 24 h).

6.10. Análisis estadístico

Los datos para la estimación de parámetros cinéticos asociados a la producción de CO₂ fueron obtenidos a partir de al menos 8 muestras por condición. El nivel de ramificación de las hifas, se determinó mediante el análisis, de al menos, 30 hifas independientes. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor y la comparación de medias fue realizada con una prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0.05$). Las diferencias significativas entre medias, se indican con letras diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS, versión PASW 23 (IBM SPSS-IBM Corp).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en este estudio, los cuales están divididos en dos secciones. En la primera sección se presenta el efecto del incremento de la concentración de glucosa en el medio en cultivo sólido (CS) y líquido (CL) sobre la producción de CO₂, el nivel de ramificación, producción de proteína, y el secretoma. En la segunda sección se presentan los resultados de la comparación de CS y CL bajo una misma concentración de glucosa; lo que permitirá mostrar los efectos específicos causados por el tipo de cultivo sobre *A. brasiliensis*.

7.1. Efecto de la concentración de glucosa sobre parámetros asociados al crecimiento de *A. brasiliensis*

En el primer apartado de este trabajo se presentan los resultados de producción de CO₂, cantidad de proteína producida, nivel de ramificación, y características del secretoma en función de la concentración de glucosa para CS y CL. Estos resultados muestran el efecto del incremento de la concentración de glucosa inicial en el medio sobre la fisiología y metabolismo de *A. brasiliensis*.

7.1.1. Selección de la concentración de glucosa y análisis respirométrico

En una primera etapa se evaluó el efecto de la concentración inicial de glucosa en CL sobre algunos parámetros asociados al crecimiento de *A. brasiliensis*. El objetivo de esta etapa fue seleccionar el rango de concentración inicial de glucosa para cada tipo de cultivo (el cual permita un crecimiento y producción de proteína adecuada para el estudio) y determinar el tiempo de cultivo para la toma de muestras para el análisis del secretoma. Con base en resultados previos (Volke-Sepulveda et al., 2016) se seleccionaron concentraciones iniciales de glucosa de 10 a 180 g/L para la evaluación en CL, ya que a falta de estudios cinéticos con esta cepa y en este tipo de cultivo, un amplio rango de concentraciones de glucosa fue evaluado. En el caso de CS, a concentraciones iniciales de glucosa inferiores a 30 g/L la concentración de proteína extracelular es tan baja que resulta insuficiente para los estudios de proteómica; por otro lado, a concentraciones superiores a 180 g/L, la MTPCO₂ disminuye por inhibición por sustrato (Salgado, 2015).

En las Figuras 5 y 6 se muestra el comportamiento de la tasa de producción de CO₂ y la producción de CO₂ en función del tiempo para ambos tipos de cultivo. En el caso del CL, el tiempo en que se alcanza la MTPCO₂ (Figura 5 y Tabla 3) es similar con concentraciones iniciales de glucosa de 10 a 50 g/L y aumenta con 60 g/L, en cambio, con las concentraciones iniciales de glucosa de 100

y 180 g/L, la $MTPCO_2$ no se alcanza incluso prolongando la duración del cultivo hasta las 90 h. Mientras que, en CS la $MTPCO_2$ se registró alrededor de las 44 h, en todas las concentraciones evaluadas. El máximo valor de la $MTPCO_2$ se obtiene con 60 g/L en CL (Figura 5); y estos valores son similares para las concentraciones de 30 a 50 g/L. Por otro lado, con 180 g/L en condiciones de CS se obtiene el máximo valor de la $MTPCO_2$. La producción final de CO_2 aumenta en función de la concentración inicial de glucosa para ambos cultivos, obteniendo el máximo valor en el medio con 60 g/L para el caso de CL (Figura 5 y Tabla 3), y para el CS, en el medio con 180 g/L de glucosa (Figura 6 y Tabla 3). El tiempo *lag*, estimado a través de la producción de CO_2 , no presenta diferencias significativas para las concentraciones de 10 a 60 g/L en CL y de 30 a 180 g/L en CS, manteniéndose en un promedio de 22 ± 2.37 h. El tiempo *lag* en CL para concentraciones iniciales de glucosa de 100 y 180 g/L fue mayor (Tabla 3). La producción de biomasa fue sólo medida en CL, y su perfil es similar al de la producción de CO_2 ; es decir, la producción de biomasa aumenta al incrementar la concentración inicial de glucosa hasta 60 g/L, en donde alcanzó su máximo valor (Tabla 3). En cuanto a la utilización de glucosa, está fue consumida en un porcentaje mayor al 95% con 10-60 g/L CL; mientras que, en los cultivos con concentración inicial de glucosa de 100 y 180 g/L el consumo es deficiente. Además de los problemas de inhibición, tiempos prolongados en alcanzar la $MTPCO_2$ y larga duración de la fase *lag*, que presentaron las condiciones de 100 y 180 g/L, se observó presencia importante de crecimiento pardo (Figura 7), provocando células con muy diversos estados fisiológicos en el matraz, lo que impide la toma de muestras en estados fisiológicos bien definidos para el estudio del secretoma.

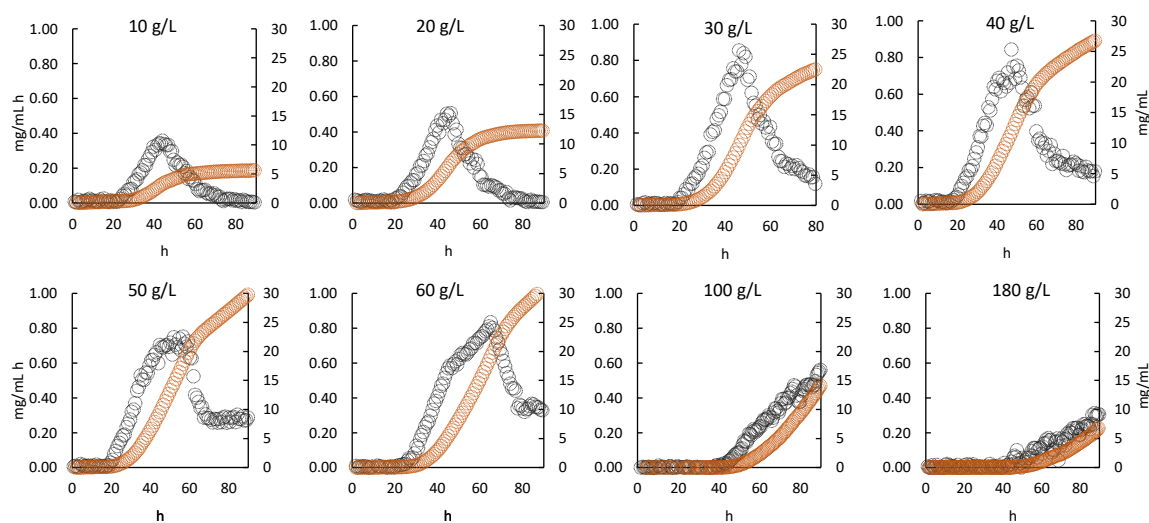


Figura 5. Tasa de producción de CO_2 (círculos negros) y producción de CO_2 (círculos cafés) de *A. brasiliensis* ATCC9642 en cultivo líquido con concentraciones de glucosa de 10 a 180 g/L.

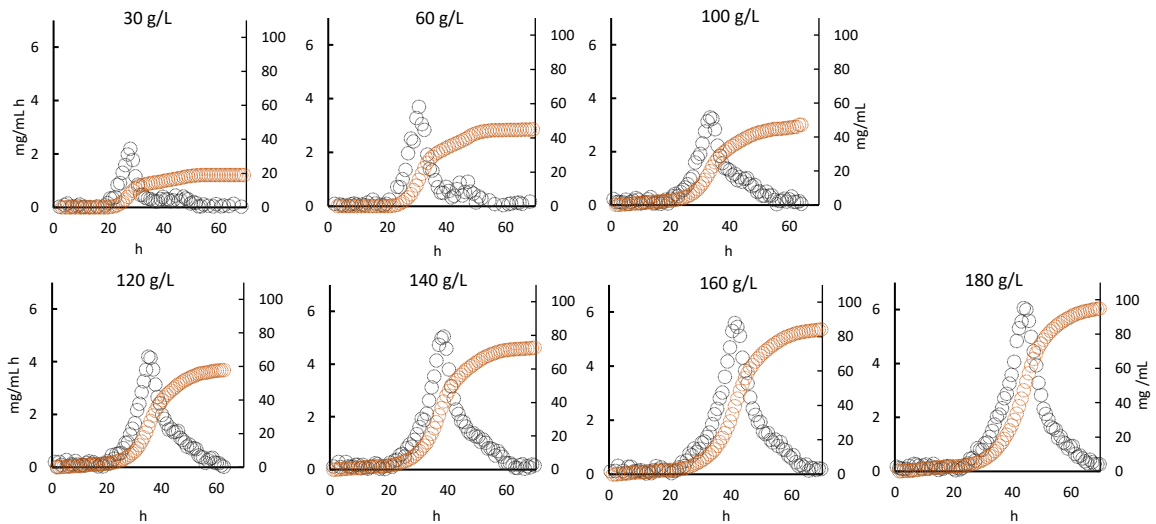


Figura 6. Tasa de producción de CO₂ (círculos negros) y producción de CO₂ (círculos cafés) por *A. brasiliensis* ATCC9642 en cultivo sólido con concentraciones de glucosa de 30 a 180 g/L.

Tabla 3. Parámetros estimados a partir de la producción de CO₂ en cultivos líquido y sólido (Salgado, 2015).

Cultivo	Glucosa (g/L)	Tiempo de cultivo (h)	Fase Lag (h)	Tiempo en obtener la MTPCO ₂ (h)	CO ₂ final (mg CO ₂ /mL)	Glucosa final (g/L)	X (mg/mL)
CL	10	74.86 ± 10.86	26.95 ± 0.84	40.90 ± 3.41	3.73 ± 1.74	0.14 ± 0.28	3.82 ± 0.32
	20	74.83 ± 11.11	22.54 ± 1.77	46.71 ± 4.58	9.11 ± 2.68	0.25 ± 0.50	7.47 ± 0.56
	30	71.64 ± 15.84	20.63 ± 3.61	48.55 ± 4.74	15.20 ± 7.52	0.38 ± 0.77	9.03 ± 1.23
	40	74.98 ± 11.35	20.39 ± 4.17	49.14 ± 7.32	19.14 ± 6.87	1.10 ± 1.55	12.20 ± 2.46
	50	84.51 ± 0.65	19.47 ± 2.17	51.59 ± 1.12	27.91 ± 1.34	2.87 ± N. D.*	16.24 ± N. D.*
	60	91.81 ± 0.09	25.97 ± 3.85	65.97 ± 3.76	31.52 ± 1.82	0.00 ± 0.00	17.71 ± 1.74
	100	90.86 ± 0.06	45.07 ± 3.24	N. D	14.46 ± 0.55	55.80 ± 0.49	11.63 ± 0.11
	180	90.94 ± 0.06	60.17 ± 12.23	N. D	7.06 ± 4.81	115.25 ± 3.92	8.49 ± 1.52
CS	30	70.94 ± N. D.*	18.69 ± N. D.*	27.86 ± N. D.*	18.82 ± N. D.*	N.D.	N. D.
	60	71.03 ± N. D.*	23.36 ± N. D.*	30.69 ± N. D.*	44.58 ± N. D.*	N. D.	N. D.
	100	63.30 ± 1.12	21.24 ± 1.82	33.32 ± 0.06	84.40 ± 2.98	N. D.	N. D.
	120	62.66 ± 0.06	20.57 ± 0.65	35.57 ± 0.65	106.15 ± 2.26	N. D.	N. D.
	140	70.36 ± 0.06	21.99 ± 1.24	37.82 ± 1.12	128.04 ± 24.88	N. D.	N. D.
	160	70.36 ± 0.06	21.74 ± 0.65	41.32 ± 0.06	154.50 ± 6.93	N. D.	N. D.
	180	70.36 ± 0.53	22.52 ± 0.23	44.41 ± 0.53	140.41 ± 15.05	N. D.	N. D.

MTPCO₂= Máxima tasa de producción de CO₂; X=biomasa. * Sólo se estimó con una réplica, los datos que no presentan (*) son el promedio de al menos dos réplicas.

Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron las concentraciones iniciales de glucosa de 20, 40 y 60 g/L para CL y 60, 120 y 180 g/L para CS. En el caso de CL, la proteína extracelular obtenida es suficiente para los análisis posteriores (cuantificación y separación de proteína > 50 µg) y 60 g/L es la máxima concentración de glucosa que permite un estado fisiológico

homogéneo dentro del cultivo. Para CS, los datos observados previamente (Figura 7 y Tabla 3) ayudaron a considerar algunos puntos para la selección de las concentraciones mencionadas. La selección de 60 g/L como concentración mínima para el CS, permitió una comparación directa con CL y observar el efecto del tipo de cultivo. La concentración de 180 g/L fue la máxima concentración donde se alcanza el máximo valor de MTPCO₂, y finalmente, la concentración de 120 g/L fue una condición intermedia entre los dos puntos.



Figura 7. Cultivo líquido con 100 g/L (imagen izquierda) y 180 g/L (imagen derecha), los círculos rojos muestran la biomasa crecida en la pared del matraz a las 90 horas.

Además de haber seleccionado el intervalo de concentraciones de glucosa para los estudios del secretoma, los estudios cinéticos permitieron establecer el tiempo de MTPCO₂ para cada condición de cultivo (tipo de cultivo y concentración inicial de glucosa). Es importante recordar que este tiempo, aquel en el que se alcanza la MTPCO₂, fue seleccionado como criterio para la toma de muestras para los estudios del secretoma.

Los rangos seleccionados de glucosa para el estudio del secretoma se encuentran dentro rangos utilizados en el estudio del crecimiento de *A. niger* (Favela et al., 1998). En dicho estudio se evaluaron concentraciones de 30-200 g/L y 50-450 g/L de glucosa para el CL y el CS, respectivamente. Las concentraciones de biomasa obtenidas en CL fueron similares a nuestros resultados (Tabla 3), *A. niger* alcanzó una producción de 10, 14 y 12 g/L usando 30, 50 y 100 g/L en CL, respectivamente. También, el consumo de glucosa obtenido por *A. brasiliensis* en este trabajo (Tabla 3) es muy similar a lo obtenido para *A. niger* en estudios previos (consumió el 99, 95 y 58% a 30, 50 y 100 g/L de glucosa inicial, respectivamente). El bajo consumo de glucosa y la baja producción de biomasa a concentraciones altas de glucosa en CL se asocia a problemas de inhibición en estas dos variables, los cuales son solucionados con el uso del CS, el cual permite utilizar

concentraciones de hasta 450 g/L (Favela-Torres et al., 1998; Solís-Pereyra et al., 1996). Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron obtenidos por Carrillo-Sancen et al., 2016; quienes demostraron que *A. niger* 10 produce una mayor concentración de proteína en medios con 20 g/L de almidón (inductor) complementado con 20 o 40 g/L de glucosa (fuente de carbono) en condiciones de CL; pero a partir de concentraciones mayores a 80 g/L de glucosa, la producción de proteína fue mayor en CS. Se ha reportado que en CS, la producción de biomasa y de proteína aumentan al incrementar las concentración de glucosa inicial en el medio de cultivo (Solís-Pereira et al., 1993, Gomes et al., 2018; Viniegra-González y Favela-Torres, 2006). Esto hace que diversos grupos de investigación empleen altas concentraciones de fuente de carbono en CS. Como ejemplo de ello, a continuación se cita el rango de concentración inicial de fuente de carbono usado por diversos autores: 50 a 450 g/L de glucosa (Favela-Torres et al., 1998), 300 y 400 g/L de glucosa (Gutiérrez-Rojas et al., 1995), 45 a 180 g/L de hexadecano (Volke-Sepúlveda et al., 2003) y 20 g/L de almidón con 80 o 180 g/L de glucosa (Carrillo-Sancen et al., 2016).

En resumen, las concentraciones de 20, 40 y 60 g/L y 60, 120 y 180 g/L de glucosa para el CL y el CS respectivamente, fueron seleccionadas para el análisis del secretoma. Además, la cuantificación de proteína en la MTPCO₂ proveniente de los cultivos con 20 y 40 g/L en CS, permitió demostrar que la alta producción de proteína por esta cepa, no es exclusiva del CS (0.05 ± 0.21 y 5.2 ± 4.49 µg/mL, respectivamente).

Una vez seleccionado el rango de concentración inicial de glucosa para cada tipo de cultivo e identificado el tiempo de muestreo, se realizaron cultivos con réplicas experimentales y temporales (biológicas) para obtener los extractos extracelulares para el análisis del secretoma (Tabla 4, sección 7.1.3). Como se demostró anteriormente, los parámetros cinéticos (Figs. 5 y 6, y Tabla 3) y la producción de proteína extracelular (Figura 9) en CS y CL presentan diferencias importantes; tanto por el tipo de cultivo, como por la concentración inicial de glucosa (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros medidos en la máxima tasa de producción de CO₂ en ambos cultivos con diferentes concentraciones de glucosa (cultivos para obtención de muestra para el análisis secretómico).

Cultivo	Glucosa (g/L)		Tiempo de muestreo (h)	Fase Lag (h)	MTPCO ₂ (mg/mL h)	CO ₂ producido mg CO ₂ /mL	µCO ₂ (1/h)	n
	Inicial	Final						
CL	20	1.00 ± 1.35 ^A	53.20 ± 2.47 ^A	28.76 ± 2.25 ^A	0.50 ± 0.06 ^A	5.58 ± 0.56 ^A	0.14 ± 0.01 ^A	25
	40	8.75 ± 0.60 ^B	55.46 ± 3.10 ^{AB}	24.50 ± 2.36 ^{BC}	0.70 ± 0.13 ^{AB}	11.47 ± 1.94 ^B	0.10 ± 0.01 ^B	16

Cultivo	Glucosa (g/L)		Tiempo de muestreo (h)	Fase Lag (h)	MTPCO ₂ (mg/mL h)	CO ₂ producido mg CO ₂ /mL	μCO ₂ (1/h)	n
	Inicial	Final						
	60	7.94 ± 0.50 ^B	62.16 ± 6.55 ^C	23.92 ± 3.11 ^B	0.78 ± 0.12 ^B	17.36 ± 3.41 ^C	0.08 ± 0.02 ^C	9
	60	0.68 ± 0.57 ^A	38.53 ± 1.34 ^D	26.00 ± 1.54 ^C	2.38 ± 0.34 ^C	14.64 ± 2.08 ^D	0.25 ± 0.04 ^D	23
CS	120	0.46 ± 0.28 ^A	47.58 ± 1.98 ^E	27.81 ± 1.15 ^A	4.63 ± 0.39 ^D	36.48 ± 4.49 ^E	0.19 ± 0.02 ^E	10
	180	0.77 ± 0.43 ^A	56.80 ± 2.82 ^B	32.33 ± 2.85 ^D	6.97 ± 0.73 ^E	65.28 ± 3.53 ^F	0.16 ± 0.01 ^F	8

MTPCO₂= máxima tasa de producción de CO₂, μCO₂= Tasa específica de producción de CO₂, n= número de muestras. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de un factor con prueba de rango múltiple de Duncan (α = 0.05)).

Uno de los parámetros evaluados y considerado relevante para la toma de muestra fue la MTPCO₂ (Tabla 4), el tiempo en alcanzar este punto incrementa en función de la concentración de glucosa para ambos cultivos, presentando diferencias significativas entre todas las condiciones de CS, y entre 20 y 60 g/L del CL. El valor de la MTPCO₂ es 8.93 veces mayor en 180 g/L (CS) al compararse con 60 g/L en CL, y al igual que el tiempo de muestreo, tiende a elevar su valor al incrementar la concentración de glucosa inicial y sólo existen diferencias significativas en CS.

También, el CO₂ producido en el punto de muestreo, incrementó en función de la concentración de glucosa para ambos cultivos con diferencias significativas entre las condiciones (Tabla 4), no obstante, la mayor producción fue identificada con 120 y 180 g/L. En cambio, la μCO₂ disminuyó al incrementar la glucosa en el medio, mostrando un descenso del 71 y 61 % en CL y CS, respectivamente. De igual manera que los otros parámetros, esta resultó mayor en CS, teniendo un incremento de 3.17 veces comparando la misma concentración de glucosa de ambos cultivos.

Por otro lado, la fase *lag* de producción de CO₂ no presentó diferencias significativas al comparar los resultados entre CS y CL (Tabla 4), sin embargo, la tendencia en función de la concentración es distinta para cada tipo de cultivo. En el caso del CS, esta incrementó hasta 6 horas al elevar la concentración de glucosa a 180 g/L; mientras que, disminuye 4 horas en la máxima concentración para CL, lo que indica que elevar las concentraciones favorece a una germinación temprana de las esporas en CL. Esta respuesta también es observada con *A. niger* 10, en CL, inició su crecimiento exponencial a las 10 h, en cambio para el CS, fue a las 20 h (Favela-Torres et al., 1998).

A pesar de las diferencias cinéticas entre ambos cultivos, el muestreo en la MTPCO₂ permitió la comparación del secretoma en un estado fisiológico similar entre condiciones y tipos de cultivo evaluados, ya que, si se considera el mismo tiempo de cultivo para el CS y CL, se estaría comparando

estados de crecimiento distintos (Favela-Torres et al., 1998). Además, el muestreo en el tiempo en que se obtienen la $MTPCO_2$ evita la presencia de proteínas intracelulares asociadas al envejecimiento celular, ya que el crecimiento de *A. brasiliensis* en este punto se encuentra en fase exponencial (Carrillo-Sancen et al., 2016; Volke-Sepulveda et al., 2016; Jami et al., 2010).

Los tiempos en que se alcanza el punto de muestreo son cortos y proporcionales al incremento de la concentración en el medio en CS, como previamente se reportó (Volke-Sepulveda et al., 2016). Su comparación con los tiempos de muestreo obtenidos en CL indicó que el crecimiento de *A. brasiliensis* es más rápido en CS, a pesar de las altas concentraciones utilizadas; un resultado similar fue reportado con *A. niger*, que alcanzó su máxima producción de biomasa a las 40 h con 450 g/L de glucosa en CS, mientras que, con 200 g/L en CL, la máxima producción se logró a las 70 h (Favela-Torres et al. 1998). Por otro lado, Aguilar et al., (2001) reportaron que la máxima producción de biomasa se alcanzó a las 20 y 32 h para el CS y CL, respectivamente, usando glucosa a 200 g/L y ácido tánico a 25 g/L.

El rápido crecimiento en CS se puede asociar a un acelerado consumo de glucosa determinado indirectamente por los altos valores de la $MTPCO_2$ y la μCO_2 . Estos resultados podría indicar un elevado proceso catabólico (oxidación de la glucosa) por parte de *A. brasiliensis* como previamente se reportó (Volke-Sepulveda et al., 2016) usando similares concentraciones de glucosa; mientras que, los procesos anabólicos (síntesis de la pared celular: glucanos, quitina y mananos (Gastebois et al., 2009) asociados a la biosíntesis de biomasa en CL son sugeridos debido a los bajos valores de la $MTPCO_2$. Ya que se ha identificado que a concentraciones menores de 100 g/L de ácido tánico, *A. niger* produce 2-4 veces más biomasa en CL que en CS (Aguilar et al., 2001).

La concentración de glucosa cuantificada al final del cultivo (Tabla 4), también demostró que en CS hay una mejor y rápida oxidación de la glucosa, lo cual, nuevamente es soportado por los altos valores de la $MTPCO_2$ y μCO_2 . Esto se debe generalmente a la alta transferencia de oxígeno observada en CS (Viniestra-González et al., 2003), que disminuye la RC y la inhibición por sustrato (Maeda et al., 2004). Sin embargo, esta última afirmación no es totalmente cierta, ya que en ambos cultivos, la μCO_2 disminuyó al elevar la glucosa en el medio, semejante a lo reportado con *A. niger* (Favela-Torres et al., 1998) y *A. brasiliensis* (Volke-Sepulveda et al., 2016). Con *A. niger*, la μ de crecimiento disminuyó el 68% y 27% para el CL (30-200 g/L) y el CS (50-200 g/L), respectivamente. En cuanto a *A. brasiliensis*, la μCO_2 descendió el 50% en CS (Volke-Sepulveda et al., 2016), mientras que, en nuestro estudio el descenso fue del 42 y el 38% para CL y CS, respectivamente. Estos

resultados sugieren que la inhibición por sustrato no es totalmente nula en CS (Volke-Sepulveda et al., 2016).

A pesar de identificar una ligera inhibición por la concentración del sustrato en ambos cultivos, las altas concentraciones favorecieron la producción de CO₂, la cual resultó elevada en 120 y 180 g/L en CS; en cambio, la comparación de 60 g/L entre ambos cultivos, indican una menor producción en CS, siendo 1.19 veces mayor en CL (Tabla 4); sin embargo, al comparar la máxima producción de CO₂ obtenida en CL con 120 y 180 g/L, resultó representar el 47.59% y 26.59% de lo producido en estas dos condiciones, respectivamente. Incrementar la concentración de glucosa no sólo favorece la producción de proteína, sino que también la producción de CO₂ a una alta velocidad, lo que indica un rápido crecimiento y consumo de glucosa por parte de *A. brasiliensis*.

Por lo tanto, los resultados de la producción de CO₂ demostraron que el CS permite un rápido crecimiento de *A. brasiliensis*, a pesar de las elevadas concentraciones de glucosa. También, se demostró que elevar la glucosa a altas concentraciones en el medio en condiciones de CS favorece la producción de metabolitos, como es el CO₂ y la concentración de proteína, la cual es discutida en la siguiente sección.

7.1.2. Morfología de crecimiento de *A. brasiliensis* en cultivos sólido y líquido

La secreción de proteína está relacionada con una alta producción de biomasa, pero a la vez, con un alto nivel de ramificación de las hifas de los hongos filamentosos (Gomes et al., 2018). Lo que hace que la morfología sea un parámetro relevante durante ciertos procesos, como la secreción de proteína. Algunos reportes demostraron que la secreción de proteína es influenciada por el crecimiento micelial que desarrollan los hongos filamentosos en CS (Cunha et al., 2012; Domingues et al., 2000; Singhania et al., 2009). El CS favorece al crecimiento filamentosos para una mayor colonización de la superficie sólida y penetración del micelio en el sustrato, invadiendo completamente la matriz, facilitando así el consumo de nutrientes. Por otra parte, el crecimiento de micelio aglomerado llamado *pellet*, desarrollado generalmente en CL, limita el transporte de nutrientes provocando un metabolismo deficiente que evita el desarrollo de zonas apicales (Gomes et al., 2018).

Ya establecidas las diferencias cinéticas y cuantificada la proteína extracelular (Figura 9) en ambos cultivos, éstas fueron asociadas con cambios en el nivel de ramificación que presenta *A. brasiliensis* en cada condición (Figura 9), por lo cual se evaluó el número de zonas apicales distales

a lo largo de una longitud determinada de hifa en ambos cultivos. Para el CL, se tomaron muestras en forma *pellet*, y fueron fraccionadas. Por otro lado, la toma de muestras directamente de los biorreactores (columnas de vidrio) del CS fue imposible, ya que el micelio sufría daño al momento de extraerlo. Por lo que se realizaron microcultivos (ver sección 6.2.4.1) para el análisis morfométrico de *A. brasiliensis*.

De manera cualitativa (Figura 8), el incremento de la concentración de glucosa indujo a una mayor ramificación en las hifas de *A. brasiliensis* en CS, sobresaliendo la condición de 180 g/L; mientras que, no se observaron diferencias entre las condiciones evaluadas en CL. Esto mismo es observado cuantitativamente (Figura 9), a partir de la determinación del número de puntas por cada 100 μm de hifas terminales, lo que permitió identificar la relación que hay entre la ramificación y la proteína secretada, bajo el efecto de la concentración de glucosa.

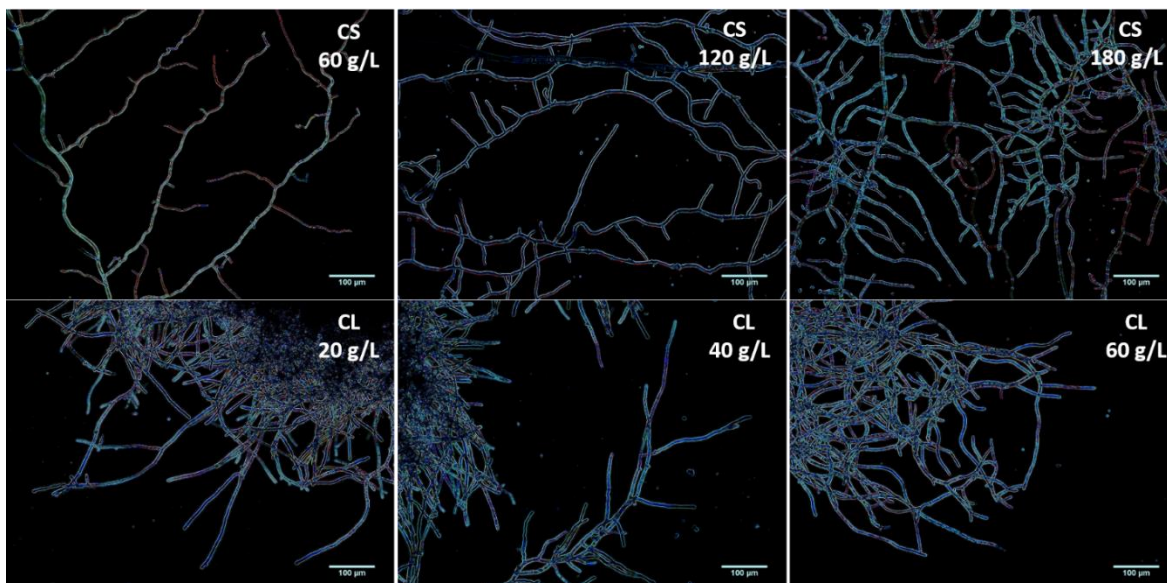


Figura 8. Ramificación de *A. brasiliensis* en cultivo sólido y líquido con tres concentraciones de glucosa en muestras tomadas al tiempo de la máxima tasa de producción de CO_2 (MTPCO₂). Se utilizó el programa *ImageJ* modificando la imagen con el filtro *Variance3D* para mejorar la definición de las hifas. Barra blanca =100 μm .

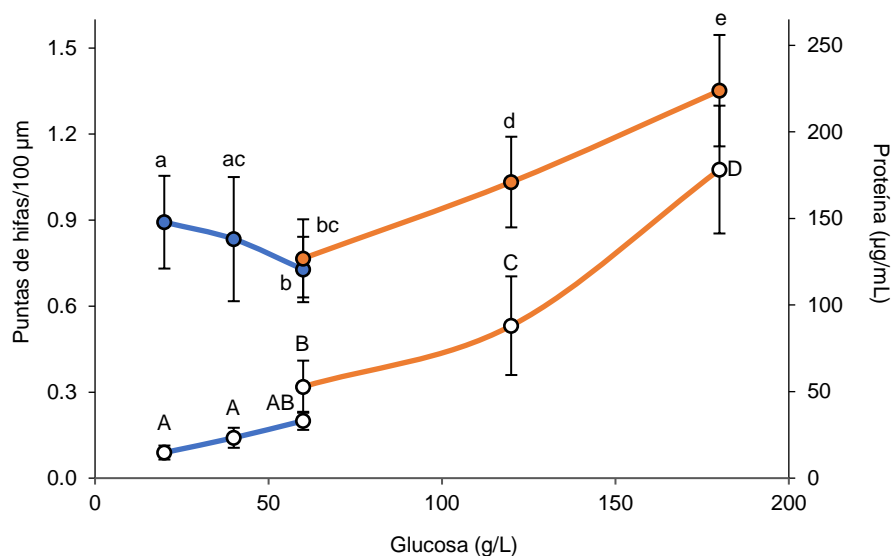


Figura 9. Nivel de ramificación de las hifas de *A. brasiliensis* y producción de proteína en función de la concentración de glucosa. Círculos abiertos: concentración de proteína; círculos cerrados: nivel de ramificación; línea naranja: cultivo sólido; línea azul: cultivo líquido. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de un factor con prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0.05$)).

En CL, el nivel de ramificación descendió significativamente (18%) al elevar la concentración a 60 g/L; mientras que la secreción de proteína incrementó sin presentar diferencias significativas entre las tres condiciones (Figura 9). Por otra parte, existe una relación positiva entre la proteína secretada y el nivel de ramificación en CS (Figura 9), ambas incrementaron el 237.47 y 76.31%, respectivamente, al compararse 180 g/L con 60 g/L. Estos datos permitieron establecer que hay una relación entre el nivel de ramificación y la secreción de proteína (Gomes et al., 2018), únicamente en condiciones de CS. La independencia de estas dos variables en condiciones de CL, se ha reportado por Bocking et al., (1999) usando *A. oryzae*; por el contrario, *Neurospora crassa* al encontrarse hiper-ramificada favoreció la secreción de proteína en CL (Lee et al., 1998). Es importante considerar que la secreción de proteína no es influenciada únicamente por el grado de ramificación, sino que, también se ve afectada por cambios en la temperatura, la luz, perturbaciones/daños físicos, cambios en la fuente de nutrientes, así como, la presencia de hifas adyacentes (Riquelme et al., 2011).

Se ha mencionado que en CS, hay un mayor interacción entre el soporte/medio con el hongo (M. et al., 2016), lo que permite un crecimiento apical sobre y dentro de las partículas sólidas sugiriendo un mayor desarrollo de puntas para la toma de nutrientes. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que el tipo de cultivo no afecta el nivel de ramificación y la cantidad de proteína secretada bajo una misma concentración de glucosa inicial, como sucede con la producción

de CO₂, previamente descrita. Por otra parte, las altas concentraciones de glucosa (120 y 180 g/L) indujeron un mayor desarrollo de zonas de crecimiento apical a lo largo de la hifa, lo que podría favorecer la alta secreción de proteína, la toma de nutrientes, la reproducción, así como, la fusión de hifas para el intercambio de nutrientes y señalización entre hifas de la misma colonia (Gomes et al., 2018; Harris, 2008). Variables externas como el pH, la temperatura, la agitación (Ahamed y Vermette, 2009) y la delección de genes (Wang et al., 2015) han sido manipuladas en ciertos hongos filamentosos para el desarrollo de un mayor número de zonas apicales, incrementado así, la concentración de proteína extracelular (Read, 2011). Se ha reportado que una mutante de *A. oryzae* incrementa su ramificación al elevar la concentración de glucosa (Müller et al., 2002), así como, la delección de *creA* también hiper-ramificó las hifas de *A. oryzae* en un medio con glucosa a 40 g/L en CL (Agger et al., 2002); y se demostró, que las hifas desarrollan una mayor ramificación en cultivo superficial cuando se utiliza un medio rico en nutrientes que en un medio mínimo (Dynesén y Nielsen, 2003).

A partir de la información reportada y de nuestros resultados, dos puntos fueron deducidos por los cuales *A. brasiliensis* desarrolla hifas con un mayor grado de ramificación a altas concentraciones de glucosa en CS. El primer punto, es que las altas concentraciones de nutrientes estimulan la ramificación para lograr una mayor asimilación de éstos, así reduciendo la RC en CS debido a un mayor número de sitios de contacto con la fuente de carbono; y segundo, que exista una inactivación total o parcial del factor de transcripción CreA, permitiendo el incremento de la ramificación, este factor de transcripción participa en la RC, sin embargo, no tiene un efecto relevante en CS (Ichinose et al., 2018). El crecimiento apical no sólo es estimulado por los factores mencionados, sino que también la acumulación de zinc o de ERO's pueden tener un efecto sobre el nivel de ramificación hifal (Harris, 2008). Además, se debe tener en cuenta que la secreción de proteína también es realizada en los septos (Hayakawa et al., 2011), lo que indica que a mayor longitud o número de hifas habrá mayor secreción.

Por lo tanto, las altas concentraciones de glucosa tuvieron un efecto positivo sobre la producción de CO₂, la concentración de proteína inicial y el nivel de ramificación de *A. brasiliensis* en CS. Mientras que, a pesar de las diferencias físicas entre el CS y CL, no hay un efecto significativo sobre las variables mencionadas comparando a 60 g/L para ambos cultivos; no obstante, la expresión del perfil proteico es distinto para cada tipo de cultivo, los cuales son descritos en la siguiente sección.

7.2. Separación unidimensional del secretoma de *A. brasiliensis* en cultivos sólido y líquido

Una vez establecidas algunas diferencias cinéticas y morfométricas de *A. brasiliensis* en CS y CL con concentraciones crecientes de glucosa, se procedió al análisis del secretoma. Para ello, los extractos extracelulares obtenidos en el tiempo de incubación en el que se alcanza la MTPCO₂ para cada condición fueron procesados para la preparación de muestras. Los perfiles electroforéticos de las proteínas muestran reproducibilidad en las bandas de proteína en los carriles obtenidos para cada concentración de glucosa y tipo de cultivo (Figura 10 y 11). Por lo que, las proteínas separadas en cada uno de los carriles fueron procesadas para su análisis por espectrometría de masas (Ver Sección 6.6).

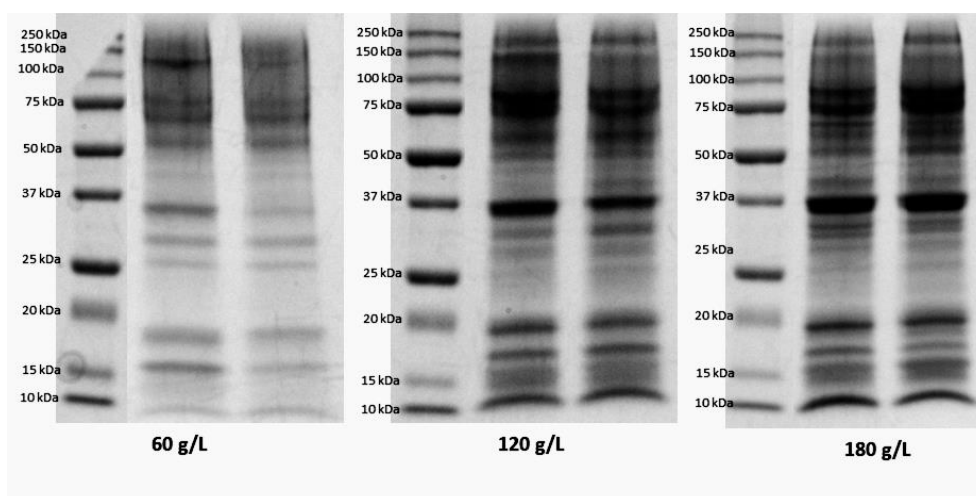


Figura 10. Separación de 50 µg de proteína extracelular proveniente de cultivo sólido en geles SDS-PAGE (T=12%), Voltaje a 300 V, marcador de peso molecular: 10-250 kDa.

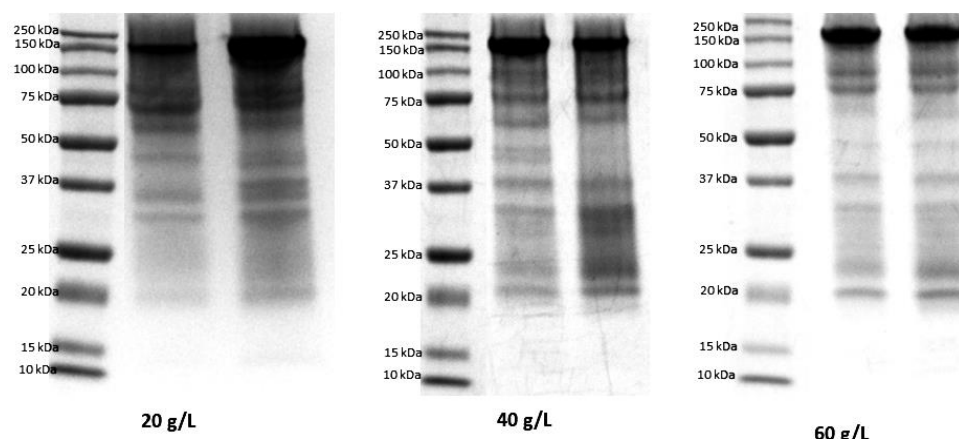


Figura 11. Separación de 50 µg de proteína extracelular proveniente de cultivo líquido en geles SDS-PAGE (T=12%), Voltaje a 300 V, marcador de peso molecular: 10-250 kDa.

Adicionalmente, las proteínas presentes en CS se encuentran distribuidas entre 10 a 250 kDa; mientras que, en CL, no se observaron proteínas de bajo peso molecular (<20kDa). Las proteínas extracelulares de *A. terreus* mostraron un comportamiento similar, las cuales se encontraron entre 17 a 115 kDa en CS, mientras que, en CL, se presentó un menor número de bandas que fue variable entre rangos cortos (M. et al., 2016). También, Liu et al., (2013) reportaron un número bajo de bandas y una distribución dispersa a lo largo del carril de las proteínas extracelulares de *A. fumigatus* en condiciones de CL.

Por lo tanto, podemos ver claramente que las diferencias entre los perfiles proteicos de ambos sistemas se encuentran en el número y distribución de las bandas, por lo que se espera un secretoma complejo de *A. brasiliensis* en condiciones de CS. Estas observaciones serán discutidas a continuación, al comparar el secretoma de ambos tipos de cultivo.

7.3. Descripción del secretoma de *A. brasiliensis* en cultivo sólido y líquido

Una vez demostrada la reproducibilidad de los extractos extracelulares obtenidos en CS y CL con concentraciones crecientes de glucosa en las réplicas biológicas y experimentales, se procedió al análisis del secretoma obtenido en las diferentes condiciones de cultivo. Las secuencias de péptidos obtenidas de las proteínas presentes en el extracto extracelular de ambos cultivos se compararon con las de las bases de datos *UniProt* y *NCBI*, limitando la búsqueda a *A. niger* CBS 513.38 y *A. brasiliensis* CBS 101740. Para lograr una mayor cantidad de información de cada una de las proteínas identificadas, sus secuencias fueron analizadas en diversas bases de datos (Sección 6.7).

Los resultados demostraron que la secreción de proteínas por *A. brasiliensis* fue mayor en CS que en CL (Figura 9), principalmente con 120 y 180 g/L. La concentración de proteína extracelular en CS con concentraciones iniciales de glucosa de 120 y 180 g/L fue 1.7 y 3.4 veces mayor, respectivamente, que la obtenida con 60 g/L. Por su parte, el análisis secretómico indicó que el incremento de glucosa favoreció la secreción de una mayor diversidad de proteínas hasta 2.87 veces mayor con 180 g/L que las obtenidas con 60 g/L. En CL, el número de proteínas identificadas en el secretoma es significativamente menor que las identificadas en CS. En los medios con concentraciones de glucosa inicial de 20 y 40 g/L el número de proteínas únicas fue 46 y 43, respectivamente, aumentando hasta 56 proteínas en 60 g/L. La Figura 12 muestra las diferencias en los patrones de secreción de las proteínas únicas. Para el caso del CL, sólo se identificaron proteínas únicas con 20 y 60 g/L, teniendo el mayor número en 60 g/L. Mientras que, en CS, la identificación de proteínas únicas está en función de la concentración de glucosa, teniendo el máximo número en

180 g/L. Nuestros resultados indican que existe una alta diversidad de proteínas en CS, lo que resulta opuesto al primer estudio comparativo del secretoma de *A. oryzae* obtenido en CS y CL, realizado por Oda et al., (2006). Ellos sugirieron mayor número de proteínas secretadas en CL, a partir de la identificación de un mayor número de *spots* en 2D-PAGE. También, demostraron los distintos mecanismos de secreción para cada cultivo, lo que hace que los perfiles de proteínas secretadas sean distintos para cada cultivo. Una de las diferencias entre nuestro estudio y el reportado por Oda et al., (2006) es el estado fisiológico del hongo, dicho estudio tomó la muestra al mismo tiempo de cultivo, sin considerar que los perfiles de crecimiento son distintos entre ambos cultivos.

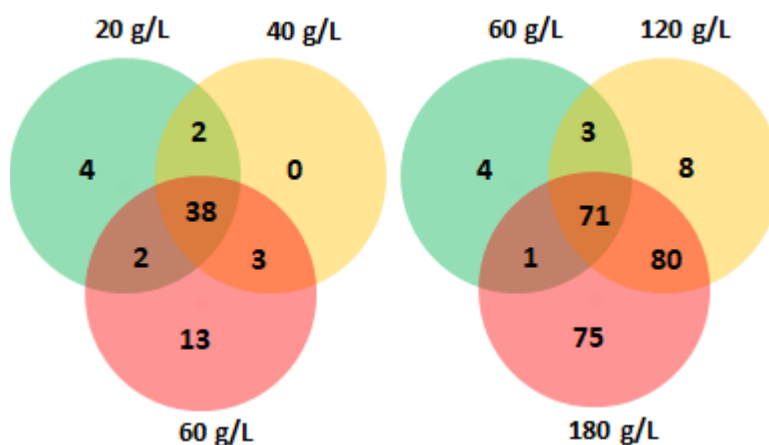


Figura 12. Diagrama de Venn del secretoma de *A. brasiliensis* ATCC9642 en cultivo líquido (imagen izquierda) y en cultivo sólido (imagen derecha).

La Figura 13, muestra la relación positiva que hay entre el número de proteínas secretadas en CS con la concentración de proteína inicial y con el nivel de ramificación de las hifas de *A. brasiliensis*. En cambio, en CL, el número de proteínas identificadas es totalmente independiente de estas variables, así como, de la concentración de glucosa inicial. Previamente, se mencionó que hay una relación entre la concentración de proteína y la ramificación de las hifas, la cual incrementa a mayor concentración de glucosa (Müller et al., 2002); sin embargo, algunos estudios no encontraron una relación entre la concentración de proteína y el nivel de ramificación (Bocking et al., 1999), como sucede en CL.

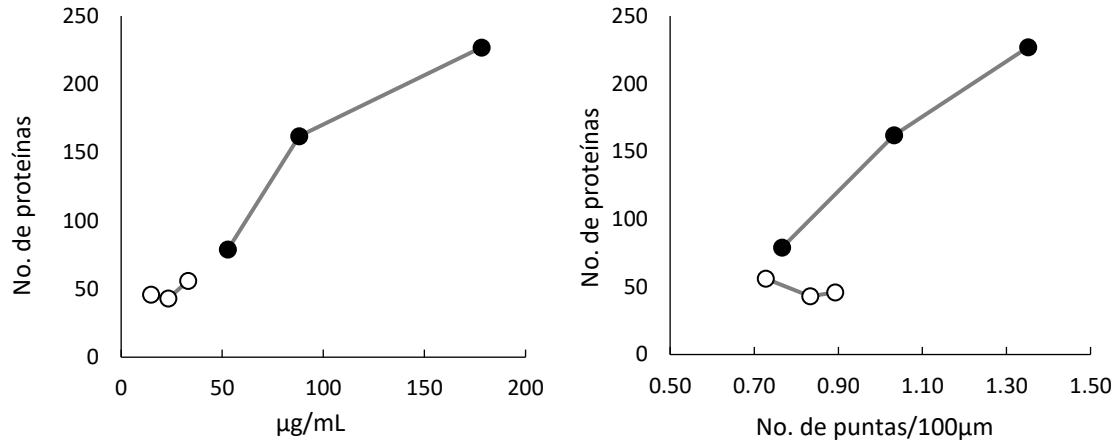


Figura 13. Número de proteínas identificadas en función de la concentración de glucosa inicial (imagen izquierda); número de proteínas identificadas en función del nivel ramificación (imagen derecha). Círculos llenos (●): cultivo sólido; círculos vacíos (○): cultivo líquido.

El análisis secretómico identificó un total de 242 y 62 proteínas en CS y CL, respectivamente. Estas proteínas se clasificaron como únicas, abundantes no reguladas y abundantes reguladas (Tabla 5). Esta clasificación permitió analizar el efecto del incremento de la concentración de glucosa sobre el secretoma. A su vez, las proteínas se agruparon de acuerdo a la función principal establecida en las bases de datos utilizadas (CS/CL): metabolismo de carbohidratos (74/28), redox/ estrés (35/9), proceso/componente celular (26/6), proteínas/ proteólisis (21/5), aminoácidos (16/3), lípidos (10/0), nucleótidos (8/0), energía (6/0), misceláneos (28/4) y proteínas no caracterizadas (20/7) (Figura 14, Tabla 5 y Anexo 1).

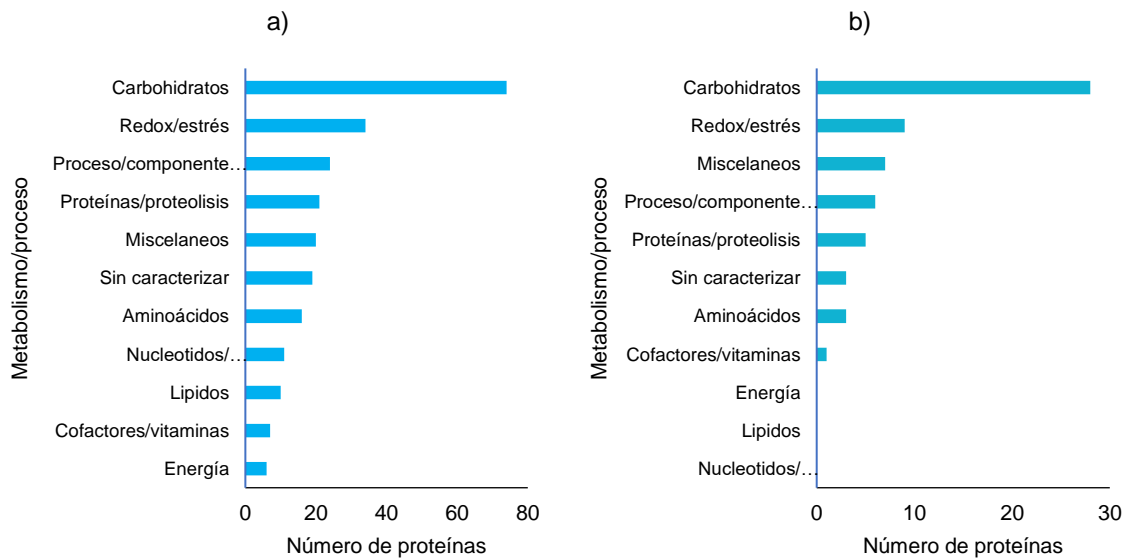


Figura 14. Metabolismo/proceso principal de las proteínas identificadas en ambos cultivos; a) cultivo sólido, b) cultivo líquido.

En ambos cultivos, un alto porcentaje de proteínas fue asociado con los metabolismos de carbohidratos y redox/estrés. A diferencia de lo observado en CS, en CL no se identificaron proteínas relacionadas con los metabolismos de energía, lípidos y nucleótidos. La cuantificación relativa determinada por el valor CEP permitió tener una idea de la abundancia dentro del extracto extracelular (Tabla 5, Anexo 2), e identificar cuales presentan una mayor abundancia para cada metabolismo/función (Anexo 2). En resumen, la alta concentración de glucosa en CS favoreció la secreción de proteína, tanto en concentración como en diversidad que, a su vez, se relacionaron con un mayor índice de ramificación en CS que en CL. A continuación, se presenta información detallada de las proteínas presentes en el secretoma de *A. brasiliensis* en ambos tipos de cultivo.

Tabla 5. Proteínas identificadas y clasificadas del secretoma de *A. brasiliensis* en cultivo líquido y sólido.

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
Proteínas únicas en CL (20 g/L)											
XP_001392640.1	Endoglucanasa-4	Carbohidratos	3.2.1.4	E	Extra	5.33E-07	0.00E+00	0.00E+00	5.33E-07	-1.50	0.75
XP_001400902.1	Endoglucanasa A	Carbohidratos	3.2.1.4	E	Extra	1.87E-06	0.00E+00	0.00E+00	1.87E-06	-1.50	0.75
XP_001399223.1	Endo-1,3(4)-β-glucanasa	Carbohidratos	3.2.1.6	E	Extra	7.94E-07	0.00E+00	0.00E+00	7.94E-07	-1.50	0.75
OJJ75131.1	HP ASPBRDRAFT_53082	ND	Enzima	E	Extra	2.54E-07	0.00E+00	0.00E+00	2.54E-07	-1.50	0.75
Proteínas únicas en CL (60 g/L)											
XP_001389342.1	Tirosinasa	Aminoácidos	1.14.18.1	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	2.02E-06	2.02E-06	1.50	0.75
XP_001389884.1	L-asparaginasa	Aminoácidos	3.5.1.1	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	1.29E-06	1.29E-06	1.50	0.75
XP_001391302.1	Malato deshidrogenasa	Carbohidratos	1.1.1.37	E	Mito	0.00E+00	0.00E+00	1.01E-06	1.01E-06	1.50	0.75
XP_001393626.1	α-amilasa	Carbohidratos	3.2.1.1	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	6.52E-07	6.52E-07	1.50	0.75
XP_001389956.2	Glucan endo-1,6-β-glucosidasa BGN16.3	Carbohidratos	3.2.1.75	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	5.93E-07	5.93E-07	1.50	0.75
XP_001400266.1	Proteína enriquecida en serina extracelular	Carbohidratos		E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	9.09E-07	9.09E-07	1.50	0.75
OJJ66423.1	HP ASPBRDRAFT_49057	ND	Enzima	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	1.90E-06	1.90E-06	1.50	0.75
OJJ78081.1	HP ASPBRDRAFT_167552	ND		E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	1.44E-06	1.44E-06	1.50	0.75
OJJ66434.1	HP ASPBRDRAFT_666063	ND		E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	2.88E-06	2.88E-06	1.50	0.75
XP_001389120.1	Proteína como reductasa	Redox	1.1.1.-	E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	2.39E-06	2.39E-06	1.50	0.75
XP_001388595.1	Catalasa R	Redox/Carbohidratos/ aminoácidos/estrés	1.11.1.6	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	7.03E-07	7.03E-07	1.50	0.75
XP_001394119.2	Aldehído reductasa 1	Redox/Lípidos	1.1.1.21	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.75E-06	1.75E-06	1.50	0.75
XP_001402471.1	Purina nucleósido permeasa	Transporte/Procesos celulares		E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	1.83E-06	1.83E-06	1.50	0.75
Proteínas únicas en CS (60 g/L)											
XP_001395879.1	Inulinasa	Carbohidratos	3.2.1.7	E	Extra	8.22E-06	0.00E+00	0.00E+00	8.22E-06	-1.50	0.75
XP_001399078.1	Enolasa	Carbohidratos	4.2.1.11	E	Cito	1.60E-05	0.00E+00	0.00E+00	1.60E-05	-1.50	0.75
OJJ67062.1	HP ASPBRDRAFT_347736	ND		E	Extra	1.94E-04	0.00E+00	0.00E+00	1.94E-04	-1.50	0.75
OJJ66216.1	HP ASPBRDRAFT_138427	ND		I	Extra	5.47E-06	0.00E+00	0.00E+00	5.47E-06	-1.50	0.75
Proteínas únicas en CS (120 g/L)											
XP_001402325.1	Pectinesterasa A	Carbohidratos	3.1.1.11	E	Extra	0.00E+00	2.26E-05	0.00E+00	2.26E-05	0.00	0.00
XP_001397549.1	aldo/ceto reductasa	Cofactores y vitaminas	1.1.1.65	I	Cito	0.00E+00	3.31E-05	0.00E+00	3.31E-05	0.00	0.00
OJJ70333.1	Mono- y diacilglicerol lipasa	Lípidos	3.1.1.34	E	Extra	0.00E+00	5.96E-05	0.00E+00	5.96E-05	0.00	0.00
XP_001394208.2	6-Fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilante 1	Misceláneos/señalización/proceso celular/transporte	1.1.1.44	I	Cito	0.00E+00	5.41E-05	0.00E+00	5.41E-05	0.00	0.00
OJJ66777.1	HP ASPBRDRAFT_137377	ND		E	Extra	0.00E+00	1.12E-04	0.00E+00	1.12E-04	0.00	0.00
XP_001392987.1	Carboxipeptidasa Y	Proteólisis	3.4.16.5	E	Extra	0.00E+00	1.33E-05	0.00E+00	1.33E-05	0.00	0.00
XP_001401510.1	Endopeptidasa ctsD tipo aspártico	Proteólisis/proteínas	3.4.23.1	E	Extra	0.00E+00	1.75E-05	0.00E+00	1.75E-05	0.00	0.00
XP_001397476.1	CipB oxidorreductasa unión a zinc	Redox	1.3.1.-	E	Cito	0.00E+00	2.92E-05	0.00E+00	2.92E-05	0.00	0.00
Proteínas únicas en CS (180 g/L)											
XP_001393985.2	Proteína Nrd1 unión a RNA	Ácidos nucleicos		E	Nucl	0.00E+00	0.00E+00	4.23E-05	4.23E-05	1.50	0.75
GAQ45375.1	Proteína de reparación por escisión UV	Ácidos nucleicos		E	Nucl	0.00E+00	0.00E+00	9.20E-05	9.20E-05	1.50	0.75
XP_001388823.2	antígeno nuclear de células proliferantes	Ácidos nucleicos		I	Nucl	0.00E+00	0.00E+00	1.06E-04	1.06E-04	1.50	0.75
XP_001399877.1	Homoserina deshidrogenasa	Aminoácidos	1.1.1.3	I	Extra	0.00E+00	0.00E+00	2.65E-04	2.65E-04	1.50	0.75
XP_001392906.1	3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa	Aminoácidos	1.1.1.31	I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	6.24E-05	6.24E-05	1.50	0.75
XP_001396334.2	aril-alcohol deshidrogenasa	Aminoácidos	1.1.1.90	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	9.60E-04	9.60E-04	1.50	0.75

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
XP_001402519.4	Tirosinasa	Aminoácidos	1.14.18.1	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	5.74E-05	5.74E-05	1.50	0.75
XP_001396247.1	Fosforibosiltransferasa ATP	Aminoácidos	2.4.2.17	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	4.76E-04	4.76E-04	1.50	0.75
EHA19736.1	6-fosfogluconato deshidrogenasa	Aminoácidos	2.4.2.28	I	Cito_ Mito	0.00E+00	0.00E+00	7.64E-05	7.64E-05	1.50	0.75
XP_001398731.2	Similar a Glutati6n S-transferasa Ure2 1-(5-Fosforibosil)-5-[[5-	Aminoácidos	2.5.1.18	E	Mito	0.00E+00	0.00E+00	3.36E-04	3.36E-04	1.50	0.75
XP_001398393.1	Fosforibosilamino] metilideneamino] imidazola-4-carboxamida isomerasa	Aminoácidos	5.3.1.16	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	7.49E-05	7.49E-05	1.50	0.75
XP_001400684.1	Proteína de la familia alanina racemasa	Aminoácidos	Enzima	E	Mito	0.00E+00	0.00E+00	1.77E-04	1.77E-04	1.50	0.75
XP_001391209.1	Alcohol deshidrogenasa	Carbohidratos	1.1.1.1	E	Mito	0.00E+00	0.00E+00	9.11E-05	9.11E-05	1.50	0.75
XP_001397074.1	L-xilulosa reductasa	Carbohidratos	1.1.1.10	E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.11E-04	1.11E-04	1.50	0.75
XP_001391440.1	L-xilulosa reductasa	Carbohidratos	1.1.1.10	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	2.50E-04	2.50E-04	1.50	0.75
XP_001390140.2	manitol 2-deshidrogenasa	Carbohidratos	1.1.1.67	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	7.99E-05	7.99E-05	1.50	0.75
XP_001396580.2	Formato deshidrogenasa	Carbohidratos	1.1.7.1.9	I	Pero	0.00E+00	0.00E+00	1.60E-04	1.60E-04	1.50	0.75
XP_001397271.1	Riboquinasa	Carbohidratos	2.7.1.15	E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.56E-04	1.56E-04	1.50	0.75
XP_001388941.1	6-Fosfogluconolactonasa	Carbohidratos	3.1.1.31	E	Mito	0.00E+00	0.00E+00	6.13E-04	6.13E-04	1.50	0.75
XP_001395336.1	Feruloil esterasa C	Carbohidratos	3.1.1.73	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	3.72E-04	3.72E-04	1.50	0.75
XP_001394024.1	β -glucosidasa M	Carbohidratos	3.2.1.21	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	3.99E-05	3.99E-05	1.50	0.75
XP_001389622.1	β -galactosidasa E	Carbohidratos	3.2.1.23	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	4.06E-05	4.06E-05	1.50	0.75
XP_001391662.1	Formamidasa	Carbohidratos	3.5.1.49	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	9.04E-05	9.04E-05	1.50	0.75
XP_001397850.1	Glucosa-6-fosfato isomerasa	Carbohidratos	5.3.1.9	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.42E-04	1.42E-04	1.50	0.75
OJJ70774.1	HP ASPBRDRAFT_56532/ Fosfomanomutasa	Carbohidratos	5.4.2.8	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.32E-04	1.32E-04	1.50	0.75
XP_001402447.1	Inositol-3-fosfato sintasa	Carbohidratos	5.5.1.4	E	Cito Nucl/ nucl	0.00E+00	0.00E+00	7.43E-05	7.43E-05	1.50	0.75
OJJ74849.1	HP ASPBRDRAFT_40067	Carbohidratos	Enzima	I	Cito_ nucl	0.00E+00	0.00E+00	5.27E-04	5.27E-04	1.50	0.75
XP_001393983.1	Citrato sintasa	Carbohidratos/Lípidos/Cofactores y vitaminas	2.3.3.16	I	Pero	0.00E+00	0.00E+00	5.24E-05	5.24E-05	1.50	0.75
XP_001397686.1	Subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMPc	Carbohidratos/proteínas		E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.26E-04	1.26E-04	1.50	0.75
XP_001392218.1	Aminotransferasa, clase V	Cofactores y vitaminas	2.6.1.-	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.63E-04	1.63E-04	1.50	0.75
XP_001388657.1	Proteína relacionada a tiamina pirofosfoquinasa	Cofactores y vitaminas	2.7.6.2	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.42E-04	1.42E-04	1.50	0.75
XP_001401701.1	Proteína de la familia fosfato adeniltransferasa-panteteína	Cofactores y vitaminas	2.7.7.3	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	9.31E-05	9.31E-05	1.50	0.75
OJJ71066.1	HP ASPBRDRAFT_126631	Cofactores y vitaminas		E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.37E-04	1.37E-04	1.50	0.75
XP_001390926.2	Oxidorreductasa dependiente de FAD	Cofactores y vitaminas/misceláneos	1.5.1.37	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.28E-04	1.28E-04	1.50	0.75
XP_001390302.2	Componente Sec8 del complejo de exocitosis	Componente celular		I	Nucl	0.00E+00	0.00E+00	6.06E-05	6.06E-05	1.50	0.75
OJJ65940.1	HP ASPBRDRAFT_35578	Componente celular		I	Plas	0.00E+00	0.00E+00	3.37E-05	3.37E-05	1.50	0.75
OJJ74700.1	HP ASPBRDRAFT_459120	Energía	Enzima	I	Cito/ Golg	0.00E+00	0.00E+00	1.50E-04	1.50E-04	1.50	0.75
XP_001392647.1	<i>Hsp88</i>	estrés /ácidos nucleicos		I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	2.57E-05	2.57E-05	1.50	0.75
XP_001398224.1	<i>Hsp</i>	estrés /Aminoácidos		I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	3.25E-04	3.25E-04	1.50	0.75

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
XP_001392293.1	Glicerol dehidrogenasa Gcy1	Lípidos	1.1.1.-	E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	5.53E-05	5.53E-05	1.50	0.75
XP_001393532.1	Lipasa	Lípidos	3.1.1.3	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	8.33E-05	8.33E-05	1.50	0.75
XP_001393442.1	Lisofosfolipasa 1	Lípidos	3.1.1.5	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	1.32E-04	1.32E-04	1.50	0.75
XP_001393366.1	2-ácido haloalcanoico deshalogenasa	Misceláneos	3.8.1.2	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.17E-04	1.17E-04	1.50	0.75
OJJ76051.1	HP ASPBRDRAFT_38420 /Regulador de transcripción PAB1642	Misceláneos /cofactores y vitaminas		I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	1.71E-04	1.71E-04	1.50	0.75
OJJ78194.1	HP ASPBRDRAFT_203008	ND	Enzima	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	4.85E-05	4.85E-05	1.50	0.75
OJJ70000.1	HP ASPBRDRAFT_56749	ND	Enzima	E	Mito	0.00E+00	0.00E+00	1.85E-04	1.85E-04	1.50	0.75
OJJ75701.1	HP ASPBRDRAFT_38007	ND	Enzima	I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	4.80E-04	4.80E-04	1.50	0.75
XP_001393389.1	HP ANI_1_54084	ND		E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	2.88E-04	2.88E-04	1.50	0.75
OJJ68162.1	HP ASPBRDRAFT_33455	ND		E	Cito_ Mito	0.00E+00	0.00E+00	2.22E-04	2.22E-04	1.50	0.75
OJJ69948.1	HP ASPBRDRAFT_45261	ND		E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	2.94E-04	2.94E-04	1.50	0.75
OJJ74684.1	HP ASPBRDRAFT_39873	ND		I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	2.94E-04	2.94E-04	1.50	0.75
OJJ75468.1	HP ASPBRDRAFT_51220	ND		E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	2.31E-04	2.31E-04	1.50	0.75
XP_001391100.1	HP ANI_1_8064	ND		I	Cito_ nucl	0.00E+00	0.00E+00	7.46E-04	7.46E-04	1.50	0.75
OJJ69753.1	HP ASPBRDRAFT_131175	ND		E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	1.01E-04	1.01E-04	1.50	0.75
OJJ70578.1	HP ASPBRDRAFT_128823	ND		I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	2.12E-04	2.12E-04	1.50	0.75
OJJ68161.1	HP ASPBRDRAFT_199302	ND		I	Cysk	0.00E+00	0.00E+00	1.75E-04	1.75E-04	1.50	0.75
XP_001396184.1	Uridilato quinasa	Nucleótidos	2.7.4.14	I	Nucl	0.00E+00	0.00E+00	1.23E-04	1.23E-04	1.50	0.75
XP_001392148.1	Guanilato quinasa	Nucleótidos	2.7.4.8	I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	2.26E-04	2.26E-04	1.50	0.75
XP_001393901.1	uracil-DNA glycosilasa	Nucleótidos	3.2.2.27	E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.48E-04	1.48E-04	1.50	0.75
XP_001399596.1	Proteína de la familia dienelectona hidrolasa	Proceso celular	Enzima	I	Cito	0.00E+00	0.00E+00	3.02E-04	3.02E-04	1.50	0.75
XP_001393178.1	Proteína de la familia dienelectona hidrolasa	Proceso celular	Enzima	E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	3.15E-04	3.15E-04	1.50	0.75
XP_001399260.2	Proteína crn1 similar a coronina	Proceso celular		E	Mito	0.00E+00	0.00E+00	6.08E-05	6.08E-05	1.50	0.75
XP_001401121.1	Proteína de control celular (Cwf8)	Proceso celular		E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	9.51E-05	9.51E-05	1.50	0.75
XP_001402270.2	Proteína en defectuosa nedilación de culina 1	Proceso celular		I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	1.57E-04	1.57E-04	1.50	0.75
OJJ73826.1	HP ASPBRDRAFT_120976	Proceso celular		E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	8.59E-05	8.59E-05	1.50	0.75
XP_001397530.1	epóxido hidrolasa	Proteínas	3.3.2.9	I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	1.30E-04	1.30E-04	1.50	0.75
XP_001400609.1	Disulfuro isomerasa	Proteínas	5.3.4.1	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	7.35E-05	7.35E-05	1.50	0.75
XP_001399237.1	X-Pro dipeptidil-peptidasa (Familia S15)	Proteólisis	3.4.14.5	E	Cito_ nucl	0.00E+00	0.00E+00	4.86E-05	4.86E-05	1.50	0.75
XP_001396351.1	Endopeptidasa opsB tipo aspártico	Proteólisis	3.4.23.-	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	5.93E-05	5.93E-05	1.50	0.75
XP_001388485.2	Endopeptidasa aspártica AP1	Proteólisis	3.4.23.12	E	Nucl	0.00E+00	0.00E+00	6.93E-05	6.93E-05	1.50	0.75
OJJ66423.1	HP ASPBRDRAFT_49057	Proteólisis/proteínas	Enzima	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	2.30E-04	2.30E-04	1.50	0.75
XP_001388583.1	Proteína dominio de unión a FAD	Redox	1.5.3.-	E	Extra	0.00E+00	0.00E+00	1.03E-04	1.03E-04	1.50	0.75
XP_001389279.1	Tiorredoxina reductasa	Redox	1.8.1.9	E	Cito	0.00E+00	0.00E+00	1.43E-04	1.43E-04	1.50	0.75
XP_001391200.1	Glutación S-transferasa	Redox/estrés/aminoácidos	2.5.1.18	I	Mito	0.00E+00	0.00E+00	2.01E-04	2.01E-04	1.50	0.75
XP_001397810.1	Proteína vip1	Señalización		E	Nucl	0.00E+00	0.00E+00	1.19E-04	1.19E-04	1.50	0.75

Proteínas abundantes no reguladas en CS

60 y 120 g/L

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
XP_001394158.2	Glucanasa de pared celular	Carbohidratos	Enzima	E	Extra	1.27E-05	2.65E-05	0.00E+00	3.92E-05	-0.72	0.23
XP_001398728.2	Multicobre oxidase	Misceláneos	1.10.-.-	E	Extra	1.20E-05	2.33E-05	0.00E+00	3.53E-05	-0.77	0.27
XP_001389767.1	Lacasa-1	Redox	1.10.3.2	E	Extra	9.85E-06	1.09E-05	0.00E+00	2.08E-05	-1.35	0.67
60, 120 y 180 g/L											
XP_001402053.1	α-glucosidasa	Carbohidratos	3.2.1.20	E	Extra	8.56E-05	7.12E-05	2.63E-04	4.20E-04	1.01	0.69
OJJ70100.1	HP ASPBRDRAFT_45424 /Isopululanasa	Carbohidratos	3.2.1.57	E	Extra	1.24E-04	1.10E-04	2.48E-04	4.82E-04	0.75	0.66
OJJ73275.1	HP ASPBRDRAFT_40942/ Nitrilasa	Proceso celular /carbohidratos	3.5.5.1	E	Mito	2.86E-05	1.04E-03	6.88E-04	1.75E-03	0.96	0.42
GAQ46904.1	YkgB	Proceso celular /energía /aminoácidos		E	Extra	1.25E-03	9.33E-04	3.03E-03	5.21E-03	0.88	0.62
OJJ67831.1	HP ASPBRDRAFT_134466	Redox/estrés/señalización/ trasducción	1.2.3.-	E	Extra	6.16E-05	5.60E-05	1.14E-04	2.32E-04	0.69	0.67
60 y 180 g/L											
XP_001391138.1	Glucosa oxidasa	Carbohidratos/redox	1.1.3.4	E	Extra	9.86E-06	0.00E+00	4.39E-05	5.38E-05	1.16	0.55
Proteínas abundantes no reguladas en CL											
20 y 40 g/L											
XP_001388522.1	Endo-1,4-β-xilanas A	Carbohidratos	3.2.1.8	E	Extra	5.06E-06	1.53E-05	0.00E+00	2.03E-05	-0.50	0.11
20, 40 y 60 g/L											
AGI04246.1	Glucosa oxidasa	Carbohidratos	1.1.3.4	E	Nucl	3.49E-06	2.16E-06	5.81E-06	1.15E-05	0.60	0.39
XP_001398728.2	Multicobre oxidase	Redox	1.10.-.-	E	Extra	5.58E-07	5.02E-07	6.95E-07	1.75E-06	0.30	0.48
XP_001388621.1	Catalasa R	Redox/carbohidratos/aminoácidos /estrés	1.11.1.6	E	Extra	2.29E-06	1.71E-06	2.72E-06	6.72E-06	0.23	0.17
OJJ72358.1	HP ASPBRDRAFT_42048 / D-6-hidroxinicotina oxidasa	Cofactores y vitaminas	1.5.3.6	E	Extra	8.47E-07	6.72E-07	1.31E-06	2.83E-06	0.53	0.49
XP_001399628.1	Endopoligalacturonasa C	Carbohidratos	3.2.1.15	E	Extra	3.89E-06	5.49E-06	3.81E-06	1.32E-05	-0.02	0.00
XP_001398816.1	β-glucosidasa A	Carbohidratos	3.2.1.21	E	Extra	9.76E-07	5.25E-07	5.93E-07	2.09E-06	-0.59	0.62
XP_001390530.1	Glucoamilasa	Carbohidratos	3.2.1.3	E	Extra	2.08E-04	5.42E-05	7.45E-05	3.37E-04	-0.96	0.64
XP_001390410.1	Glucan endo-1,3-β-glucosidasa egIC	Carbohidratos	3.2.1.39	E	Extra	1.46E-05	6.26E-06	1.05E-05	3.14E-05	-0.42	0.24
XP_001397982.2	Endoglucanasa A	Carbohidratos	3.2.1.4	E	Extra	2.76E-06	8.38E-07	1.05E-06	4.65E-06	-0.93	0.66
XP_001389998.1	α-L-arabinofuranosidasa axhA	Carbohidratos	3.2.1.55	E	Extra	6.26E-06	7.05E-06	6.79E-06	2.01E-05	0.11	0.43
XP_001392475.1	Glucan 1,3-β-glucosidasa	Carbohidratos	3.2.1.58	E	Extra	8.47E-07	7.11E-07	9.70E-07	2.53E-06	0.19	0.23
XP_001389996.2	Endo-1,4-β-xilanas F1	Carbohidratos	3.2.1.8	E	Extra	9.27E-06	8.40E-06	1.15E-05	2.92E-05	0.29	0.49
XP_001390847.1	Tripeptidil-peptidasa sed2	Proteólisis/transporte	Enzima	E	Extra	1.20E-06	1.29E-06	1.18E-06	3.67E-06	-0.03	0.04
GAQ44118.1	Celulasa extracelular CelA/Alérgeno Asp F7	Carbohidratos	Enzima	E	Mito	4.07E-07	4.02E-07	4.09E-07	1.22E-06	0.01	0.04
XP_001394158.2	Glucanasa de pared celular	Carbohidratos	Enzima	E	Extra	1.73E-06	1.37E-06	1.93E-06	5.04E-06	0.16	0.13
OJJ67200.1	HP ASPBRDRAFT_59193	Misceláneos	Enzima	E	Extra	1.64E-06	6.69E-07	1.17E-06	3.48E-06	-0.43	0.23
XP_001394372.1	Proteína de dominio de unión a FAD	Redox	Enzima	E	Extra	2.84E-06	5.75E-07	1.01E-06	4.43E-06	-0.96	0.58
OJJ73062.1	HP ASPBRDRAFT_53305	ND		E	Extra	5.00E-06	1.23E-05	9.30E-06	2.66E-05	0.52	0.34
20 y 60 g/L											
XP_001402325.1	Pectinesterasa A	Carbohidratos	3.1.1.11	E	Extra	1.32E-06	0.00E+00	6.65E-07	1.98E-06	-0.74	0.25
OJJ74465.1	HP ASPBRDRAFT_27493	ND	Enzima	E	Extra	2.12E-06	0.00E+00	1.45E-06	3.57E-06	-0.47	0.09
40 y 60 g/L											
OJJ71409.1	HP ASPBRDRAFT_127351	ND		E	Cito	0.00E+00	1.97E-05	1.78E-05	3.76E-05	1.36	0.67
Proteínas reguladas en CS											

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
120 y 180 g/L											
XP_001396639.1	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metiltiopenteno dioxigenasa	Aminoácidos	1.13.11.54	I	Cito	0.00E+00	3.61E-05	3.35E-04	3.71E-04	1.50	0.83
XP_001389935.1	Tirosinasa	Aminoácidos	1.14.18.1	E	Extra	0.00E+00	2.16E-05	1.35E-04	1.57E-04	1.50	0.87
XP_001401406.1	Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada	Aminoácidos	2.6.1.42	I	Mito	0.00E+00	5.18E-05	1.48E-04	2.00E-04	1.50	0.97
XP_001397565.2	treonina sintasa	Aminoácidos	4.2.3.1	I	Mito	0.00E+00	6.65E-05	3.23E-04	3.90E-04	1.50	0.90
XP_001402432.1	Celobiosa deshidrogenasa	Carbohidratos	1.1.99.18	E	Extra	0.00E+00	7.92E-06	2.56E-05	3.36E-05	1.50	0.95
XP_001395835.2	Glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa	Carbohidratos	2.3.1.4	I	Cie	0.00E+00	1.29E-04	1.19E-03	1.32E-03	1.50	0.83
XP_001395912.1	Glucoquinasa	Carbohidratos	2.7.1.2	I	Cito	0.00E+00	6.31E-05	5.76E-04	6.39E-04	1.50	0.83
GAQ45768.1	α-galactosidasa C	Carbohidratos	3.2.1.22	E	Extra	0.00E+00	1.50E-05	6.53E-05	8.03E-05	1.50	0.91
XP_001390419.1	Precursor endoglucanasa-1	Carbohidratos	3.2.1.4	E	Extra	0.00E+00	3.83E-05	8.48E-05	1.23E-04	1.50	1.00
XP_001395335.2	Endoglucanasa	Carbohidratos	3.2.1.4 3.2.1.176	E	Extra	0.00E+00	5.23E-05	1.60E-04	2.13E-04	1.50	0.96
XP_001396769.1	α-N-arabinofuranosidasa B	Carbohidratos	3.2.1.55	E	Extra	0.00E+00	3.92E-05	2.31E-04	2.70E-04	1.50	0.87
XP_001388482.1	α-N-arabinofuranosidase A	Carbohidratos	3.2.1.55	E	Extra	0.00E+00	1.92E-05	9.98E-05	1.19E-04	1.50	0.89
XP_001400449.2	exo-β-1,3-glucanasa	Carbohidratos	3.2.1.58	E	Extra	0.00E+00	1.56E-05	7.85E-05	9.41E-05	1.50	0.89
XP_001389956.2	glucan endo-1,6-β -glucosidasa BGN16.3	Carbohidratos	3.2.1.75	E	Extra	0.00E+00	2.46E-05	6.21E-05	8.67E-05	1.50	0.99
OJJ67369.1	β-xilanasas	Carbohidratos	3.2.1.8	E	Extra	0.00E+00	1.22E-04	4.17E-04	5.39E-04	1.50	0.95
XP_001396893.2	endo-arabinasa	Carbohidratos	3.2.1.99	E	Extra	0.00E+00	5.83E-05	6.26E-04	6.84E-04	1.50	0.82
XP_001396717.2	2-metilcitrato deshidratasa	Carbohidratos	4.2.1.79	E	Mito	0.00E+00	3.87E-05	1.14E-04	1.53E-04	1.50	0.97
XP_001401742.1	aldosa 1-epimerasa	Carbohidratos	5.1.3.15	E	Mito	0.00E+00	1.18E-04	5.05E-04	6.23E-04	1.50	0.91
XP_001390334.1	Hidrolasa de la superfamilia HAD	Carbohidratos	5.4.2.-	I	Cito	0.00E+00	1.85E-04	8.07E-04	9.92E-04	1.50	0.91
XP_001401157.2	Glicosil hidrolasa de pared celular YteR	Carbohidratos	Enzima	E	Extra	0.00E+00	3.77E-05	1.35E-04	1.73E-04	1.50	0.94
OJJ66437.1	HP ASPBRDRAFT_49077 /Quitinasa	Carbohidratos/aminoácido	Enzima	E	Extra	0.00E+00	3.75E-05	2.66E-04	3.03E-04	1.50	0.85
XP_001399898.1	Fosfoglucomutasa	Carbohidratos/cofactores y vitaminas/redox	5.4.2.2	E	Cito	0.00E+00	1.92E-04	1.08E-03	1.28E-03	1.50	0.88
OJJ68333.1	HP ASPBRDRAFT_58357	Componente celular		E	Plas	0.00E+00	1.97E-05	1.81E-04	2.00E-04	1.50	0.83
XP_001391393.1	S-formilglutatin hidrolasa	Energía	3.1.2.12	E	Mito	0.00E+00	1.93E-05	1.84E-04	2.04E-04	1.50	0.83
XP_001397234.1	cianato hidratasa	Energía	4.2.1.104	I	Pero	0.00E+00	1.57E-04	1.13E-03	1.29E-03	1.50	0.85
XP_001396780.2	Proteína similar de la familia nmrA	Energía		E	Mito	0.00E+00	3.51E-05	3.80E-04	4.16E-04	1.50	0.82
XP_001401521.1	difosfomevalonato descarboxilasa	Energía/carbohidratos/ aminoácidos/estrés	4.1.1.33	E	Cito	0.00E+00	2.91E-05	2.16E-04	2.45E-04	1.50	0.85
XP_001401891.1	Familia dominio Aha1	estrés		E	Cito	0.00E+00	6.06E-05	2.50E-04	3.10E-04	1.50	0.92
XP_001392074.2	Hsp	estrés /Aminoácidos		I	Cito	0.00E+00	3.01E-04	2.06E-03	2.36E-03	1.50	0.86
XP_001401464.1	Glutamato deshidrogenasa específica de NADP	estrés /procesos celulares	1.4.1.2	E	Cito	0.00E+00	1.80E-04	3.05E-04	4.85E-04	1.50	0.99
XP_001392486.1	ADP- factor ribosilación	estrés /proteínas		I	Mito	0.00E+00	6.54E-05	2.93E-04	3.58E-04	1.50	0.91
XP_001391137.1	Precursor de Lipasa 1	Lípidos	3.1.1.3	E	Extra	0.00E+00	1.56E-05	4.89E-05	6.46E-05	1.50	0.96
XP_001399436.1	Proteína de la familia de unión a acil CoA	Lípidos		I	Cito	0.00E+00	1.28E-04	5.92E-04	7.21E-04	1.50	0.90
XP_001400163.1	Geraniltranstransferasa	Misceláneos	2.5.1.1; 2.5.1.10	I	Cito	0.00E+00	2.36E-05	1.73E-04	1.96E-04	1.50	0.85
XP_001397406.1	Proteína de la familia thi/Pfpl	Misceláneos	3.4.-.-	E	Cito	0.00E+00	9.53E-05	4.11E-04	5.07E-04	1.50	0.91
XP_001395965.2	Proteína de la familia diene lactona hidrolasa	Misceláneos	Enzima	E	Cito	0.00E+00	3.83E-05	2.44E-04	2.83E-04	1.50	0.86

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
OJJ71705.1	HP ASPBRDRAFT_124942 / Glucanasa de pared de celular	Misceláneos	Enzima	E	Extra	0.00E+00	6.74E-05	3.31E-04	3.99E-04	1.50	0.90
XP_001401709.1	Homeostasis de calcio proteína Regucalcina	Misceláneos		I	Cito	0.00E+00	2.95E-05	2.05E-04	2.35E-04	1.50	0.86
XP_001391915.2	Alérgeno Asp f 4	Misceláneos		E	Extra	0.00E+00	3.64E-04	1.39E-03	1.76E-03	1.50	0.93
XP_001388959.2	Alérgeno menor Alt a 7	Misceláneos /nucleótidos	1.6.5.-	E	Extra	0.00E+00	8.58E-05	3.37E-04	4.22E-04	1.50	0.93
XP_001391760.1	Dihidrolipoil deshidrogenasa	Misceláneos /procesos celulares	1.8.1.4	I	Mito	0.00E+00	2.65E-05	4.15E-05	6.80E-05	1.50	0.98
XP_001398409.1	Factor de iniciación de la traducción eucariota 6	Misceláneos /virucidad		I	Cito	0.00E+00	1.13E-04	6.04E-04	7.18E-04	1.50	0.88
OJJ66434.1	HP ASPBRDRAFT_666063	ND		E	Extra	0.00E+00	8.43E-05	1.47E-03	1.56E-03	1.50	0.79
OJJ65941.1	HP ASPBRDRAFT_49399	ND		E	Extra	0.00E+00	7.08E-05	3.15E-04	3.86E-04	1.50	0.91
OJJ71769.1	HP ASPBRDRAFT_43145	ND		E	Extra	0.00E+00	4.51E-05	1.90E-04	2.36E-04	1.50	0.92
OJJ69038.1	HP ASPBRDRAFT_132071	ND		E	Extra	0.00E+00	8.42E-05	3.13E-04	3.97E-04	1.50	0.93
OJJ67239.1	HP ASPBRDRAFT_136183 / Orotato fosforibosiltransferasa	Nucleótidos	2.4.2.10	E	Mito	0.00E+00	4.30E-05	4.19E-04	4.62E-04	1.50	0.83
XP_001398362.1	Adenosina quinasa	Nucleótidos	2.7.1.20	I	Cito	0.00E+00	1.11E-04	5.63E-04	6.74E-04	1.50	0.89
XP_001393898.1	Nucleósido difosfato quinasa	Nucleótidos	2.7.4.6	I	Cito	0.00E+00	1.35E-04	4.07E-04	5.42E-04	1.50	0.96
XP_001390332.1	ADP-ribosa pirofosfatasa	Nucleótidos	3.6.1.13	I	Nucl	0.00E+00	5.36E-05	3.01E-04	3.54E-04	1.50	0.88
XP_001395432.1	orotidina 5'-fosfato descarboxilasa	Nucleótidos	4.1.1.23	I	Mito	0.00E+00	3.65E-05	3.24E-04	3.60E-04	1.50	0.83
XP_001400262.1	Proteína similar a esferulina de superficie celular 4	Proceso celular		E	Extra	0.00E+00	2.47E-05	1.56E-04	1.81E-04	1.50	0.87
XP_001388668.1	Factor de maduración glial	Proceso celular		I	Nucl	0.00E+00	1.18E-04	5.96E-04	7.14E-04	1.50	0.89
XP_001399080.1	Proteína 14-3-3	Proceso celular		I	Nucl	0.00E+00	7.30E-05	2.48E-04	3.21E-04	1.50	0.95
XP_001394989.2	Proteína endocitosis end4	Proceso celular		I	Nucl	0.00E+00	1.30E-05	3.47E-05	4.76E-05	1.50	0.98
XP_001398680.2	Proteína relacionada con Ras Rab-7a/ dGTPasa	Proceso celular /energía	3.1.5.1	I	Mito	0.00E+00	5.52E-05	2.33E-04	2.88E-04	1.50	0.92
OJJ74465.1	HP ASPBRDRAFT_27493	Proceso celular /proceso metabólico	Enzima	E	Extra	0.00E+00	4.85E-05	4.63E-04	5.11E-04	1.50	0.83
XP_001393994.1	Proteína ypt1 de unión a GTP	Proceso celular /redox	Enzima	E	Cito_ nucl	0.00E+00	1.60E-04	3.27E-04	4.87E-04	1.50	1.00
XP_001389030.1	Proteína relacionada con Ras Rab-11A	Proceso celular /transporte	Enzima	I	Cito_ nucl	0.00E+00	9.13E-05	1.84E-04	2.75E-04	1.50	1.00
XP_001401404.1	Dipeptidil peptidasa III	Proteólisis	3.4.14.4	I	Cito	0.00E+00	9.14E-05	5.49E-04	6.41E-04	1.50	0.87
XP_001401570.2	peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	Proteólisis	5.2.1.8	E	Extra	0.00E+00	3.90E-05	1.69E-04	2.08E-04	1.50	0.91
XP_001401759.1	Amino peptidasa 2	Proteólisis/proteínas	3.4.11.-	I	Pero	0.00E+00	2.34E-05	7.11E-04	7.35E-04	1.50	0.77
XP_001393995.2	Amino peptidasa	Proteólisis/proteínas	3.4.11.-	I	Cito	0.00E+00	1.67E-05	2.61E-04	2.78E-04	1.50	0.80
XP_001390068.2	Amino peptidasa Y	Proteólisis/proteínas	3.4.11.15	E	Extra	0.00E+00	1.67E-05	6.70E-05	8.37E-05	1.50	0.92
XP_001395660.1	Serina carboxipeptidasa extracelular	Proteólisis/proteínas	3.4.14.2	E	Extra	0.00E+00	1.92E-05	5.07E-05	6.99E-05	1.50	0.98
XP_001401653.1	Amino peptidasa C	Proteólisis/proteínas	3.4.22.40	E	Cito	0.00E+00	4.94E-05	2.15E-04	2.65E-04	1.50	0.91
OJJ69179.1	HP ASPBRDRAFT_132450 /Proteína de familia de dominio conservado de factor de elongación 1	Proteólisis/proteínas		E	Cito	0.00E+00	4.00E-05	1.21E-04	1.61E-04	1.50	0.96
XP_001393937.1	Aspartil amino peptidasa vacuolar Lap4	Proteólisis/transporte	3.4.11.-	E	Mito	0.00E+00	1.24E-05	2.08E-04	2.20E-04	1.50	0.79
XP_001390256.1	Lacasa-1	Redox	1.10.3.2	E	Extra	0.00E+00	2.28E-05	9.64E-05	1.19E-04	1.50	0.92
XP_001390822.1	Lacasa-1	Redox	1.10.3.2	E	Extra	0.00E+00	4.22E-05	1.44E-04	1.86E-04	1.50	0.95
XP_001390247.2	Glutación reductasa	Redox	1.8.1.7	I	Mito	0.00E+00	2.17E-05	3.37E-04	3.59E-04	1.50	0.80

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
XP_001398917.1	Rho inhibidor de disociación de GDP	Redox		E	Cito	0.00E+00	4.15E-05	4.88E-04	5.30E-04	1.50	0.81
XP_001398757.1	Porfobilinógeno desaminasa / hidroximetilbilano sintasa	Redox/aminoácidos	4.2.1.24- 2.5.1.61	I	Mito	0.00E+00	1.00E-04	7.44E-04	8.44E-04	1.50	0.85
XP_001388687.1	Tiorredoxina	Redox/carbohidratos	1.8.4.10	I	Cito	0.00E+00	3.31E-04	1.03E-03	1.36E-03	1.50	0.96
XP_001397790.1	Epimerasa dependiente de NAD/Proteína de la familia deshidratasa	Redox/Carbohidrato/aminoácido	Enzima	I	Cito	0.00E+00	6.98E-05	3.62E-04	4.32E-04	1.50	0.89
XP_001401851.1	Superóxido dismutasa [Mn]	Redox/estrés	1.15.1.1	E	Mito	0.00E+00	1.78E-04	4.13E-04	5.91E-04	1.50	0.99
XP_001397405.1	Peroxirredoxina pmp20	Redox/estrés	1.11.1.15*	E	Cito	0.00E+00	7.80E-05	4.15E-04	4.93E-04	1.50	0.89
XP_001393974.1	Hsp 90	Redox/lípidos		I	Cito_ nucl	0.00E+00	2.30E-05	8.81E-05	1.11E-04	1.50	0.93
XP_001401635.1	Aldehído reductasa 1	Redox/proceso celular	1.1.1.184	I	Cito	0.00E+00	2.52E-05	1.02E-04	1.27E-04	1.50	0.92
OJJ71117.1	HP ASPBRDRAFT_179180 /Peroxidasa	Redox/señalización	1.11.1.-	E	Mito	0.00E+00	2.70E-05	1.61E-04	1.88E-04	1.50	0.87
60, 120 y 180 g/L											
XP_001389342.1	Tirosinasa	Aminoácidos	1.14.18.1	E	Extra	5.76E-05	1.31E-04	6.55E-04	8.44E-04	1.37	0.84
XP_001401543.1	5-Metiltetrahydropterilglutamato-β- homocisteína metiltransferasa	Aminoácidos	2.1.1.14	I	Mito	1.84E-05	1.12E-04	7.45E-04	8.75E-04	1.46	0.84
XP_001392771.2	Espermidina sintasa	Aminoácidos	2.5.1.16; 2.5.1.22	I	Nucl	1.02E-05	5.25E-05	1.05E-03	1.11E-03	1.49	0.78
XP_001391302.1	Malato deshidrogenasa	Carbohidratos	1.1.1.37	E	Mito	9.25E-05	3.65E-04	3.99E-03	4.44E-03	1.47	0.80
AGI04246.1	Glucosa oxidasa	Carbohidratos	1.1.1.3.4	E	Nucl	1.65E-04	4.33E-04	1.48E-03	2.08E-03	1.33	0.90
XP_001391467.1	Transaldolasa	Carbohidratos	2.2.1.2	I	Cito	1.48E-04	2.09E-03	1.23E-02	1.46E-02	1.48	0.87
OJJ74329.1	Probable manosil-oligosacárido α-1,2-mannosidase 1B	Carbohidratos	3.2.1.-	E	Extra	5.46E-05	7.42E-05	2.70E-04	3.99E-04	1.20	0.82
XP_001393626.1	α-amilasa	Carbohidratos	3.2.1.1	E	Extra	7.30E-05	1.12E-04	5.52E-04	7.37E-04	1.30	0.81
XP_001397301.1	α-amilasa	Carbohidratos	3.2.1.1	E	Extra	8.31E-06	1.80E-05	4.83E-05	7.47E-05	1.24	0.92
GAQ42198.1	ácida α-amilasa estable	Carbohidratos	3.2.1.1	E	Plas	2.01E-05	7.69E-05	1.44E-04	2.41E-04	1.29	1.00
XP_001400489.2	Familia 18 Glicosil hidrolasa/quitinasa	Carbohidratos	3.2.1.14	E	Extra	2.53E-05	1.45E-04	3.89E-04	5.59E-04	1.40	0.96
XP_001397023.2	Endo-β-1,4-glucanasa D	Carbohidratos	3.2.1.151	E	Extra	8.95E-05	1.56E-04	4.16E-04	6.61E-04	1.18	0.89
XP_001389510.2	α/β-glucosidasa agdC	Carbohidratos	3.2.1.20; 3.2.1.21	E	Extra	7.88E-06	4.66E-05	2.69E-04	3.24E-04	1.46	0.86
XP_001398816.1	β-glucosidasa A	Carbohidratos	3.2.1.21	E	Extra	4.26E-05	1.37E-04	5.75E-04	7.54E-04	1.39	0.88
XP_001394632.2	β-manosidasa A	Carbohidratos	3.2.1.25	E	Extra	6.10E-06	1.58E-05	3.79E-05	5.98E-05	1.26	0.95
XP_001388594.1	ácido trehalasa	Carbohidratos	3.2.1.28	E	Extra	1.75E-05	5.54E-05	3.62E-04	4.35E-04	1.43	0.83
XP_001390530.1	Glucoamilasa	Carbohidratos	3.2.1.3	E	Extra	4.70E-04	1.12E-03	2.14E-03	3.73E-03	1.17	0.99
XP_001390410.1	Glucan endo-1,3-β-glucosidasa eglC	Carbohidratos	3.2.1.39	E	Extra	2.55E-04	4.41E-04	1.66E-03	2.36E-03	1.27	0.85
XP_001400902.1	Endoglucanasa A	Carbohidratos	3.2.1.4	E	Extra	8.45E-05	3.17E-04	1.25E-03	1.66E-03	1.40	0.89
XP_001392640.1	Endoglucanasa-4	Carbohidratos	3.2.1.4	E	Extra	1.82E-05	7.86E-05	2.23E-04	3.20E-04	1.38	0.95
XP_001393538.1	N-acetilglucosaminidasa	Carbohidratos	3.2.1.52	E	Extra	7.35E-06	1.83E-05	5.86E-05	8.42E-05	1.31	0.90
XP_001389998.1	α-L-arabinofuranosidasa axhA	Carbohidratos	3.2.1.55	E	Extra	1.33E-04	2.14E-04	3.04E-04	6.51E-04	0.85	1.00
XP_001389652.2	exo-β-1,3-glucanasa Exg0	Carbohidratos	3.2.1.58	E	Extra	1.25E-04	1.44E-04	7.10E-04	9.79E-04	1.24	0.77
XP_001392475.1	glucan 1,3-β-glucosidasa	Carbohidratos	3.2.1.58	E	Extra	7.57E-05	9.90E-05	7.28E-04	9.03E-04	1.34	0.78
XP_001398868.1	glucan 1,3-β-glucosidasa A	Carbohidratos	3.2.1.58	E	Extra	5.02E-05	1.31E-04	3.97E-04	5.78E-04	1.31	0.91
XP_001397010.2	Proteína de la familia 71 glicosil hidrolasa/glucan endo-1,3-α-glucosidasa	Carbohidratos	3.2.1.59	E	Extra	2.57E-05	2.68E-05	5.32E-05	1.06E-04	0.78	0.78
XP_001399223.1	endo-1,3(4)-β-glucanasa	Carbohidratos	3.2.1.6	E	Extra	3.15E-05	4.82E-05	1.46E-04	2.26E-04	1.18	0.86

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP	CEP	CEP	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
						20/60 Sp/mL ^d	40/120 Sp/mL ^d	60/180 Sp/mL ^d			
XP_001389996.2	endo-1,4-β-xilanasas F1	Carbohidratos	3.2.1.8	E	Extra	3.10E-04	3.70E-04	2.05E-03	2.73E-03	1.27	0.78
XP_001388522.1	endo-1,4-β-xilanasas A	Carbohidratos	3.2.1.8	E	Extra	6.28E-04	2.86E-03	1.22E-02	1.57E-02	1.42	0.89
XP_001389926.1	pectin liasa F	Carbohidratos	4.2.2.10	E	Extra	1.91E-04	3.45E-04	1.05E-03	1.58E-03	1.23	0.88
XP_001401115.1	Triosafosfato isomerasa	Carbohidratos	5.3.1.1	I	Pero	4.68E-05	3.09E-04	3.25E-03	3.61E-03	1.48	0.81
XP_001394051.1	Ribosa 5-fosfato isomerasa A	Carbohidratos	5.3.1.6	E	Cito	1.87E-05	5.70E-05	5.11E-04	5.87E-04	1.45	0.81
XP_001391828.2	Glicosidasa crf2	Carbohidratos	Enzima	E	Extra	1.02E-05	2.21E-05	6.47E-05	9.69E-05	1.26	0.90
OJJ75131.1	HP ASPBRDRAFT_53082	Carbohidratos	Enzima	E	Extra	3.01E-05	3.91E-05	1.03E-04	1.72E-04	1.06	0.84
GAQ44118.1	Celulasa extracelular CelA/ Alérgeno Asp F7	Carbohidratos	Enzima	E	Mito	2.26E-05	6.42E-05	1.35E-04	2.22E-04	1.25	0.98
OJJ72358.1	HP ASPBRDRAFT_42048 / D-6-hydroxynicotina oxidasa	Cofactores y vitaminas	1.5.3.6	E	Extra	2.18E-05	8.53E-05	6.93E-04	8.00E-04	1.45	0.82
XP_001400329.2	Parcial pirofosfatasa inorgánica	Energía	3.6.1.1	E	Cito_ Mito	2.98E-05	1.36E-04	1.02E-03	1.19E-03	1.46	0.83
XP_001391356.2	Proteína de dominio SUN (Uth1)/ triacilglicerol lipasa	Lípidos	3.1.1.3	E	Extra	2.91E-05	2.76E-04	1.50E-03	1.80E-03	1.47	0.87
XP_001397501.1	Lipasa	Lípidos	3.1.1.3	E	Extra	1.63E-04	8.08E-04	2.67E-03	3.64E-03	1.41	0.93
XP_001398185.1	Triacilglicerol lipasa	Lípidos	3.1.1.3	E	Extra	6.44E-06	2.45E-05	1.35E-04	1.66E-04	1.43	0.85
XP_001393823.2	Colinesterasa	Lípidos	3.1.1.7	E	Extra	1.46E-05	2.47E-05	9.18E-05	1.31E-04	1.26	0.85
OJJ67200.1	HP ASPBRDRAFT_59193	Misceláneos	Enzima	E	Extra	4.41E-05	7.25E-05	2.29E-04	3.46E-04	1.21	0.86
XP_001401488.1	Proteína ecm33	Misceláneos		E	Extra	1.20E-03	1.75E-03	6.47E-03	9.42E-03	1.22	0.83
XP_001395113.2	Proteína HMF1	Misceláneos		I	Cito	7.03E-05	1.96E-04	4.18E-04	6.85E-04	1.25	0.98
XP_001389020.1	Cianovirina-N	Misceláneos /señalización/ proceso celular		I	Cito	6.93E-05	2.22E-04	1.46E-03	1.75E-03	1.43	0.83
OJJ71409.1	HP ASPBRDRAFT_127351	ND		E	Cito	1.93E-04	3.90E-04	1.66E-03	2.25E-03	1.33	0.85
XP_001392850.1	1,3-β-glucanosiltransferasa gel2	Proceso celular	2.4.1.-	E	Extra	2.82E-05	7.22E-05	2.45E-04	3.45E-04	1.33	0.89
XP_001391851.1	Proteína 14-3-3	Proceso celular		I	Cito	2.03E-05	1.73E-04	8.49E-04	1.04E-03	1.46	0.88
XP_001400160.1	Proteína NMT1	Proceso celular /carbohidratos		I	Cito	4.78E-05	2.55E-04	1.20E-03	1.50E-03	1.44	0.88
XP_001390497.2	1,3-β-glucanosiltransferasa gel3	Proceso celular /proteínas/estrés	2.4.1.-	E	Extra	1.48E-05	3.36E-05	1.30E-04	1.79E-04	1.33	0.87
XP_001402433.1	1,3-β-glucanosiltransferasa gel1	Proceso celular /redox	2.4.1.-	E	Extra	3.33E-04	6.92E-04	3.20E-03	4.22E-03	1.34	0.84
OJJ72478.1	HP ASPBRDRAFT_54314 / Serina proteinasa pepC	Proteínas	3.4.21.-	E	Extra	3.70E-05	1.51E-04	1.41E-03	1.60E-03	1.46	0.81
XP_001398198.2	Carboxipeptidasa S1	Proteólisis	3.4.16.-	E	Extra	1.45E-05	3.07E-05	2.59E-04	3.04E-04	1.42	0.80
OJJ66856.1	HP ASPBRDRAFT_59296 /Enzima activadora de ubiquitina E1 1	Proteólisis/proteínas	6.2.1.45	I	Cito_ nucl	4.32E-06	1.82E-05	9.54E-05	1.18E-04	1.43	0.86
XP_001400873.1	Tripeptidil-peptidasa sed2	Proteólisis/transporte	3.4.14-	E	Extra	1.50E-04	2.95E-04	1.12E-03	1.56E-03	1.30	0.86
XP_001390502.1	Proteína de unión a FAD	Redox	1.-.-.-	E	Pero	1.50E-05	1.96E-05	6.86E-05	1.03E-04	1.17	0.81
XP_001389120.1	Similar a reductasa	Redox	1.1.1.1-	E	Cito	1.87E-04	1.46E-03	6.84E-03	8.48E-03	1.46	0.89
XP_001388595.1	Catalasa R	Redox	1.11.1.6	E	Extra	3.63E-05	1.38E-04	5.05E-04	6.80E-04	1.39	0.90
XP_001390337.1	aldo-ceto reductasa	Redox	1.11.1.7	E	Cito	1.50E-05	5.47E-05	2.57E-04	3.27E-04	1.41	0.87
XP_001393905.1	Sulfidril oxidasa	Redox	1.8.3.2	E	Extra	1.39E-04	2.35E-04	7.92E-04	1.17E-03	1.24	0.86
XP_001394119.2	Aldehído reductasa 1	Redox/carbohidratos	1.1.1.21	I	Cito	9.95E-05	4.38E-04	4.56E-03	5.10E-03	1.47	0.81
XP_001391459.1	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	Redox/carbohidratos/nucleótidos	1.15.1.1	E	Cito	1.82E-04	4.68E-04	1.13E-03	1.78E-03	1.26	0.95
XP_001395908.1	Peroxiirredoxina pmp20	Redox/nucleótidos	1.11.1.15	I	Cito	1.78E-04	1.08E-03	7.45E-03	8.71E-03	1.46	0.84
XP_001389952.1	Oxigenasa dependiente de FAD	Redox/procesos celulares/ carbohidratos	1.5.3.6	E	Extra	1.73E-05	3.37E-05	7.92E-05	1.30E-04	1.17	0.93
XP_001388621.1	Catalasa R	Redox/terpenoides y poliquétidos	1.11.1.6	E	Extra	6.47E-05	1.16E-04	5.23E-04	7.03E-04	1.31	0.83

No. acceso ^a	Proteína	Metabolismo/ proceso	No. E.C	E/I ^b	Loc ^c	CEP 20/60 Sp/mL ^d	CEP 40/120 Sp/mL ^d	CEP 60/180 Sp/mL ^d	Total CEP ^e	Pend (N) CEP ^f	r ² de CEP (N) ^g
XP_001402471.1	purina nucleósido permeasa	Transporte	Enzima	E	Extra	1.98E-04	3.85E-04	1.27E-03	1.86E-03	1.27	0.88
Proteínas reguladas en CL											
20 y 40 g/L											
XP_001390497.2	1,3-β-glucanosiltransferasa gel3	Proceso celular /carbohidratos	2.4.1.-	E	Extra	7.09E-07	5.72E-07	0.00E+00	1.28E-06	-1.50	0.89
20, 40 y 60 g/L											
XP_001390502.1	Proteína de dominio de unión a FAD	Redox	1.-.-.-	E	Pero	7.32E-07	6.35E-07	2.57E-07	1.62E-06	-0.97	0.90
XP_001389952.1	Oxigenasa dependiente de FAD	Redox	1.5.3.6	E	Extra	2.44E-06	1.07E-06	9.68E-07	4.48E-06	-0.90	0.80
XP_001393905.1	Sulfidril oxidasa	Redox	1.8.3.2	E	Extra	9.37E-06	6.12E-06	4.42E-06	1.99E-05	-0.79	0.97
OJJ78207.1	HP ASPBRDRAFT_142667/ 1,3-β-glucanosiltransferasa	Proceso celular /carbohidratos	2.4.1.-	E	Extra	6.33E-07	7.18E-07	2.83E-06	4.19E-06	1.17	0.78
XP_001402433.1	1,3-β-glucanosiltransferasa gel1	Proceso celular /carbohidratos	2.4.1.-	E	Extra	1.11E-05	6.45E-06	6.08E-06	2.36E-05	-0.68	0.81
XP_001392850.1	1,3-β-glucanosiltransferasa gel2	Proceso celular /carbohidratos	2.4.1.-	E	Extra	8.83E-07	8.99E-07	9.94E-07	2.78E-06	0.17	0.86
OJJ74329.1	Probable manosil-oligosacárido α-1,2- manosidasa 1B	Carbohidratos	3.2.1.-	E	Extra	2.30E-06	9.19E-07	6.79E-07	3.90E-06	-1.06	0.86
GAQ42198.1	Ácida α-amilasa estable	Carbohidratos	3.2.1.1	E	Plas	7.67E-06	3.32E-06	3.12E-06	1.41E-05	-0.89	0.78
XP_001402053.1	α-glucosidasa	Carbohidratos	3.2.1.20	E	Extra	8.86E-07	5.91E-07	2.95E-07	1.77E-06	-1.00	1.00
XP_001394632.2	β-manosidasa A	Carbohidratos	3.2.1.25	E	Extra	4.40E-07	3.50E-07	2.59E-07	1.05E-06	-0.62	1.00
XP_001388594.1	Ácida trehalasa	Carbohidratos	3.2.1.28	E	Extra	9.61E-07	7.46E-07	4.74E-07	2.18E-06	-0.76	1.00
OJJ70100.1	HP ASPBRDRAFT_45424 /Isopululanasa	Carbohidratos	3.2.1.57	E	Extra	3.76E-06	3.09E-06	2.70E-06	9.54E-06	-0.42	0.98
XP_001400873.1	Tripeptidil-peptidasa sed2	Proteólisis/Transporte	3.4.14.10	E	Extra	1.61E-05	8.76E-06	4.90E-06	2.98E-05	-1.04	0.97
XP_001392582.1	Tripeptidil-peptidasa 1	Proteólisis /Transporte	3.4.14.10	E	Extra	5.22E-07	8.60E-07	1.09E-06	2.47E-06	0.78	0.99
XP_001398198.2	Carboxipeptidasa S1	Proteólisis	3.4.16.6	E	Extra	1.48E-06	1.39E-06	8.35E-07	3.71E-06	-0.65	0.85
XP_001401093.1	Aspergillopepsin 1	Proteólisis /proteínas	3.4.23.18	E	Extra	3.88E-06	2.00E-06	1.47E-06	7.35E-06	-0.93	0.90
XP_001399157.1	Amidasa	Aminoácidos	3.5.1.4	E	Extra	9.65E-07	6.71E-07	6.66E-07	2.30E-06	-0.47	0.76
GAQ46904.1	YkgB	Proceso celular		E	Extra	6.37E-05	1.35E-05	7.09E-06	8.42E-05	-1.33	0.83
XP_001401488.1	Proteína ecm33	Misceláneos /procesos celulares		E	Extra	4.36E-05	1.63E-05	6.07E-06	6.59E-05	-1.29	0.94
XP_001400808.1	Proteína PhiA de pared celular	Proceso celular		E	Extra	1.48E-05	4.51E-05	6.48E-05	1.25E-04	1.16	0.99
40 y 60 g/L											
OJJ67369.1	HP ASPBRDRAFT_69025 /β-xilanas	Carbohidratos	3.2.1.8	E	Extra	0.00E+00	2.85E-06	6.21E-06	9.06E-06	1.50	1.00
XP_001389926.1	Pectin liase F	Carbohidratos	4.2.2.10	E	Extra	0.00E+00	3.31E-06	6.62E-06	9.94E-06	1.50	1.00

^a Números de acceso correspondientes a la base de datos de NCBI, los que inician con las letras "XP" corresponden a *A. niger* CBS 513.88, con "OJJ" corresponden a *A. brasiliensis* CBS 101740, el resto corresponde a otras cepas de *A. niger*. ^b Caracterizada como: Extracelular (E) o como intracelular (I) (basándose en los servidores SignalP y/o SecretomeP); ^c Loc=Localización predicha por WoLF PSORT: (Cito) citosol, (Extra) extracelular, (Mito) mitocondrial, (Pero) peroxisomas, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Cit_mit) citosol/mitocondria. ^d Cuenta espectral ponderada (CEP) determina el número de espectros contados por mL de medio para cada una de las condiciones; ^e Representa la suma de la CEP de las tres condiciones para cada proteína; ^f Representa el valor de la pendiente al graficar los valores de la CEP normalizado en función de la concentración de glucosa, (-) bajo-regulación y (+) sobre-regulación; ^g Coeficiente de determinación >0.75 las proteínas fueron reguladas.

7.3.1. Proteínas únicas identificadas en el secretoma

Un total de 17 y 87 proteínas únicas fueron identificadas en CL y CS (Figura 12 y Tabla 5), respectivamente. El mayor número de proteínas únicas para cada tipo de cultivo se encuentra en el medio con mayor concentración de glucosa inicial (Figura 15); 13 proteínas para CL y 75 proteínas para CS en los medios de cultivo con 60 y 180 g/L respectivamente. En CL, se encontraron proteínas únicas en los medios con 20 y 60 g/L. En el caso de 20 g/L se identificaron tres endoglucanasas y una proteína hipotética (Tabla 5), y con 60 g/L se identificaron 13 proteínas únicas; de las cuales, cuatro están asociadas al metabolismo de carbohidratos (malato deshidrogenasa, α -amilasa, glucan endo-1-6- β -glucosidasa BGN16.3 y una proteína enriquecida en serina extracelular (XP_001400266.1) y tres a mecanismos de defensa contra estrés (catalasa R, una proteína similar a reductasa y aldehído reductasa), el resto se ha relacionado al metabolismo de aminoácidos, procesos de transporte y a proteínas hipotéticas (Figura 16).

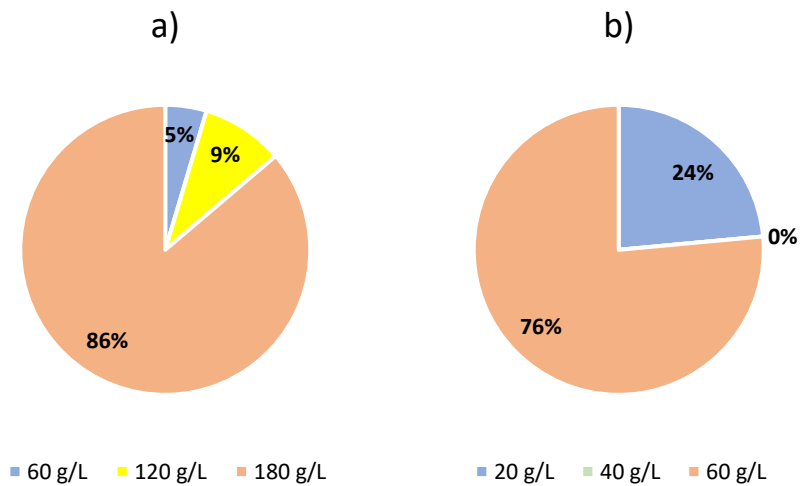


Figura 15. Proteínas únicas identificadas por concentración de glucosa en cultivo sólido (a) y líquido (b).

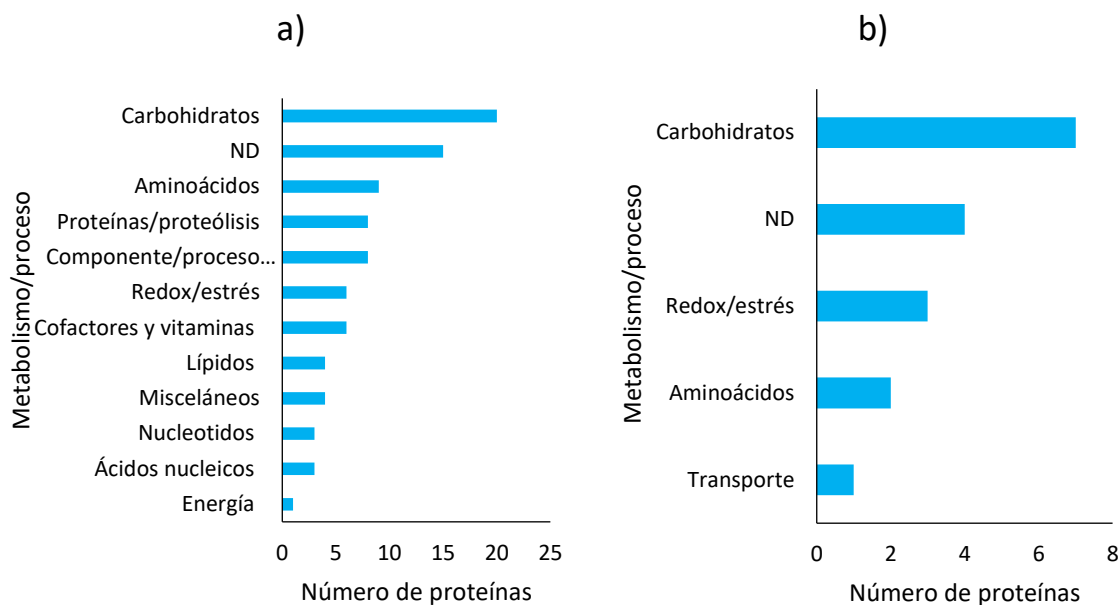


Figura 16. Distribución de proteínas únicas encontradas en el secretoma de *A. brasiliensis* bajo las tres condiciones evaluadas en cultivo sólido (a) y líquido (b).

Por otro lado, el 86.2% de las proteínas únicas de CS corresponden a la condición de 180 g/L, de las cuales el 53.33% presentaron evidencia de secreción a través de SignalP y/o SecretomeP. La mayor parte de las proteínas únicas de 180 g/L se relacionaron al metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, representando el 19.54 y 10.35% en esta condición, respectivamente; mientras que, el 13.79% corresponde a proteínas hipotéticas (Figura 16).

En ambos cultivos, el mayor porcentaje de las proteínas únicas participa en el metabolismo de carbohidratos, el 21.8 y 47%, en CS y CL, respectivamente. El porcentaje obtenido en CS, se encuentra dentro del rango observado en hongos filamentosos como: *Stagonospora sp.*, *Pyrenochaeta sp.* y *Alternaria alternata*, donde se identificó el 15, 18 y 30% (Zeiner et al., 2016), respectivamente; lo contrario con CL, el cual se obtuvo un porcentaje mayor a lo reportado.

De las enzimas únicas relacionadas al metabolismo de carbohidratos, la 6-fosfogluconolactonasa resulta ser abundante de acuerdo con la CEP. Esta enzima participa en la ruta de pentosas fosfato (*PPP*); también fueron identificadas otras enzimas abundantes que participan en rutas centrales como en la glucólisis (glucosa-6-fosfato-isomerasa), *PPP* (fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilante 1) y en el ciclo de ácidos tricarbónicos (CAT) (citrato sintasa). El 44% de las 87 proteínas únicas en CS se identificaron como intracelulares, en cambio en CL,

únicamente la aldehído reductasa se encontró como única e intracelular. Las razones por las cuales proteínas intracelulares son identificadas en la región extracelular son descritas más adelante.

Por lo tanto, los resultados previos demuestran que la concentración de glucosa nuevamente tiene un efecto sobre la secreción, en este caso sobre la secreción de proteínas únicas y proteínas únicas intracelulares en CS, principalmente en la concentración de 180 g/L.

7.3.2. Identificación de proteínas intracelulares en el secretoma de *A. brasiliensis*

A través del análisis por SignalP y SecretomeP se determinó la presencia de un alto número de proteínas intracelulares (sin evidencia de secreción) siendo el 33% y 1.6% del número total de proteínas identificadas en CS y CL, respectivamente.

Generalmente, en los estudios del secretoma se espera encontrar proteínas secretadas a través del péptido señal o por mecanismos no convencionales reportados. Sin embargo, la identificación de proteínas intracelulares es común (Jun et al., 2011; Li et al., 2013). Esto se convierte en un problema al discriminar dichas proteínas durante la caracterización del secretoma, lo que provoca pérdida de información relevante (Brown et al., 2014, 2015). La presencia de proteínas intracelulares en la región extracelular se justifica por algunos investigadores como el resultado de algún grado de lisis celular durante el crecimiento o en la obtención de la muestra (Li et al., 2013), así descartándolas de la interpretación de resultados. No obstante, hay evidencia de la secreción de proteínas por mecanismos no convencionales en hongos, plantas, animales y bacterias (Jeffery, 2015), las cuales tienen un impacto sobre la comunicación célula-célula y en procesos de virulencia (Miura y Ueda, 2018; Zamith-Miranda et al., 2018).

Para evitar la presencia de proteínas intracelulares en el secretoma debido a lisis celular o al envejecimiento del cultivo se minimizó la lisis celular con un cuidadoso procesamiento de la muestra (Sección 6.3), y el envejecimiento celular al definir el tiempo de cultivo en el que se alcanza la máxima tasa de producción de CO₂ como el tiempo de muestreo para el análisis del secretoma (Sección 6.2.1.2).

El secretoma de *A. brasiliensis* proveniente de CS presentó 81 proteínas identificadas como típicamente intracelulares, las cuales fueron identificadas en función de la concentración de glucosa (Figura 17) y distribuidas de la siguiente manera (Figura 18 y Tabla 5): 1 proteína única en 60 g/L, 2 proteínas únicas en 120 g/L, 35 proteínas únicas en 180 g/L, 32 proteínas en común entre 120 y 180 g/L y 11 proteínas en común entre las tres condiciones. De acuerdo con la función principal, un alto

número de estas proteínas se vincula al metabolismo redox/estrés y de carbohidratos (Figura 16). Mientras que, 26.7, 22.9 y 61.1% de las proteínas corresponden a los grupos de proteínas abundantes no reguladas, enzimas reguladas y enzimas no reguladas respectivamente (Tabla 5). En cambio, en CL, sólo aldehído reductasa se identificó como proteína intracelular.

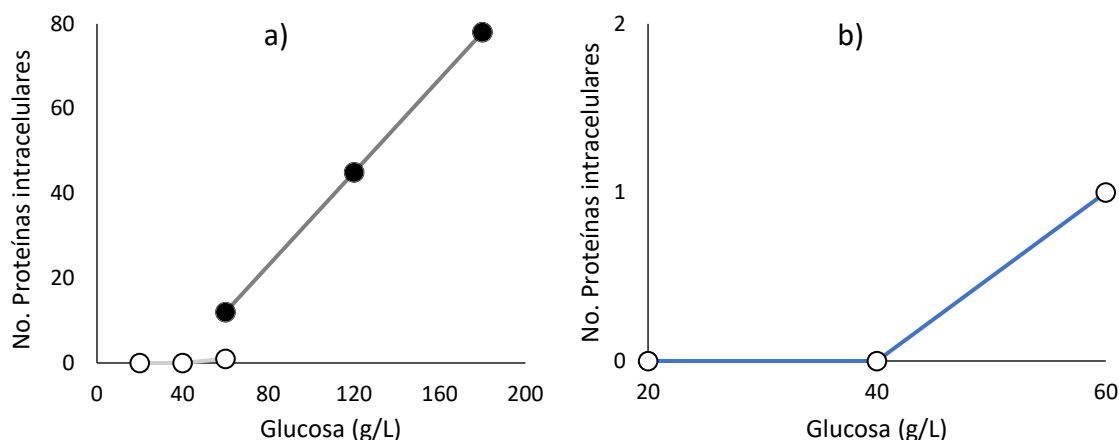


Figura 17. A) Número de proteínas intracelulares identificadas en el secretoma de *A. brasiliensis* en función de la concentración de glucosa en ambos cultivos. Círculos llenos (●): cultivo sólido; círculos vacíos (○): cultivo líquido. B) Ampliación de lo observado en cultivo líquido.

La alta presencia de proteínas intracelulares que no corresponden a proteínas con mecanismos de secreción asociados a la secuencia señal (SignalP) o predichas por SecretomeP en CS puede ser el resultado de mecanismos de secreción como vesículas o exosomas (Rabouille, 2017) y proteínas *moonlighting* (Huberts y van der Klei, 2010). La alta presencia de estas proteínas identificadas como intracelulares también puede ser debida a la secreción de proteínas en la zona apical de las hifas, en esta zona existe un flujo de componentes necesarios para la síntesis de la pared celular (Gomes et al., 2018), y de proteínas indispensables para la extensión apical (Pakula et al., 2005).

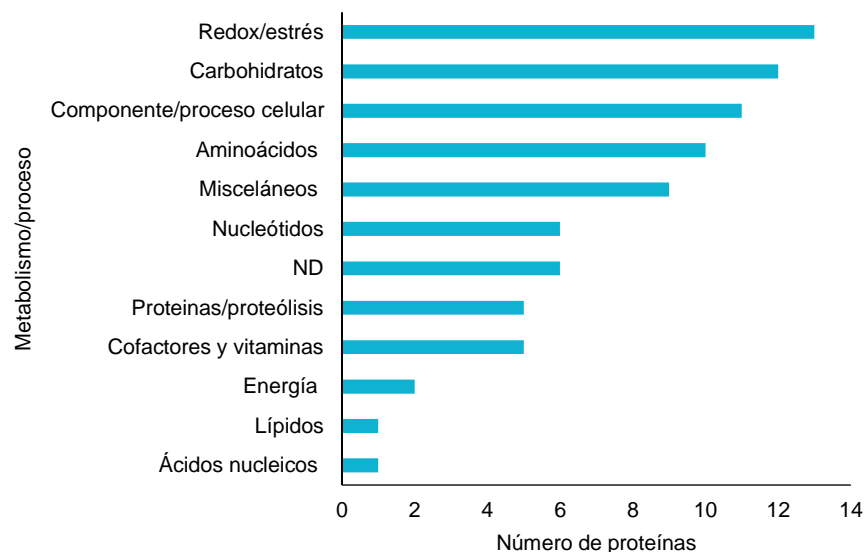


Figura 18. Distribución de proteínas típicamente intracelulares encontradas en el secretoma de *A. brasiliensis* bajo las tres condiciones evaluadas en cultivo sólido.

La secreción vesicular se considera como única ruta de secreción para diversas proteínas que no presentan péptido señal (Vallejo et al., 2012), algunas proteínas como la triosafosfato isomerasa, enolasa, glucan 1-3- β -glucosidasa, glucoquinasa, transaldolasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, *HSP*'s, tiorredoxina, superóxido dismutasa, y proteínas ribosomales son secretadas a través de vesículas por *Paracoccidioides brasiliensis*. En las vesículas se secreta una amplia variedad de proteínas asociadas a: i) el metabolismo de carbohidratos y lípidos, ii) estructurales en la pared celular, iii) señalización celular, iv) relacionadas al crecimiento, v) virulencia, y vi) estrés oxidativo y térmico (Joffe et al., 2016; Rodrigues et al., 2008). Con base en lo anterior, se sugiere que la secreción de proteínas típicamente intracelulares se lleve a cabo por medio de vesículas, principalmente en 120 y 180 g/L, debido a que varias de las proteínas mencionadas han sido identificadas en estas condiciones. Además, la presencia de la proteína ypt1 de unión a GTP, la Rab7 relacionada con Ras/dGTPasa, la Rab-11A relacionada con Ras y un componente del complejo de exocitosis Sec8 apoya la hipótesis de secreción vesicular de estas proteínas, ya que de acuerdo con la información obtenida por las bases de datos y con lo reportado (Chen et al., 2015; Riquelme et al., 2014; Sánchez-León et al., 2015)) son proteínas que participan en el transporte vesicular/exocitosis.

Por otro lado, las proteínas con función *moonlighting* en el secretoma de *A. brasiliensis* no son descartadas; sin embargo, su corroboración es complicada, ya que no existen métodos que

determinen dichas funciones a partir de características biofísicas (Amblee y Jeffery, 2015). Por lo que, experimentalmente se siguen determinando nuevas proteínas (Mani et al., 2015) como la proteína ribosomal RPL44 de *A. glaucus* que confiere resistencia a estrés abiótico (Liu et al., 2014). Enzimas citosólicas y chaperonas (*Hsp's*) identificadas en nuestro estudio han demostrado tener otras funciones dependiendo su localización dentro de la célula (Amblee y Jeffery, 2015; Gancedo et al., 2016). Proteínas secretadas por *A. brasiliensis* como la triosafosfato isomerasa, transaldolasa, malato deshidrogenasa, catalasas, SOD1, peroxiredoxinas, proteína 14-3-3 y factores de transcripción, también han demostrado poseer otras funciones diferentes a la principal (Amblee y Jeffery, 2015; Breitenbach et al., 2015; Gancedo et al., 2016; Nimrichter et al., 2016; Serrano-Fujarte et al., 2016; Sluchanko y Gusev, 2017).

La triosafosfato isomerasa y la SOD han sido identificadas por actuar en la región extracelular o en la superficie celular durante la adhesión a matrices sólidas, denominándose adhesinas, las cuales participan en la unión con el huésped o como receptores de la superficie (Amblee y Jeffery, 2015). Otro ejemplo de adhesinas es la transaldolasa, esta enzima favorece la adhesión de especies de *Bifidobacterium* al tracto intestinal del huésped (González-Rodríguez et al., 2012; Westermann et al., 2016). La presencia de la transaldolasa (abundante y sobre-regulada) en la región extracelular en condiciones de CS indica una relevante participación en la adhesión de *A. brasiliensis* sobre la perlita. Estudios recientes han demostrado que la transaldolasa es secretada a través de vesículas extracelulares de hongos patógenos como *Candida spp.* y *A. fumigatus* (Nimrichter et al., 2016); y se ha identificado en secretomas expresados por otras especies de *Aspergillus*, como *oryzae* (Oda et al., 2006), *niger* (Carrillo-Sancen et al., 2016) y *brasiliensis* (Volke-Sepulveda et al., 2016) en condiciones de CS. Cabe mencionar que la adherencia es relevante para la toma de nutrientes, secreción de enzimas, y para el crecimiento apical de las hifas (Gamarra et al., 2010). La adherencia es un proceso complejo y metabólicamente activo, mediado por moléculas secretadas como: carbohidratos, proteínas y lípidos que se unen al sustrato, pero existe una carencia de información en especies de uso industrial (Gow et al., 2017; Villena y Gutiérrez-Correa, 2007). Esto último ha permitido investigar y entender el papel que juegan las proteínas extracelulares durante la adhesión fúngica, ya que se ha sugerido que el proceso implica mecanismos de señalización, expresión diferencial de genes y el comportamiento metabólico, lo cual puede ejercer un efecto en el aumento de la productividad de las enzimas producidas en superficies sólidas (Villena y Gutiérrez-Correa, 2007) y ayudar a comprender mejor las diferencias entre CS y CL.

Por lo tanto, al incrementar la concentración de glucosa en CS se favoreció la presencia de proteínas intracelulares consideradas con función *moonlighting* que podrían participar en la adhesión de *A. brasiliensis* a la perlita, lo que facilita el consumo de nutrientes en altas concentraciones de glucosa. Estudios posteriores sobre este tipo de proteínas podrían ayudar a entender mejor los mecanismos de secreción por parte de los hongos filamentosos en CS.

7.3.3. Enzimas y proteínas sin función enzimática del secretoma de *A. brasiliensis* en ambos cultivos

Una alta diversidad de proteínas con y sin funciones enzimáticas se identificó en el secretoma de *A. brasiliensis* en ambos cultivos (Tabla 5). De las 62 proteínas identificadas en CL, 53 son proteínas con actividad enzimática y 9 proteínas no tienen función enzimática. En cuanto al CS, 188 proteínas de las 242 resultaron ser enzimas, mientras que, 54 proteínas no presentan funciones enzimáticas.

Para el CL, enzimas como: β -xilanasas (HP ASPBRDRAFT_69025), pectin liasa F, 1,3- β -glucanosiltransferasa gel2, 1,3- β -glucanosiltransferasa (HP ASPBRDRAFT_142667) y la tripeptidil-peptidasa 1 fueron sobre-reguladas; mientras que, 15 fueron bajo-reguladas, la mayoría asociadas al metabolismo de carbohidratos (ácida trehalasa, ácido α -amilasa estable, probable manosil-oligosacárido α -1,2-manosidasa 1B, isopululanasa, α -glucosidasa y β -manosidasa A). Por otra parte, 3 proteínas sin función enzimática fueron reguladas, la proteína ecm33 y YkgB, reguladas negativamente; y la proteína PhiA de pared celular sobre-regulada.

En CS se identificaron 120 y 26 enzimas y proteínas sin función enzimática, respectivamente; todas ellas sobre-reguladas en función de la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo, las relacionadas al metabolismo de carbohidratos representaron el 41%, mientras que, el 16.6 y 10% corresponden a enzimas relacionadas a procesos redox y al procesamiento de proteínas, respectivamente. La endo-1,4- β -xilanasas A, peroxirredoxina pmp20 y la serina proteínasa pepC son consideradas las proteínas más abundantes de cada uno de los procesos mencionados, respectivamente. Por otro lado, las proteínas reguladas sin función enzimática corresponden principalmente a procesos celulares (factor de maduración glial, 2 isoformas de la proteína 14-3-3, proteína endocitosis end4, proteína similar a esferulina de superficie celular 4 y la proteína NMT1) y seis asociadas a diferentes procesos, denominando al grupo como misceláneos (Tabla 5).

Generalmente, el incremento de glucosa inhibe parcial o totalmente la síntesis de algunas proteínas, y esto se observó en CL, en donde existe una bajo-regulación de ciertas proteínas. La

comparación con lo reportado previamente en CS, demuestra que no sólo la concentración de glucosa es un factor que influya sobre la secreción de las proteínas, sino que otras variables como el pH (Boratyński et al., 2018), operación del reactor (Lopez-Ramirez et al., 2018) y la disponibilidad de oxígeno (Rahardjo et al., 2005) pueden ser relevantes, siendo éstas variables diferentes en nuestro estudio.

En el siguiente apartado se presenta una descripción de las proteínas no caracterizadas a partir de las bases de datos (proteínas hipotéticas), y posteriormente, se presenta la descripción de las proteínas identificadas de acuerdo con la clasificación establecida a partir de su función principal reportada.

7.3.4. Proteínas hipotéticas en el secretoma de *A. brasiliensis*

A partir de los datos obtenidos por espectrometría de masas, la identificación de las proteínas presentes se realizó utilizando las bases de datos disponibles en *UniProt* y *NCBI*. Las secuencias peptídicas fueron alineadas con la información disponible de *A. brasiliensis* CBS 101740; sin embargo, la información obtenida era mínima debido a que todas las proteínas alineadas nos indicaban ser proteínas hipotéticas (Anexo 1). Entonces, para la obtención de información se realizó un segundo alineamiento limitando el organismo a *A. niger* debido a su alta similitud con *A. brasiliensis* (Houseknecht et al., 2008); los datos utilizados fueron principalmente de *A. niger* CBS 513.88, cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado (Pel et al., 2007). Con este procesamiento de datos disminuyó el número de proteínas hipotéticas (Tabla 5).

De las 242 proteínas encontradas en CS, 31 fueron hipotéticas, 22 de ellas con evidencia de secreción, el resto fueron únicas e intracelulares en 180 g/L. Por el contrario, las 9 proteínas hipotéticas identificadas en CL presentaron evidencia de secreción, 3 exclusivas de la condición de 60 g/L.

El incremento en la concentración inicial de glucosa en ambos tipos de cultivo conduce a una mayor secreción de proteínas. Este efecto es mayor en CS. Con relación a las proteínas hipotéticas, su proporción es similar en ambos tipos de cultivo (12.81% y 14.51% en CS y CL, respectivamente). Estos valores son cercanos a lo observado en el secretoma de diversos hongos, en los que las proteínas hipotéticas representan entre el 12-14% al realizar el alineamiento en *NCBI* y *UniProt* (Zeiner et al., 2016). No obstante, Florencio et al. (2016) identificaron 35% y 31% de proteínas hipotéticas en el secretoma de *A. niger* expresado en CL en lote y en lote sucesivo,

respectivamente; mientras que, en el secretoma de *T. reesei* en CL el contenido de proteínas hipotéticas representó 14.4 y 17.7% en cultivos en lote y en lote sucesivo, respectivamente. Los datos de ambos hongos fueron alineados contra todas las proteínas fúngicas presentes en la base de datos de *NCBI*. El análisis del proteoma puede ser el resultado de diferentes variables, por ejemplo: la base de datos utilizada, secuenciación del genoma, anotación del genoma y proteoma, cepa o microorganismo utilizado para el alineamiento, actualización de las bases de datos, equipos y programas utilizados para la adquisición de datos, entre otros factores (Gulcicek et al., 2005; Pible et al., 2014).

7.3.5. Abundancia relativa de cada grupo de clasificación

Como se ha mencionado, en este estudio se obtuvo una gran cantidad de proteínas. Para una mejor comprensión de los resultados, las proteínas encontradas se clasificaron en tres grupos (únicas, abundantes no reguladas y reguladas) (Figura 19). Para ello, se consideró la abundancia relativa de las proteínas, determinada por la CEP (cuenta espectral ponderada) (Sección 6.8).

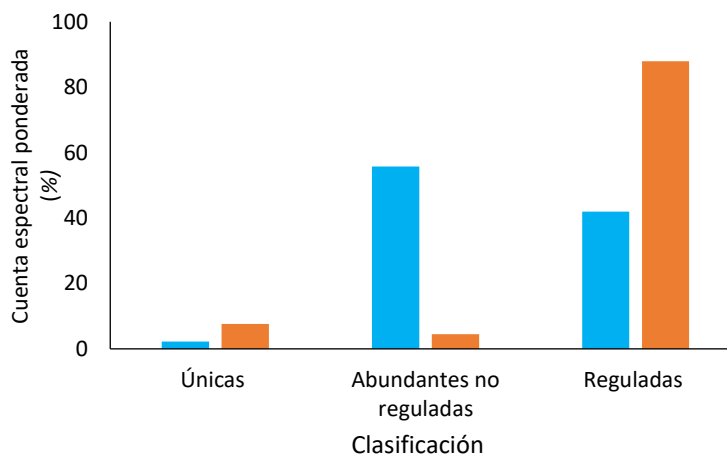


Figura 19. Distribución de la cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas en cultivo líquido (azul) y sólido (naranja).

En ambos tipos de cultivo las proteínas únicas (aquellas que se encuentran en un sólo medio de cultivo para cada tipo de cultivo) representan menos del 7.7%; siendo 3 veces menor en CL que en CS (Figura 19). Por otro lado, el patrón de proteínas no reguladas y reguladas en ambos tipos de cultivo es completamente diferente. En cultivo líquido las proteínas no reguladas son 30% más que las reguladas; sin embargo, en CS las proteínas reguladas son más de 20 veces más que las no

reguladas. Esto es consistente con las múltiples evidencias que se han presentado con relación a una menor represión catabólica en CS que en CL.

Por otra parte, la distribución de la CEP en CS es distinta al CL; en CS, el mayor porcentaje (87.89%) se concentró en las proteínas reguladas (Figura 19). La CEP de las proteínas únicas en CS es 620 veces mayor en CS que en CL; mientras que, ésta es 14.5 y 378 veces mayor en CS que en CL para las proteína no reguladas y reguladas, respectivamente. Estas diferencias son el resultado de la alta diversidad de proteínas en CS y su abundancia en el secretoma; principalmente en el medio de cultivo sólido con una concentración inicial de glucosa de 180 g/L; en el que la diversidad de proteínas es 2.87 veces mayor a la observada en CL.

Las proteínas del secretoma también se clasificaron de acuerdo con su función/proceso principal. A partir de la CEP total de cada grupo se demostró que las proteínas relacionadas al metabolismo de carbohidratos se encuentran con mayor abundancia en ambos cultivos (Figs. 20 y 21); en el segundo grupo más abundante están aquellas relacionadas al metabolismo redox y a procesos celulares para el CS y el CL, respectivamente.

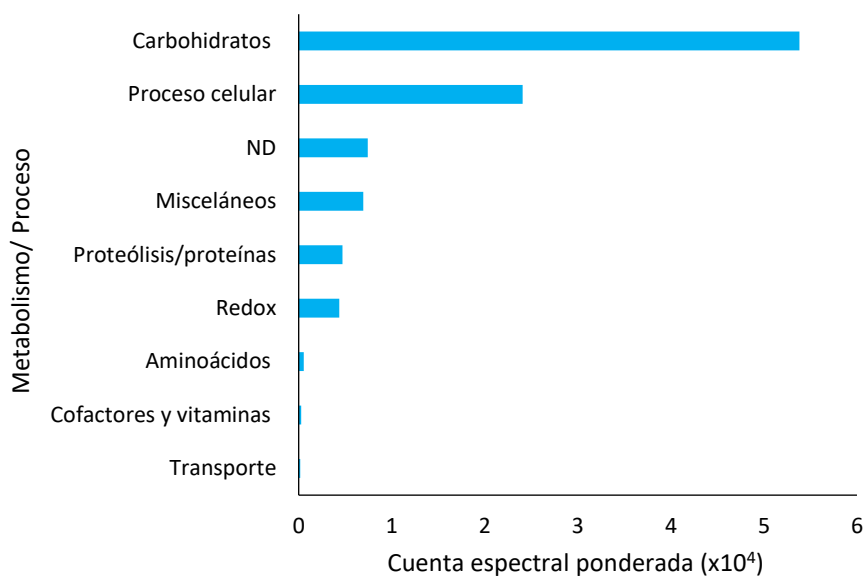


Figura 20. Cuenta espectral ponderada de las proteínas presentes en el secretoma obtenido en cultivo líquido.

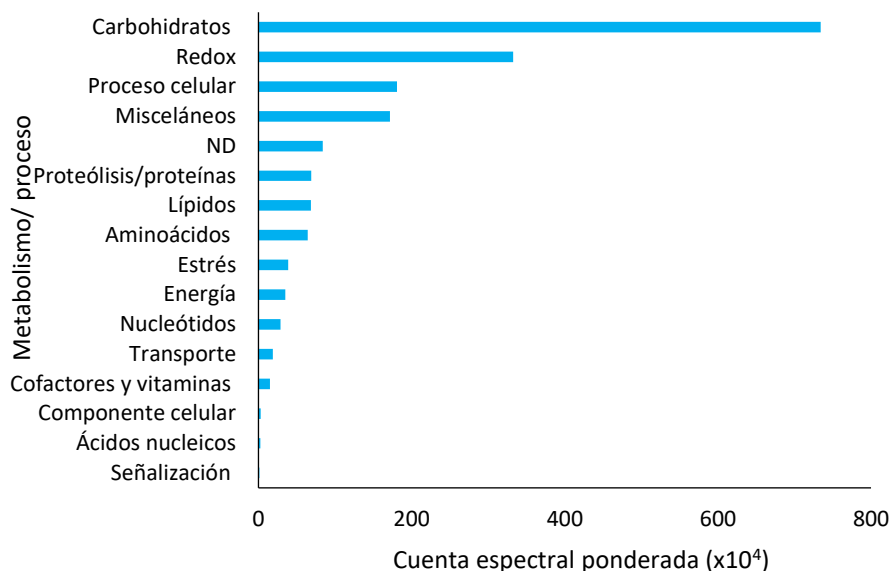


Figura 21. Cuenta espectral ponderada de las proteínas presentes en el secretoma obtenido en cultivo sólido.

A partir de la cuantificación de la abundancia relativa se logró identificar las proteínas sobre o bajo-reguladas en función de la concentración de glucosa; además, se identificaron las proteínas más abundantes de cada grupo, lo que permitió identificar los posibles roles desarrollados durante el crecimiento de *A. brasiliensis*.

A continuación, se muestran las proteínas caracterizadas de *A. brasiliensis*, clasificadas de acuerdo con el metabolismo principal identificado por el análisis bioinformático

7.3.6. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo con el metabolismo principal

En la Figura 14 se muestra la clasificación de las proteínas del secretoma de acuerdo con el metabolismo/proceso principal en que participan, sobresaliendo que en el CS se identificaron proteínas involucradas en un mayor número de procesos. Esta clasificación permitió reconocer el rol que tienen las proteínas identificadas durante el crecimiento de *A. brasiliensis* (Tabla 5).

7.3.6.1. Proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos

El mayor número las proteínas identificadas participa en el metabolismo de carbohidratos. En el caso del CL, el 45.16% (todas con evidencia de secreción) de las 62 proteínas corresponde a este metabolismo (Tabla 5); de ellas, 19 son abundantes, y a la vez, de éstas abundantes seis fueron reguladas: 4 proteínas bajo-reguladas (α -amilasa ácida estable, isopululanasa (HP

ASPBRDRAFT_45424), probable manosil-oligosacárido α -1,2-manosidasa 1B (HP ASPBRDRAFT_27362), y una trehalasa ácida) y dos proteínas sobre-reguladas (pectin liasa y β -xilanasa (HP ASPBRDRAFT_69025)). Sólo la α -glucosidasa y la β -manosidasa A fueron bajo-reguladas en función de la concentración de glucosa sin presentar una alta abundancia en el secretoma; su CEP corresponde el 0.19 y 0.33% de la CEP total para las proteínas del metabolismo de carbohidratos. De las proteínas abundantes no reguladas, la glucoamilasa representó el 62.64% de la CEP total para este grupo. En segundo, tercer y cuarto lugar respecto abundancia, la glucan endo-1,3- β -glucosidasa eglC, endo-1,4- β -xilanasa F1 y endo-1,4- β -xilanasa A presentaron porcentajes entre el 3.77 al 5.83%.

Mientras que, en el secretoma proveniente del CS, se identificaron 74 proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos (Tabla 5), de las cuales, 51 presentaron evidencia de secreción. De las proteínas secretadas, 40 proteínas fueron abundantes (CEP > 1.1×10^{-4}), de las cuales 34 sobre-reguladas. De acuerdo con la abundancia estimada, la endo-1,4- β -xilanasa A fue la más abundante y sobre-regulada representando el 21.37% del valor total de la CEP correspondiente a este metabolismo, la CEP del resto de las proteínas representó entre el 0.21-6.05% de la CEP total de este metabolismo, en donde sobresalen: la malato deshidrogenasa, glucoamilasa y la endo-1,4- β -xilanasa F1. La glucan endo-1,3- β -glucosidasa eglC, glucosa oxidasa, endoglucanasa A, pectin liasa F, fosfoglucomutasa, exo- β -1,3-glucanasa Exg0, glucan 1,3- β -glucosidasa, β -glucosidasa A y α -amilasa se identificaron abundantes y no reguladas. En cambio, una precursor endoglucanasa-1, α -N-arabinofuranosidasa A, glucan endo-1,3- α -glucosidasa, glicosidasa crf2, exo- β -1,3-glucanasa, glucan endo-1,6- β -glucosidasa BGN16.3, N-acetilglucosaminidasa, α -galactosidasa C, α -amilasa, β -manosidasa A y celobiosa deshidrogenasa resultaron no ser abundantes (CEP entre 0.05-0.17% de la CEP total de las proteínas del metabolismo de carbohidratos), pero estas fueron reguladas por la concentración de glucosa.

La CEP normalizada permitió evaluar el tipo y grado de regulación de las proteínas en función de la concentración de glucosa; lo que permitió inferir el grado de represión catabólica en las síntesis de estas proteínas. La baja RC en CS es una de las principales ventajas que tiene sobre el CL, principalmente usando hongos filamentosos (Viniestra-González y Favela-Torres, 2006). Se ha demostrado que enzimas como las tanasas (Aguilar et al., 2001), pectinasas (Díaz-Godínez et al., 2001) e invertasas (Giraldo et al., 2012) son reprimidas en CL, al contener glucosa y otro sustrato en el medio. Generalmente, la glucosa cuando se encuentra en el medio se considera un represor

catabólico que reprime los genes que codifican enzimas relacionadas a la degradación de polisacáridos (por ejemplo, xilanasas, celulasas, arabinasas, etc.), debido a que es una fuente de carbono eficiente en energía y fácilmente metabolizable (Ries et al., 2016). Entonces, la bajo-regulación de algunas enzimas en CL, como la ácida α -amilasa estable, isopululanasa (HP ASPBRDRAFT_45424) o β -xilanasas (HP ASPBRDRAFT_69025) indicó un cierto nivel de RC en estas enzimas. En cambio, la sobre-regulación de enzimas como: xilanasas, gluconasas, glucosidasas, arabinofuranosidasas, amilasas, galactosidasas, por mencionar algunas, afirman la ausencia de RC en CS. La alta abundancia de la endo-1,4- β -xilanasas A, muestra el bajo efecto represor que tiene la glucosa en CS, similar a lo reportado previamente con *A. niger*, que produce alrededor de 10 veces más α -amilasa y amiloglucosidasa en CS que en CL (Nandakumar et al., 1999), así como, mayor producción de endo- y exo-poligalacturonasa con altas concentraciones en CS (Solis-Pereyra et al., 1996).

Un factor considerado clave durante la secreción de metabolitos y proteínas, y la baja RC en altas concentraciones de sustrato es la baja actividad de agua (A_w) en CS (Gomes et al., 2018). Se ha considerado que con bajos niveles de A_w se reduce la difusión de azúcares fácilmente metabolizables presentes en el medio, formando gradientes en el soporte sólido que, junto con la formación de agregados microbianos, mantienen concentraciones limitantes de nutrientes independientemente de su concentración en el medio de cultivo (Viniestra-González y Favela-Torres, 2006; Maeda et al., 2004). El porcentaje de humedad en CS descendió hasta un 13% del valor inicial en la concentración mínima (Figura 22), partiendo del 60.62 al 52.76 % en 180 g/L. También, el análisis de las proteínas expresadas en la ruta glicolítica y en el ciclo de ácidos tricarbónicos podría aportar información relevante para comprender la baja RC, ya que previamente se ha relacionado la baja RC a una disminución en la expresión de genes de enzimas relacionadas a éstas rutas metabólicas (Maeda et al., 2004).

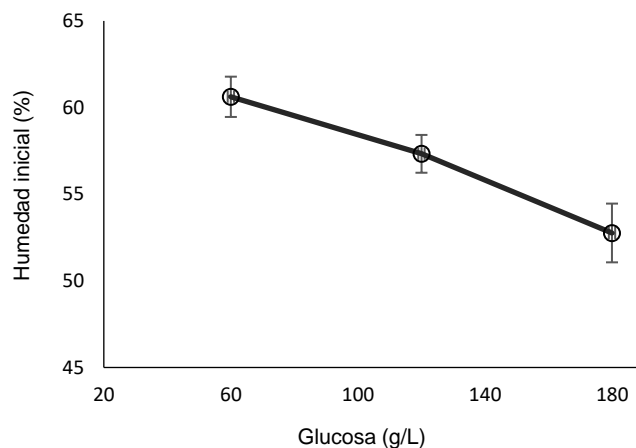


Figura 22. Contenido de humedad inicial en función de la concentración de glucosa en cultivo sólido.

Aunque la RC de enzimas involucradas en la hidrólisis de polisacáridos por fuente de carbono en CL es bien conocida, en este trabajo se encontró que la β -xilanasas y la pectina liasa F fueron sobre-reguladas en función de la concentración inicial de glucosa. Este resultado indica que la expresión de los genes de estas enzimas no es reprimida por la presencia de glucosa en el medio, y podrían ser interesantes candidatas para estudiar mecanismos de regulación alternos a la clásica RC realizada por el factor de transcripción CreA, y así tener un mayor panorama de lo que sucede en CS. Es posible que las proteínas sobre-reguladas y sin RC por la glucosa en CS, no sean reguladas por CreA/CreB como sucede con la xilanasas, glucosidasas y amilasas provenientes de *A. oryzae*, donde al eliminar dichos factores incrementó la actividad de las enzimas en CL, mientras que, sólo la amilasa incrementó su actividad en CS (Ichinose et al., 2014, 2018), concluyendo que los mecanismos de RC por CreA/CreB no son generales para todas las proteínas y dependerán del tipo de cultivo.

Por lo tanto, la presencia de proteínas degradadoras de polisacáridos y su regulación en función de la concentración de glucosa, nos permitieron reafirmar que, en CS, la RC es menor que en CL; sin embargo, la identificación de una β -xilanasas y pectin liasa F, ambas sobre-reguladas en CL, indican que no todas las proteínas son reprimidas bajo un mismo mecanismo y que pueden ser candidatas de estudios posteriores para el entendimiento de la RC en ambos sistemas.

7.3.6.2. Proteínas asociadas al metabolismo redox y al estrés

En este grupo se encuentran proteínas que se han identificado como proteínas de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ERO's); así como, mecanismos de defensa contra otros tipos de estrés.

En total 9 proteínas fueron asociadas al proceso redox en CL (Tabla 5), de las cuales 8 proteínas presentaron evidencia de secreción, siendo la sulfidril oxidasa y la oxigenasa dependiente de FAD (XP_001389952.1) abundantes y bajo-reguladas; mientras que, la catalasa R, proteína de dominio de unión a FAD (XP_001394372.1) y una proteína similar a reductasa (XP_001389120.1) no presentaron algún tipo de regulación. Únicamente la proteína de dominio de unión a FAD (XP_001390502.1) es bajo-regulada y no abundante. En la Figura 20, la suma de la CEP de todas las proteínas asociadas a este metabolismo en CL, se encuentra en sexto lugar en cuanto abundancia, mientras que, en CS, es el segundo grupo más abundante en el secretoma de *A. brasiliensis*.

En CS se identificaron 28 proteínas asociadas al metabolismo redox; 19 de ellas con evidencia de secreción. Dentro de las proteínas con evidencia de secreción, 13 proteínas fueron abundantes y de éstas, 11 sobre-reguladas: proteína similar a reductasa (XP_001389120.1), superóxido dismutasa [Cu-Zn], sulfidril oxidasa, dos isoformas de catalasa R, superóxido dismutasa [Mn], Rho inhibidor de disociación de GDP, peroxirredoxina pmp20, aldo-ceto reductasa, peroxidasa (HP ASPBRDRAFT_179180) y la lacasa-1; mientras que, la tiorredoxina reductasa y una proteína hipotética (HP ASPBRDRAFT_134466) sólo fueron abundantes, y la oxígenoasa dependiente de FAD (XP_001389952.1) sólo se sobre-reguló. De las proteínas reguladas, la CEP de las primeras ocho representó el 1.48-25.51% de la CEP total para este grupo.

Por otra parte, en CL no se encontraron proteínas asociadas a mecanismos de defensa contra estrés. En cambio, en CS se identificaron 6 proteínas; de las cuales glutamato deshidrogenasa específica de NADP y una proteína de la familia dominio Aha1 (XP_001401891.1) presentaron evidencia de secreción.

Los resultados indican la presencia de un mejor sistema proteico para mantener un balance redox en CS, probablemente debido al incremento del O₂ disponible y el nivel de la ramificación (Barrios-González, 2018; Gomes et al., 2018). Un estudio reporta que *A. terreus* presenta un mayor balance redox en condiciones de CS que en CL, donde en este último, la concentración de ERO's es alrededor de 10 veces más durante el crecimiento exponencial (Miranda et al., 2013), siendo la fase de crecimiento donde se tomaron las muestras de *A. brasiliensis* en nuestro estudio. Se sabe que debe existir un balance entre enzimas productoras y degradadoras de ERO's, ya que estas influyen sobre los mecanismos de señalización, regulando la ramificación de las hifas, así como, el metabolismo secundario (Li et al., 2015). La identificación de enzimas antioxidantes y su sobre-

regulación como la superóxido dismutasa, catalasas, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa son útiles como marcadores de estrés oxidativo (Grintzalis et al., 2014).

En ambos cultivos, se identificaron dos isoformas de catalasas R, siendo abundantes y sobre-reguladas en CS. La catalasa R junto con peroxidasa metabolizan el H_2O_2 producido extracelularmente por la glucosa oxidasa y la D-6 hidroxicotina oxidasa (ambas identificadas en CS) (Baez y Shiloach, 2014; Doyle, 2011; Volke-Sepulveda et al., 2016), y por la alta transferencia y disponibilidad de O_2 en CS (Gomes et al., 2018; Viniegra-González y Favela-Torres, 2006). La catalasa junto con la superóxido dismutasa trabajan sinérgicamente como mecanismo de defensa y tienen un papel importante en la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* (Grintzalis et al., 2014)

Se identificaron dos superóxido dismutasas en CS, la superóxido dismutasa [Cu-Zn] (abundante) y superóxido dismutasa [Mn]. Aunque la actividad de estas enzimas tiene lugar dentro de las células (Lambou et al., 2010), en este estudio, ambas fueron encontradas en el secretoma y presentan péptido señal, lo que sugiere su presencia en la región extracelular en *A. brasiliensis*.

Otra proteína relevante es la peroxirredoxina, dos isoformas fueron identificadas en abundancia en CS; solo una de ellas presenta evidencia de secreción. Las peroxirredoxinas son abundantes en levaduras y en hongos filamentosos, representando hasta el 1% de la proteína soluble de la célula (Breitenbach et al., 2015). Las peroxirredoxinas, peroxidasa y lacasa también han sido identificadas en otros secretomas de otros *Aspergillus* (Adav et al., 2010; Carrillo-Sancen et al., 2016; Lu et al., 2010; Sorensen et al., 2009; Volke-Sepulveda et al., 2016).

A pesar de que la dipeptidil peptidasa III participa en la proteólisis, tiene una participación importante en la eliminación de H_2O_2 (García Ortiz, 2016; Liu et al., 2007). Su presencia en medios con 120 y 180 g/L en CS, indica que la concentración de glucosa y el tipo de cultivo inducen su expresión para ser parte del sistema de defensa contra el estrés oxidativo.

A primera vista, la sobre-regulación de enzimas antioxidantes en función de la concentración de glucosa por parte de *A. brasiliensis* podrían indicar un incremento en la producción de ERO's, provocando un estrés oxidativo. Sin embargo, esto no puede ser el resultado del incremento de las concentraciones de glucosa, ya que previamente (Volke-Sepulveda et al., 2016) se reportó una bajo-regulación de estas enzimas bajo condiciones similares usando 30-180 g/L de glucosa, afirmando una baja presencia de ERO's. Una diferencia relevante que tiene un impacto en los perfiles de regulación de las enzimas antioxidantes entre ambos estudios es el tipo de reactor.

El estudio realizado por Volke-Sepulveda et al., (2016), emplearon matraces Erlenmeyer, mientras que, en nuestro estudio se utilizaron columnas de vidrio verticales, donde el flujo de aire pasaba a través de todo el soporte, así, mejorando la transferencia y disponibilidad del O₂.

La identificación de un alto número de enzimas antioxidantes en CS demuestra que *A. brasiliensis* secreta un eficiente sistema antioxidante durante una fase temprana de crecimiento, y la sobre-regulación que presentan podría ligarse a la creciente producción de ERO's a causa de una mayor disponibilidad de O₂ y un incremento en la ramificación.

7.3.6.3. Proteínas clasificadas como componente/proceso celular

La suma de la CEP de las proteínas relacionadas a procesos celulares, indica que es el segundo grupo más abundante dentro de las proteínas de CL, y el tercero en CS. En CL, 6 proteínas se relacionan con estos procesos (Tabla 5), donde la YkgB y la 1,3-β-glucanosiltransferasa gel1 fueron consideradas abundantes bajo-reguladas, mientras que, la proteína PhiA de pared celular, 1,3-β-glucanosiltransferasa (HP ASPBRDRAFT_142667) y la 1,3-β-glucanosiltransferasa gel2 fueron identificadas como abundantes sobre-reguladas. Otra glucanasa, la 1,3-β-glucanosiltransferasa gel3 fue considerada únicamente bajo-regulada.

Por otra parte, en el secretoma de CS, 21 proteínas se asociaron con esta función (Tabla 5) presentando 12 proteínas evidencia de secreción, siendo 9 abundantes, y a su vez, 6 de estas sobre-reguladas: la 1,3-β-glucanosiltransferasa gel1, proteína ypt1 de unión a GTP, 1,3-β-glucanosiltransferasa gel2, proteína similar a esferulina de superficie celular 4, 1,3-β-glucanosiltransferasa gel3 y la HP ASPBRDRAFT_27493, siendo la 1,3-β-glucanosiltransferasa gel1 y la proteína ypt1 de unión a GTP, las más abundantes con un porcentaje de la CEP total del 28.81 y 23.34%, respectivamente. Las proteínas YkgB, nitrilasa (HP ASPBRDRAFT_40942) y la proteína de la familia dienelectona hidrolasa (XP_001393178.1) únicamente resultaron ser abundantes, sin regulación alguna.

En cuanto a las proteínas que participan como componente celular, 3 fueron identificadas exclusivamente en CS: teniendo sólo una con evidencia de secreción, la HP ASPBRDRAFT_58357 abundante y sobre-regulada.

Durante el crecimiento celular de los hongos filamentosos, es indispensable la presencia de diversas proteínas que participan en el mantenimiento y la elongación de las hifas (Free, 2013). Las glucanosiltransferasas y la ecm33 se presentan en ambos cultivos, estas se encuentran asociadas,

principalmente al mantenimiento de la pared celular; la ecm33 fue abundante en ambos cultivos (Tabla 5). Las glucanosiltransferasas se encargan principalmente de la elongación de glucanos durante el crecimiento de las hifas, los glucanos son un componente principal para la pared celular (Free, 2013; Zhao et al., 2013), y la ecm33 se considera esencial en la morfología y esporulación del hongo (Chabane et al., 2006), esta proteína pertenece a la familia de las proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidilinositol), y junto con las glucanosiltransferasas son componentes para la integridad de la pared celular, además es considerada la proteína más abundante de la pared celular (Free, 2013; Romano et al., 2006). La emc33 es una proteína que facilita el transporte de glucosa al interior de la célula activando la ruta de señalización TORC1, para activar la proliferación celular en *S. cerevisiae* (Umekawa et al., 2017). Es posible que la emc33, la cual se encuentra en abundancia en ambos cultivos, participe en la asimilación de la glucosa del medio, así facilitando su consumo.

Los resultados demuestran que el sistema de proteínas asociadas al crecimiento de *A. brasiliensis* es más complejo en CS, ya que también diversas proteínas que participan en el metabolismo de carbohidratos tienen alguna función durante el desarrollo celular del hongo. Entre ellas se encuentran la quitinasa, N-acetilglucosaminidasa, galactosidasas, glucosidasas, y la β -manosidasa, las cuales se encargan de sintetizar/degradar la quitina y el galactomanano (Meijer et al., 2011; Müller et al., 2002) que son componentes de la pared celular; la cual se constituye de ~4% de β -1,6-glucano ramificado, 20-35% de β -1,3-glucano, 35-46% de α -1,3-glucano, 20-25% de galactomananos (galactofuranosa), 7-15% de quitina (N-acetil-glucosamina) y otros (galactosamina galactano, glicoproteínas de pared celular (galactomano-proteínas)) (Gastebois et al., 2009; Park et al., 2016; Schachtschabel et al., 2012).

A pesar de identificar diversas proteínas asociadas al crecimiento en CS, la proteína PhiA de pared celular fue identificada exclusivamente en CL. La proteína PhiA es una proteína estructural en hongos filamentosos, sin embargo, su presencia abundante en CL indica que puede participar como un mecanismo de defensa contra alguna clase de estrés generado por las condiciones del cultivo (Svanström et al., 2013).

Por otro lado, entre las proteínas identificadas únicamente en CS se encuentra la proteína 14-3-3 asociada a diversos procesos celulares. Esta proteína está asociada a resistencia estructural y se considera importante para una morfogénesis normal en los hongos (Ibarra et al., 2018). La proteína 14-3-3 participa en la síntesis de aflatoxinas con *A. flavus* (Ibarra et al., 2018), en la señalización a través de diversas interacciones (Stevens et al., 2018), así como, en el desarrollo de

las hifas de *A. nidulans* (Kraus et al., 2002) y la secreción de proteína con *Trichoderma reesei* (Vasara et al., 2002), estas dos últimas funciones podrían relacionarse a los resultados obtenidos en este estudio, como es el alto nivel de ramificación y la alta secreción de proteína por parte de *A. brasiliensis*. A pesar de que no presenta evidencia de secreción (SignalP y SecretomeP) su abundancia y su identificación extracelularmente de dos isoformas, sugiere que estas proteínas podrían desempeñar un papel importante durante la elevación de la secreción y ramificación, ya que de acuerdo con la base de datos *Aspergillus Genome Database* es secretada (Volke-Sepulveda et al., 2016), además previamente se han identificado en *S. pombe*, *S. cerevisiae* y *A. nidulans* dos isoformas de la proteína 14-3-3 (Kraus et al., 2002). Esta proteína durante la secreción se vincula a la exocitosis interactuando con las proteínas Sec (Vasara et al., 2002).

El crecimiento de las puntas hifales se caracteriza por una secreción altamente polarizada y la síntesis de la pared celular, ambas localizadas cerca de los vértices de las hifas extendidas (Read, 2011). La exocitosis es un proceso que administra enzimas que participan en la síntesis de la pared celular, proteínas y lípidos de membrana a la membrana plasmática apical durante el desarrollo de las puntas (Read, 2011), considerándolo un proceso importante para el crecimiento de las hifas y la secreción de enzimas (Shoji et al., 2014). La exocitosis se realiza al transportar vesículas a la membrana plasmática en la región apical (Shoji et al., 2014); sin embargo, es un proceso que no sólo se realiza en las puntas de las hifas, sino que también en los septos, como se ha demostrado con *A. oryzae* (Hayakawa et al., 2011). Se sugiere la posibilidad de una alta actividad exocítica en *A. brasiliensis* debido a la presencia extracelular de la proteína ypt1 de unión a GTP, la cual puede trabajar en conjunto con las proteínas intracelulares Rab7 relacionada con Ras/dGTPasa, proteína Rab-11A relacionada con Ras y un componente del complejo de exocitosis Sec8, que al igual que la proteína 14-3-3 fueron identificadas en 120 y 180 g/L, en donde la ramificación y secreción de proteína fue más alta.

Con las proteínas identificadas en esta sección se puede mencionar que *A. brasiliensis* requiere de un constante mantenimiento/ crecimiento de las hifas, principalmente en CS, en donde proteínas asociadas a la exocitosis fueron identificadas sugiriendo una alta actividad de secreción vesicular, la cual es necesaria para el desarrollo de las hifas, durante la elevada ramificación y secreción de proteína que presentan las altas concentraciones de glucosa.

7.3.6.4. Proteínas asociadas a síntesis de proteínas

De las 62 proteínas que componen al secretoma identificado en CL, 5 proteínas abundantes participan en la síntesis de proteínas (Tabla 5): la tripeptidil-peptidasa sed2 (XP_001400873.1), aspergillopepsin 1 y la carboxipeptidasa S1 bajo-reguladas, y una sobre-regulada, la tripeptidil-peptidasa 1, y una isoforma tripeptidil-peptidasa sed2 (XP_001390847.1) que resultó ser sólo abundante. Las proteínas tripeptidil-peptidasa sed2 (XP_001400873.1) y la aspergillopepsin 1 presentaron una alta CEP, su valor representa el 63.39 y 15.64%, respectivamente, del total estimado para este grupo.

Por otro lado, de las 242 proteínas del CS, 21 fueron clasificadas en este grupo (Tabla 5). Dieciséis proteínas secretadas de acuerdo con SecretomeP y SignalP, identificándose la serina proteinasa pepC (HP ASPBRDRAFT_54314), tripeptidil-peptidasa sed2, carboxipeptidasa S1, aminopeptidasa C, aspartil aminopeptidasa vacuolar Lap4, peptidil-prolil cis-trans isomerasa B, proteína de familia de dominio conservado de factor de elongación 1 (HP ASPBRDRAFT_132450), todas abundantes y sobre-reguladas, en cambio la HP ASPBRDRAFT_49057, sólo resultó ser abundante. La serina proteinasa pepC (HP ASPBRDRAFT_54314) y tripeptidil-peptidasa sed2 presentaron la mayor abundancia en este grupo. La aminopeptidasa Y y la serina carboxipeptidasa se agruparon como proteínas no abundantes reguladas.

Las proteasas son clasificadas de acuerdo con el sitio donde actúan: ácido aspártico, cisteína, serina entre otras (Monod et al., 2002). Principalmente, son utilizadas para la obtención de aminoácidos, así como, en el reciclado y síntesis de proteínas (Jung et al., 1999). Sin embargo, se han identificado que las proteasas fúngicas son secretadas para procesos invasivos, encontrándose sobre la superficie que se adhiere al huésped (Monod et al., 2002).

La tripeptidil-peptidasa sed2, abundante en ambos cultivos, es considerada una exoproteasa y secretada en pH ácido, forma parte de la familia subtilisina, son peptidasas de aminos no específicos, pero no son capaces de cortar antes y después de prolina (Eugster et al., 2015). Es posible que su presencia en abundancia y regulación en CS, se encuentre relacionada a la alta secreción de proteínas, y a los procesos de adherencia. También, la serina proteinasa encontrada en abundancia puede tener un papel fundamental en procesos invasivos, ya que diversas serina proteinasas son consideradas alérgenos de *A. fumigatus*, ésta participa junto con el alérgeno Asp f4, la proteasa aspártica y la peptidil prolil isomerasa (Shen et al., 2001), las cuales se identificaron en CS.

A pesar de que, los cultivos fueron balanceados para mantener la disponibilidad de nitrógeno para la síntesis de proteínas durante el crecimiento, varias proteasas fueron identificadas, asociándose a la síntesis de proteínas, y debido al alto número identificado en CS, algunas podrían ser relevantes para los procesos de adhesión al soporte inerte.

7.3.6.5. Proteínas asociadas al metabolismo de lípidos

Este tipo de proteínas se identificaron únicamente en CS, teniendo un total de 10 proteínas (1 intracelular). De las que presentaron evidencia de secreción, 5 proteínas se sobre-regularon: la lipasa, proteína de dominio SUN (Uth1) / triacilglicerol lipasa, triacilglicerol lipasa, colinesterasa y un precursor de lipasa, las primeras tres fueron abundantes dentro de grupo.

Las lipasas hidrolizan triglicéridos teniendo productos como ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones pueden catalizar la reacción reversa. La alta secreción de lipasas por *A. brasiliensis* en CS puede deberse a la alta similitud que tiene con *A. niger*, que es considerado uno de los mejores productores de lipasas, además de que se ha encontrado que en CS es mayor la producción que en CL (Falony et al., 2006), lo que sugiere una baja concentración de lipasas en CL, y posiblemente esto dificultará su identificación a través de MS/MS. También, es posible que la alta presencia de lipasas en CS sea inducida por un aumento de la permeabilidad de la membrana celular en *A. brasiliensis*, ya que, microorganismos como *A. niger* y *Monascus purpureus* incrementan la concentración de ácidos grasos insaturados en CS (Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Zhang et al., 2015), lo que facilita el consumo de glucosa y, por ende, elevar la tasa de producción de CO₂, incrementar la velocidad de crecimiento e incrementar la secreción de proteína.

Por otra parte, las lipasas identificadas participan en el metabolismo de glicerolípidos de acuerdo con KEGG. Esto puede ser relevante para la síntesis de la pared celular, ya que se encuentra constituida de diversas proteínas que contienen un ancla de GPI, molécula glicolipídica, que permite anclar proteínas dentro de parte externa de la bicapa de la membrana plasmática; las proteínas que son secretadas a través de un péptido señal son sujetas al anclaje por GPI; las proteínas integrales son importantes para la biogénesis de la pared celular, otras pueden funcionar como sensores, adhesinas, adquisición de hierro y en liberación de ERO's (Free, 2013).

Por lo tanto, las lipasas identificadas se encuentran relacionadas principalmente a la síntesis de la pared celular, en donde la síntesis de GPI puede ser relevante para la secreción de proteínas, la cual es elevada al incrementar la concentración de glucosa en el medio.

7.3.6.6. Proteínas asociadas al metabolismo de aminoácidos

Dentro de este grupo, 3 proteínas se encontraron en CL, siendo abundantes la amidasa y tirosinasa. Además, la amidasa mostró una bajo-regulación en función de la concentración de glucosa.

En cuanto al secretoma de CS, 16 proteínas se clasificaron dentro de este grupo. Seis son consideradas extracelulares: aril-alcohol deshidrogenasa, tirosinasa, proteína similar a glutatión S-transferasa Ure2, proteína de la familia alanina racemasa (XP_001400684.1) y dos isoformas de tirosinasa, de las cuales cinco fueron abundantes. Además de ser abundantes las tirosinasas, XP_001389342.1 y XP_001389935.1, también resultaron ser sobre-reguladas. Previamente, el secretoma de *A. brasiliensis* en CS presentó 23 proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos (Volke-Sepulveda et al., 2016).

El tipo de cultivo puede ser un factor relevante para la expresión de ciertas proteínas, como ha descrito Oda et al., (2006), ciertas proteínas son expresadas únicamente en CS o CL, siendo una regulación a nivel transcripcional; por ejemplo, la glucoamilasa B, expresada en el secretoma de *A. oryzae* en CS, mientras que, se encuentra ausente en CL. Un resultado similar fue identificado en nuestro estudio con diversas proteínas. Las tirosinasas son un ejemplo de este fenómeno, en CS se identificaron tres isoformas en abundancia, mientras que, en CL (60 g/L) sólo una isoforma, que se encuentra en común con las condiciones de CS, esto puede sugerir que su presencia es debido a una alta concentración de glucosa. Un estudio previo encontró que *A. oryzae* expresa una tirosinasa exclusivamente en CL, la cual proviene del gen *meIO*, mientras que, la tirosinasa expresada en CS proviene del gen *meIB*, y su homología entre ambas alcanza apenas el 24% (Obata et al., 2004).

La alta presencia de proteínas asociadas al metabolismo de aminoácidos se puede vincular a la alta secreción y diversidad de proteínas observada en CS, siendo los aminoácidos el componente principal de éstas.

7.4. Comparación de resultados entre cultivo sólido y líquido con 60 g/L

Los resultados descritos previamente demuestran el efecto del tipo de cultivo y de la concentración de glucosa sobre el crecimiento de *A. brasiliensis* analizados a través de la respirometría y la composición del secretoma para el CS y CL. Los valores de los parámetros asociados a la respirometría, la ramificación, así como, en la cantidad y diversidad de proteínas secretadas se incrementaron en función de la concentración del medio en CS, dichos valores resultan ser más elevados al compararse con CL. Sin embargo, esto puede ser una desventaja para el CL, ya que, la

concentración de glucosa más alta en CS (180 g/L) es 3 veces mayor a la utilizada en CL (60 g/L). Por esta razón, para tener un panorama de las diferencias debido al tipo de cultivo, se compararon los resultados obtenidos con la misma concentración inicial de glucosa (60 g/L) en ambos tipos de cultivo.

En la Figura 23, se presentan gráficamente los datos de los parámetros obtenidos del análisis respirométrico, previamente mencionados, así como, la cantidad de proteína secretada y el nivel ramificación de *A. brasiliensis* en ambos cultivos, usando 60 g/L de glucosa.

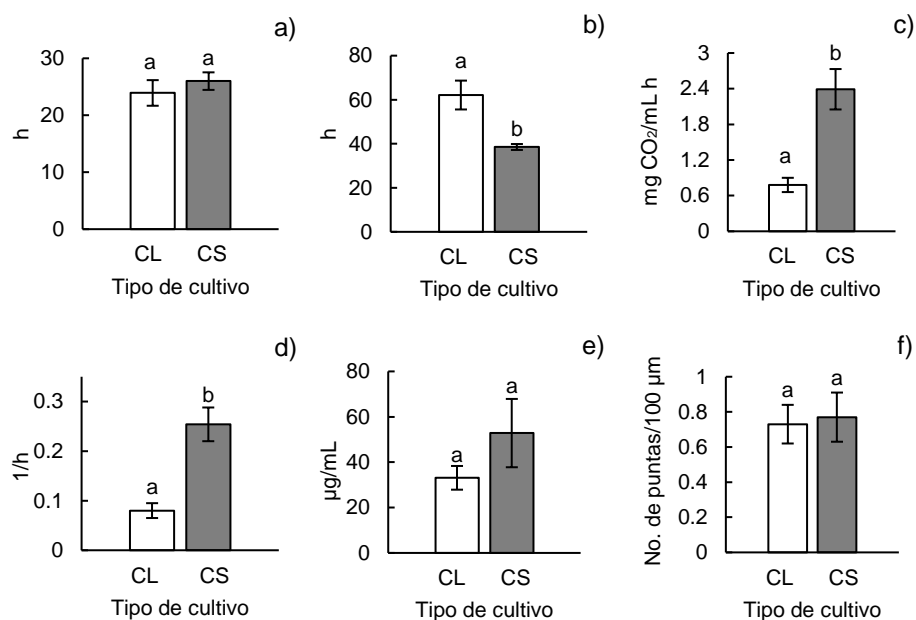


Figura 23. Parámetros asociados al crecimiento de *A. brasiliensis* en cultivo líquido y sólido con 60 g/L. a) fase *lag*, b) tiempo de muestreo, c) MTPCO₂ (Máxima tasa de producción de CO₂, d) μCO₂ (Tasa específica de producción de CO₂), e) proteína inicial y f) nivel de ramificación. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de un factor con prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0.05$)).

La comparación de los resultados respirométricos entre CS y CL obtenidos bajo una misma concentración de glucosa inicial, demostraron que no hay diferencias en el tiempo de la fase *lag* de producción de CO₂, ya que esta se encontró entre las 23-26 h; de igual manera, la concentración de proteína en el tiempo de muestreo y el nivel de ramificación no presentaron diferencias significativas entre ambos cultivos (Figura 23). Los resultados obtenidos en la concentración de proteína son opuestos a lo reportado, donde generalmente se muestra mayor secreción en CS que en CL (M. et al., 2016; Oda et al., 2006; G. Zhao et al., 2019). Sin embargo, estos estudios consideran el mismo tiempo de cultivo, tanto para el CS como el CL, y no tienen en cuenta que el crecimiento es más rápido en CS, como se ha demostrado previamente con *A. niger* (Favela-Torres et al., 1998),

y observado indirectamente a partir de la tasa de producción de CO₂, alcanzando la MTPCO₂ a las 38.53 horas, mientras que, en CL a las 62.16 h.

Los resultados respirométricos indicaron que la producción de CO₂ es significativamente menor en CS, alrededor del 14%, al compararse con el CL (Tabla 4 y Figura 24). A pesar de este resultado, la MTPCO₂ y μ CO₂ resultaron ser alrededor de 3 veces más altas en CS. Este resultado puede estar relacionado con el rápido crecimiento de *A. brasiliensis* observado en CS.

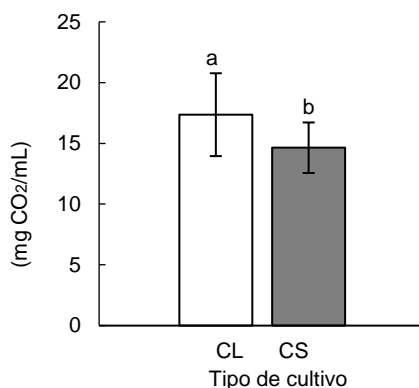


Figura 24. Producción de CO₂ en cultivo líquido (blanco) y sólido (gris) con 60 g/L. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Por otra parte, a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de proteína obtenida con 60 g/L de glucosa en ambos cultivos (Figura 25), el análisis secretómico demostró que hay una mayor diversidad de proteínas en el secretoma de *A. brasiliensis* en condiciones CS (Tabla 5). En total 79 proteínas identificadas en CS y 56 para el CL (Figura 25). El mayor número de proteínas únicas se encuentra en CS, identificando 43 proteínas, siendo 2.15 veces más que en CL (Figura 26). Mientras que, 36 proteínas fueron identificadas en común entre ambos cultivos, siendo en su mayoría relacionadas al metabolismo de carbohidratos, y como segundo grupo abundante, asociadas al metabolismo redox.

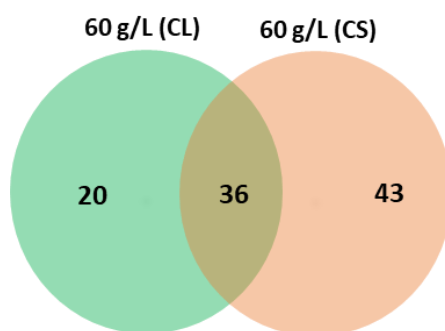


Figura 25. Diagrama de Venn correspondiente a las proteínas secretadas en ambos cultivos por *A. brasiliensis* a 60 g/L.

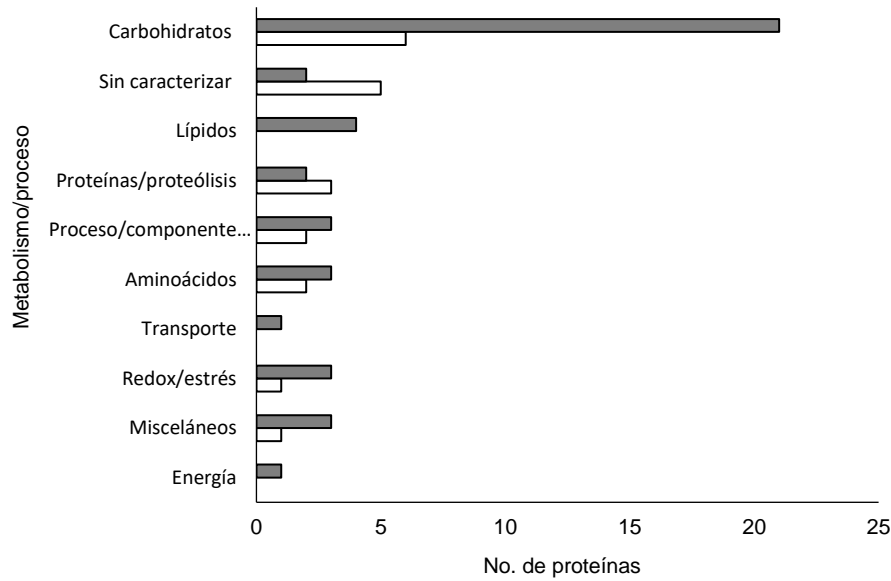


Figura 26. Clasificación de proteínas únicas de cada tipo de cultivo a 60 g/L; Barras vacías: cultivo líquido, barras oscuras: cultivo sólido.

Todas las proteínas únicas de 60 g/L en CL, presentaron evidencia de secreción; en cambio en CS, se identificaron 10 proteínas consideradas intracelulares. Como se ha discutido previamente, la presencia de proteínas sin evidencia de secreción sería el resultado de la participación de proteínas *moonlighting* secretadas vesicularmente, y que pueden estar asociadas a procesos de adhesión, como la transaldolasa y la triosafosfato isomerasa (Serrano-Fujarte et al., 2016; Westermann et al., 2016), por lo que la identificación de estas enzimas en la región extracelular correspondería exclusivamente del CS.

El mayor número de proteínas se concentra en el metabolismo de carbohidratos, sin embargo, al compararse entre CS y CL, se observa 3.5 veces más proteínas en CS; entre estas, diversas glucanasas, glucosidasas, una quitinasa y una N-acetilglucosaminidasa, todas relacionadas al crecimiento celular, lo que sugiere que *A. brasiliensis* utiliza un amplio sistema de enzimas asociadas al crecimiento y mantenimiento de las hifas, lo que hace que el crecimiento sea más rápido en CS, como lo demostró con el corto tiempo que requirió *A. brasiliensis* en alcanzar la MTPCO₂, así como, el alto valor que presentó este parámetro.

Por lo tanto, el tipo de cultivo no es un factor que influya en la alta producción de CO₂ y la concentración de proteína secretada por parte de *A. brasiliensis*, así como, en el nivel de ramificación, ya que los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas al compararse

60 g/L de glucosa entre ambos cultivos, esto demuestra lo contrario a lo reportado frecuentemente con CS. Sin embargo, con el estudio del secretoma se demostró que el tipo de cultivo influye a nivel molecular, en donde el número de proteínas únicas fue mayor en CS; secretando una alta diversidad y número de proteínas relacionadas al crecimiento celular. A partir de esta observación, se puede inferir que *A. brasiliensis* expresa un amplio sistema proteico que permite un crecimiento más rápido en CS, a su vez, dicho cultivo permite obtener la misma concentración de proteína en menor tiempo, y con la ventaja que se puede incrementar aún más la concentración de glucosa sin observar efectos negativos en el crecimiento como se observó en CL.

8. CONCLUSIONES

8.1. Conclusión general

El análisis del secretoma de *Aspergillus brasiliensis* en cultivos sólido y líquido permitió identificar y explicar algunas de las diferencias observadas en los estudios cinéticos y morfométricos realizados en ambos tipos de cultivo; en particular, el estudio secretómico demostró la ausencia de represión catabólica y la secreción de un gran número de proteínas típicamente intracelulares en cultivo sólido; algunas de ellas, posibles proteínas *moonlighting*, que pueden estar asociadas con procesos de adhesión de las hifas a los soportes sólidos. El incremento de la complejidad del secretoma en función de la concentración de glucosa permitió establecer que, en cultivo sólido, *Aspergillus brasiliensis* secreta un importante grupo de proteínas asociadas al metabolismo oxidativo, al crecimiento celular y a la biosíntesis de pared celular; lo que permite explicar algunas de las importantes diferencias fisiológicas y metabólicas entre los cultivos sólido y líquido.

8.2. Conclusiones parciales

- La definición del tiempo de cultivo con base a la máxima tasa de producción de CO₂, para cada cultivo y condición evaluada, estableció un criterio de muestreo que permitió la comparación de muestras biológicas con un estado fisiológico comparable entre los cultivos sólido y líquido.
- La mayor producción de proteína extracelular en cultivo sólido se encontró relacionada con el mayor índice de ramificación de las hifas en este tipo de cultivo. Mientras que, no existen diferencias significativas en cultivo líquido.
- La complejidad del secretoma en cultivo sólido es mayor que en cultivo líquido; el número de proteínas en cultivo sólido aumento al elevar la concentración de glucosa inicial en el medio.
- La mayor parte de las proteínas identificadas en cultivo sólido no están sujetas a represión catabólica; mientras que, en cultivo líquido la identificación de sólo dos enzimas (la pectin liasa F y β -xilanasas), permiten establecer que la represión catabólica por glucosa no es general para todas las proteínas en cultivo líquido, y éstas podrían ser candidatas para el estudio de mecanismos de represión alternos al factor de transcripción CreA.

- La presencia en el secretoma de un número importante de proteínas involucradas en reacciones de óxido-reducción puede estar relacionada con la regulación de especies reactivas de oxígeno; así como, con el aumento en el índice de ramificación en cultivo sólido.
- El incremento en el grado de ramificación y el rápido crecimiento observados en cultivo sólido pueden estar relacionados con un complejo sistema enzimático involucrado en los procesos de biosíntesis de la pared celular durante el crecimiento apical.
- El alto número de proteínas identificadas que no presentaron evidencia de secreción en cultivo sólido sugiere la presencia de mecanismos de secreción aún desconocidos para los hongos filamentosos crecidos en este tipo de cultivo.
- El cultivo sólido induce a *A. brasiliensis* secretar posibles proteínas *moonlighting* que favorecen principalmente a los procesos de adhesión al soporte.

9. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se sugieren las siguientes perspectivas para la realización de posibles estudios que permitan comprender mejor las diferencias entre ambos cultivos.

- Realizar cinéticas de producción de biomasa y consumo de glucosa en ambos cultivos.
- Determinar el nivel de actividad exocítica en cada condición y su posible caracterización del contenido de las vesículas a través de espectrometría de masas.
- Caracterizar el proteoma intracelular para identificar el flujo de carbono en cada tipo de cultivo y a la vez, identificar el cambio de abundancia de las proteínas relacionadas con la secreción.
- Realizar la caracterización de subproteomas (pared celular, vesículas, mitocondrias) para tener la localización específica de las proteínas y determinar con mayor precisión proteínas *moonlighting*.
- Disrupción de genes de posibles proteínas *moonlighting* para determinar sus funciones en *A. brasiliensis*.
- Analizar los niveles de expresión del gen *creA* y determinar su papel en el proceso de represión catabólica en los sistemas de CS y CL, así como, identificar los cambios de los patrones de fosforilación de CreA en ambos sistemas de cultivo.
- Corroborar actividades enzimáticas de aquellas proteínas que se encontraron en mayor número y abundancia, y que podrían tener un papel importante durante el desarrollo celular (por ejemplo, aquellas relacionadas con especies reactivas de oxígeno, síntesis de pared celular, síntesis de biopelículas, enzimas proteolíticas, etc.), así como, la determinación del nivel de expresión de éstas, con el objeto de tener una visión más completa de como responde cada sistema.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., & Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 808–814. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576547>
- Adav, S. S., Li, A. A., Manavalan, A., Punt, P., & Sze, S. K. (2010). Quantitative iTRAQ Secretome Analysis of *Aspergillus niger* Reveals Novel Hydrolytic Enzymes. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 3932–3940. <https://doi.org/10.1021/pr100148j>
- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., & Lu, G. (2018). Carbon catabolite repression in filamentous Fungi. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19010048>
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. In *Nature* (Vol. 422, Issue 6928, pp. 198–207). <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Agger, T., Petersen, J. B., O'Connor, S. M., Murphy, R. L., Kelly, J. M., & Nielsen, J. (2002). Physiological characterisation of recombinant *Aspergillus nidulans* strains with different creA genotypes expressing *A. oryzae* alpha-amylase. *Journal of Biotechnology*, 92(3), 279–285. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00366-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00366-2)
- Ahamed, A., & Vermette, P. (2009). Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, 100(23), 5979–5987. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.070>
- Ambler, V., & Jeffery, C. J. (2015). Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface. *PLOS ONE*, 10(6), e0130575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130575>
- Andersen, M. R., Nielsen, M. L., & Nielsen, J. (2008). Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Molecular Systems Biology*, 4, 178. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.12>
- Anjo, S. I., Figueiredo, F., Fernandes, R., Manadas, B., & Oliveira, M. (2017). A proteomic and ultrastructural characterization of *Aspergillus fumigatus*' conidia adaptation at different culture ages. *Journal of Proteomics*, 161, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.021>
- Asif, A. R., Oellerich, M., Armstrong, V. W., Riemenschneider, B., Monod, M., & Reichard, U. (2006). Proteome of Conidial Surface Associated Proteins of *Aspergillus fumigatus* Reflecting Potential Vaccine Candidates and Allergens. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 954–962. <https://doi.org/10.1021/pr0504586>
- Baez, A., & Shiloach, J. (2014). Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. *Microbial Cell Factories*, 13, 181. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0181-5>
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. In *Process Biochemistry* (Vol. 47, Issue 2, pp. 175–185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>
- Barrios-González, J. (2018). Secondary Metabolites Production: Physiological Advantages in Solid-State Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 257–283. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00013-X>

- Bermúdez-García, E., Peña-Montes, C., Castro-Rodríguez, J. A., González-Canto, A., Navarro-Ocaña, A., & Farrés, A. (2017). ANCUT2, a Thermo-alkaline Cutinase from *Aspergillus nidulans* and Its Potential Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(3), 1014–1036. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2378-z>
- Bladt, T. T., Frisvad, J. C., Knudsen, P. B., & Larsen, T. O. (2013). Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. In *Molecules* (Vol. 18, Issue 9, pp. 11338–11376). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules180911338>
- Bocking, S. P., Wiebe, M. G., Robson, G. D., Hansen, K., Christiansen, L. H., & Trinci, A. P. (1999). Effect of branch frequency in *Aspergillus oryzae* on protein secretion and culture viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(6), 638–648. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10550770>
- Boratyński, F., Szczepańska, E., Grudniewska, A., Gniłka, R., & Olejniczak, T. (2018). Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28412-y>
- Breitenbach, M., Weber, M., Rinnerthaler, M., Karl, T., & Breitenbach-Koller, L. (2015). Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Hosts, and Lignocellulose Degradation. *Biomolecules*, 5(2), 318–342. <https://doi.org/10.3390/biom5020318>
- Brown, L., Kessler, A., Cabezas-Sanchez, P., Luque-Garcia, J. L., & Casadevall, A. (2014). Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin. *Molecular Microbiology*, 93(1), 183–198. <https://doi.org/10.1111/mmi.12650>
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 10, pp. 620–630). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Bruneau, J. M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C., & Latgé, J. P. (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis*, 22(13), 2812–2823. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200108\)22:13<2812::AID-ELPS2812>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200108)22:13<2812::AID-ELPS2812>3.0.CO;2-Q)
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151–159). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Cagas, S. E., Jain, M. R., Li, H., & Perlin, D. S. (2011). Profiling the *Aspergillus fumigatus* proteome in response to caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 146–154. <https://doi.org/10.1128/AAC.00884-10>
- Carrasco Navarro, U. (2017). *Análisis proteómico de las vías de señalización mediadas por la subunidad Ga Pga1 de una proteína G heterotrimérica de Penicillium chrysogenum*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Carrillo-Sancen, G., Carrasco-Navarro, U., Tomasini-Campocoso, A., Corzo, G., Pedraza-Escalona, M. 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. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.09.001>
- Castilho, L. R., Polato, C. M. S., Baruque, E. A., Sant'Anna, G. L., & Freire, D. M. G. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, 4(3), 239–247. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00052-2)

- Chabane, S., Sarfati, J., Ibrahim-Granet, O., Du, C., Schmidt, C., Mouyna, I., Prevost, M.-C., Calderone, R., & Latge, J.-P. (2006). Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Ecm33p Influences Conidial Cell Wall Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3259–3267. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3259-3267.2006>
- Chen, T., Zhao, J., Ma, J., & Zhu, Y. (2015). Web resources for mass spectrometry-based proteomics. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* (Vol. 13, Issue 1, pp. 36–39). Beijing Genomics Institute. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.01.004>
- Chevalier, F. (2010). Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. In *Proteome Science* (Vol. 8, p. 23). <https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-23>
- Colin, V. L., Baigorí, M. D., & Pera, L. M. (2013). Tailoring fungal morphology of *Aspergillus niger* MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: biotechnological applications. *AMB Express*, 3(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-27>
- Conesa, A., Punt, P. J., Van Luijk, N., & Van den Hondel, C. A. M. J. J. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 155–171). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1276>
- Coutinho, P. M., Andersen, M. R., Kolenova, K., vanKuyk, P. A., Benoit, I., Gruben, B. S., Trejo-Aguilar, B., Visser, H., van Solingen, P., Pakula, T., Seiboth, B., Battaglia, E., Aguilar-Osorio, G., de Jong, J. F., Ohm, R. A., Aguilar, M., Henrissat, B., Nielsen, J., Ståhlbrand, H., & de Vries, R. P. (2009). Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 46 Suppl 1, S161–S169. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.020>
- Cunha, F. M., Esperança, M. N., Zangirolami, T. C., Badino, A. C., & Farinas, C. S. (2012). Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. *Bioresource Technology*, 112, 270–274. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.02.082>
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339–1345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032>
- Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., & Viniegra-González, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26(5), 271–275. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000113>
- Domingues, Queiroz, Cabral, & Fonseca. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5–6), 394–401. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713213>
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. In *Science* (Vol. 312, Issue 5771, pp. 212–217). <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Doyle, S. (2011). Fungal proteomics: From identification to function. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 321, Issue 1, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02292.x>
- Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*, 30. <https://doi.org/10.3791/1431>
- Dynesen, J., & Nielsen, J. (2003). Branching is coordinated with mitosis in growing hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 40(1), 15–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948510>

- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. In *Applied Spectroscopy Reviews* (Vol. 44, Issue 3, pp. 210–230). Taylor & Francis Group . <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>
- El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 225–261). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50010-4>
- Eugster, P. J., Salamin, K., Grouzmann, E., & Monod, M. (2015). Production and characterization of two major *Aspergillus oryzae* secreted prolyl endopeptidases able to efficiently digest proline-rich peptides of gliadin. *Microbiology (United Kingdom)*, *161*(12), 2277–2288. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000198>
- Falony, G., Armas, J. C., Mendoza, J. C. D., & Hernández, J. L. M. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, *44* (2), 235–240. <https://www.ftb.com.hr/archives/80-volume-44-issue-no-2/452-production-of-extracellular-lipase-from-aspergillus-niger-by-solid-state-fermentation>
- Favela-Torres, E., Cordova-López, J., García-Rivero, M., & Gutiérrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, *33*(2), 103–107. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00032-0)
- Ferreira de Oliveira, J. M. P., van Passel, M. W. J., Schaap, P. J., & de Graaff, L. H. (2010). Shotgun proteomics of *Aspergillus niger* microsomes upon D-xylose induction. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(13), 4421–4429. <https://doi.org/10.1128/AEM.00482-10>
- Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., Farinas, C. S., Ximenes, E., & Ladisch, M. R. (2016). Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, *90*, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.011>
- Free, S. J. (2013). Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In *Advances in genetics* (Vol. 81, pp. 33–82). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Freson, K. (2019). The Platelet Proteome. In *Platelets* (pp. 155–167). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813456-6.00008-4>
- Gamarra, N. N., Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2010). Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(2), 545–551. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2540-4>
- Gancedo, C., Flores, C.-L., & Gancedo, J. M. (2016). The Expanding Landscape of Moonlighting Proteins in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(3), 765–777. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-16>
- García Ortiz, N. (2016). CALIDAD Y PROTEOMA DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae* PRODUCIDOS CON ATMÓSFERAS MODIFICADAS. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Gastebois, A., Clavaud, C., Aïmanianda, V., & Latgé, J.-P. (2009). *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiology*, *4*(5), 583–595. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.29>
- Gautam, P., Shankar, J., Madan, T., Sirdeshmukh, R., Sundaram, C. S., Gade, W. N., Basir, S. F., & Sarma, P. U. (2008). Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(12), 4220–4227. <https://doi.org/10.1128/AAC.01431-07>

- Giraldo, M. A., da Silva, T. M., Salvato, F., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S. (2012). Thermostable invertases from *Paecylomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0837-9>
- Gomes, E., da Silva, R., de Cassia Pereira, J., & Ladino-Orjuela, G. (2018). Fungal Growth on Solid Substrates: A Physiological Overview. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 31–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00003-7>
- Gomes, J., Zeni, J., Cence, K., Toniazzo, G., Treichel, H., & Valduga, E. (2011). Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 281–287. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2010.10.002>
- González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Ruiz, L., Turróni, F., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2012). Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3992–3998. <https://doi.org/10.1128/AEM.08024-11>
- Gow, N. A. R., Latge, J.-P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Grintzalis, K., Vernardis, S. I., Klapa, M. I., & Georgiou, C. D. (2014). Role of oxidative stress in sclerotial differentiation and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5561–5571. <https://doi.org/10.1128/AEM.01282-14>
- Gulcicek, E. E., Colangelo, C. M., McMurray, W., Stone, K., Williams, K., Wu, T., Zhao, H., Spratt, H., Kurosky, A., & Wu, B. (2005). Proteomics and the Analysis of Proteomic Data: An Overview of Current Protein-Proteomics Profiling Technologies. *Current Protocols in Bioinformatics*, 10(1), 13.1.1-13.1.31. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1301s10>
- Gustavo Viniegra-González* and Ernesto Favela-Torres. (2006). *Why Solid-State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression?* <http://www.ftb.com.hr/archives/76-volume-44-issue-no-3/389-why-solid-state-fermentation-seems-to-be-resistant-to-catabolite-repression>
- Gutiérrez-Rojas, M., Córdova, J., Auria, R., Revah, S., & Favela-Torres, E. (1995). Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnology Letters*, 17(2), 219–224. <https://doi.org/10.1007/BF00127992>
- Han, M.-J., Kim, N.-J., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (2010). Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. *Current Genetics*, 56(4), 369–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0308-0>
- Harris, S. D. (2008). Branching of fungal hyphae: Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100(6), 823–832. <https://doi.org/10.3852/08-177>
- Hayakawa, Y., Ishikawa, E., Shoji, J. ya, Nakano, H., & Kitamoto, K. (2011). Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Molecular Microbiology*, 81(1), 40–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07700.x>
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., & Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. In *Microbiology* (Vol. 153, Issue 6, pp. 1677–1692). <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007641-0>
- Hill, T. W., & Kafer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter*.

- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutillier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreau, M., Musk, B., ... Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. In *Nature* (Vol. 415, Issue 6868, pp. 180–183). <https://doi.org/10.1038/415180a>
- Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 8, Issue 3, pp. 301–306). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.006>
- Houseknecht, J., Stamenova, E., Suh, S.-O., Beck, B., McKee, M., & Zhou, J. (2008). Reclassification of ATCC® 16404TM and ATCC® 9642TM as *Aspergillus brasiliensis*. *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter – Vol. 14 (10)*.
- Huberts, D. H. E. W., & van der Klei, I. J. (2010). Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(4), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.022>
- Ibarra, B. A., Lohmar, J. M., Satterlee, T., McDonald, T., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2018). The 14-3-3 protein homolog ArtA regulates development and secondary metabolism in the opportunistic plant pathogen *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02241-17>
- Ichinose, S., Tanaka, M., Shintani, T., & Gomi, K. (2014). Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5353-4>
- Ichinose, S., Tanaka, M., Shintani, T., & Gomi, K. (2018). Increased production of biomass-degrading enzymes by double deletion of creA and creB genes involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(2), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.08.019>
- Iwashita, K., Nagahara, T., Kimura, H., Takano, M., Shimoi, H., & Ito, K. (1999). The bglA gene of *Aspergillus kawachii* encodes both extracellular and cell wall-bound beta-glucosidases. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5546–5553. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10584016>
- Jami, M. S., Barreiro, C., García-Estrada, C., & Martín, J. F. (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: Characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(6), 1182–1198. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900327-MCP200>
- Jeffery, C. J. (2015). Why study moonlighting proteins? *Frontiers in Genetics*, 6, 211. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00211>
- Joffe, L. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., & Del Poeta, M. (2016). Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection. *MSphere*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00099-16>
- Jun, H., Kieselbach, T., & Jönsson, L. J. (2011). Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68>
- Jung, G., Ueno, H., & Hayashi, R. (1999). Carboxypeptidase Y: Structural basis for protein sorting and catalytic triad. In *Journal of Biochemistry* (Vol. 126, Issue 1, pp. 1–6). Japanese Biochemical Society. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022408>
- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.

<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

- Kapp, K., Schrempf, S., Lemberg, M. K., & Dobberstein, B. (2013). *Post-Targeting Functions of Signal Peptides*.
- Kim, Y., Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2007). Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 44(9), 886–895. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.12.001>
- Kniemeyer, O. (2011). Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. In *Proteomics* (Vol. 11, Issue 15, pp. 3232–3243). <https://doi.org/10.1002/pmic.201100087>
- Kraus, P. R., Hofmann, A. F., & Harris, S. D. (2002). Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. *FEMS Microbiology Letters*, 210(1), 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11160.x>
- Krijgheld, P., Altelaar, A. F. M., Post, H., Ringrose, J. H., Müller, W. H., Heck, A. J. R., & Wösten, H. A. B. (2012). Spatially resolving the secretome within the mycelium of the cell factory *Aspergillus niger*. *Journal of Proteome Research*, 11(5), 2807–2818. <https://doi.org/10.1021/pr201157b>
- Kwon-Chung, K. J., & Sugui, J. A. (2013). *Aspergillus fumigatus*-What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? *PLoS Pathogens*, 9(12), 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743>
- Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., & Latge, J. P. (2010). Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*, 75(4), 910–923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07024.x>
- Lee, I. H., Walline, R. G., & Plamann, M. (1998). Apolar growth of *Neurospora crassa* leads to increased secretion of extracellular proteins. *Molecular Microbiology*, 29(1), 209–218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701815>
- Lekha, P. K., & Lonsane, B. K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry*, 29(6), 497–503. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)85019-4](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)85019-4)
- Li, C., Shi, L., Chen, D., Ren, A., Gao, T., & Zhao, M. (2015). Functional analysis of the role of glutathione peroxidase (GPx) in the ROS signaling pathway, hyphal branching and the regulation of ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.07.008>
- Li, Y., Peng, X., & Chen, H. (2013). Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(4), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.04.001>
- Lin, D., Tabb, D. L., & Yates, J. R. (2003). Large-scale protein identification using mass spectrometry. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1646, Issues 1–2, pp. 1–10). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00546-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00546-0)
- Liu, D., Li, J., Zhao, S., Zhang, R., Wang, M., Miao, Y., Shen, Y. and Shen, Q. (2013). Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 149. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/149>
- Liu, T., Song, T., Zhang, X., Yuan, H., Su, L., Li, W., Xu, J., Liu, S., Chen, L., Chen, T., Zhang, M., Gu, L., Zhang, B., & Dou, D. (2014). Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature Communications*, 5(1), 4686. <https://doi.org/10.1038/ncomms5686>

- Liu, X.-D., Xie, L., Wei, Y., Zhou, X., Jia, B., Liu, J., & Zhang, S. (2014). Abiotic Stress Resistance, a Novel Moonlighting Function of Ribosomal Protein RPL44 in the Halophilic Fungus *Aspergillus glaucus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(14), 4294–4300. <https://doi.org/10.1128/AEM.00292-14>
- Liu, Y., Kern, J. T., Walker, J. R., Johnson, J. A., Schultz, P. G., & Luesch, H. (2007). A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(12), 5205–5210. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700898104>
- Lonsdale, A., Davis, M. J., Doblin, M. S., & Bacic, A. (2016). Better than nothing? Limitations of the prediction tool secretomeP in the search for leaderless secretory proteins (LSPs) in plants. *Frontiers in Plant Science*, *7*(September2016), 1451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01451>
- Lopez-Ramirez, N., Volke-Sepulveda, T., Gaime-Perraud, I., Saucedo-Castañeda, G., & Favela-Torres, E. (2018). Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. *Bioresource Technology*, *265*, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.015>
- 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. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-23>
- M., S., Singh, S., Tiwari, R., Goel, R., & Nain, L. (2016). Do cultural conditions induce differential protein expression: Profiling of extracellular proteome of *Aspergillus terreus* CM20. *Microbiological Research*, *192*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.006>
- Machado de Castro, A., Fragoso dos Santos, A., Kachrimanidou, V., Koutinas, A. A., & Freire, D. M. G. (2018). Solid-State Fermentation for the Production of Proteases and Amylases and Their Application in Nutrient Medium Production. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 185–210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00010-4>
- Machida, M., Yamada, O., & Gomi, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. In *DNA Research* (Vol. 15, Issue 4, pp. 173–183). <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn020>
- Maeda, H., Sano, M., Maruyama, Y., Tanno, T., Akao, T., Totsuka, Y., Endo, M., Sakurada, R., Yamagata, Y., Machida, M., Akita, O., Hasegawa, F., Abe, K., Gomi, K., Nakajima, T., & Iguchi, Y. (2004). Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(1), 74–83. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1608-4>
- Mäkelä, M. R., Aguilar-Pontes, M. V., Van Rossen-Uffink, D., Peng, M., & De Vries, R. P. (2018). The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25152-x>
- Maldonado, M. C., & Strasser de Saad, A. M. (1998). Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *20*(1), 34–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523455>
- Mani, M., Chen, C., Amblee, V., Liu, H., Mathur, T., Zwicke, G., Zabad, S., Patel, B., Thakkar, J., & Jeffery, C. J. (2015). MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D277–D282. <https://doi.org/10.1093/nar/gku954>
- Martínez-Valdez, F. J., Martínez-Ramírez, C., Martínez-Montiel, L., Favela-Torres, E., Soto-Cruz, N. O., Ramírez-Vives, F., & Saucedo-Castañeda, G. (2015). Rapid mineralisation of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *Bioresource Technology*, *180*, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.083>

- Medina, M. L., Haynes, P. A., Breci, L., & Francisco, W. A. (2005). Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *PROTEOMICS*, 5(12), 3153–3161. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401136>
- Meijer, M., Houbraken, J. A. M. P., Dalhuijsen, S., Samson, R. A., & de Vries, R. P. (2011). Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black *Aspergilli*. *Studies in Mycology*, 69(1), 19–30. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.02>
- Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mejía, A., & Barrios-González, J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged- and solid-state fermentations. *Fungal Biology*, 117(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2012.12.001>
- Miura, N., & Ueda, M. (2018). Evaluation of Unconventional Protein Secretion by *Saccharomyces cerevisiae* and other Fungi. *Cells*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/cells7090128>
- Mojsov, K. D. (2016). *Aspergillus* Enzymes for Food Industries. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 215–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00033-6>
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., & Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(5–6), 405–419. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00223>
- Müller, C., McIntyre, M., Hansen, K., & Nielsen, J. (2002). Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1827–1836. <https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1827-1836.2002>
- Nalli, S., Horn, O. J., Grochowalski, A. R., Cooper, D. G., & Nicell, J. A. (2006). Origin of 2-ethylhexanol as a VOC. *Environmental Pollution*, 140(1), 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.018>
- Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2002). Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis*, 23(14), 2216–2222. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200207\)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200207)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y)
- Nandakumar, M. P., Thakur, M. S., Raghavarao, K. S. M. S., & Ghildyal, N. P. (1999). Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 380–384. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00652.x>
- Nielsen, H. (2017). Predicting secretory proteins with signalP. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1611, pp. 59–73). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5_6
- Nimrichter, L., de Souza, M. M., Del Poeta, M., Nosanchuk, J. D., Joffe, L., Tavares, P. de M., & Rodrigues, M. L. (2016). Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01034>
- Noé Aguilar, C., Augur, C., Favela-Torres, E., & Viniestra-González, G. (2001). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry*, 36(6), 565–570. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00251-X)
- Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., & Ichishima, E. (2004). Cloning of a novel tyrosinase-encoding gene (melB) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (Rice Koji). In *Journal of Bioscience and Bioengineering* (Vol. 97, Issue 6, pp. 400–405). Society of Fermentation and Bioengineering. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70226-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70226-1)

- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3448-3457.2006>
- Oostra, J., Le Comte, E. P., Van Den Heuvel, J. C., Tramper, J., & Rinzema, A. (2001). Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(1), 13–24. <https://doi.org/10.1002/bit.1159>
- Pakula, T. M., Salonen, K., Uusitalo, J., & Penttilä, M. (2005). The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*, 151(1), 135–143. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27458-0>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25(3), 244–263. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>
- Park, J., Hulsman, M., Arentshorst, M., Breeman, M., Alazi, E., Lagendijk, E. L., Rocha, M. C., Malavazi, I., Nitsche, B. M., van den Hondel, C. A. M. J. J., Meyer, V., & Ram, A. F. J. (2016). Transcriptomic and molecular genetic analysis of the cell wall salvage response of *Aspergillus niger* to the absence of galactofuranose synthesis. *Cellular Microbiology*, 18(9), 1268–1284. <https://doi.org/10.1111/cmi.12624>
- Pel, H. J., De Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., De Vries, R. P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J. D., Benen, J. A. E., Van Den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M. X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P. M., ... Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221–231. <https://doi.org/10.1038/nbt1282>
- Pible, O., Hartmann, E. M., Imbert, G., & Armengaud, J. (2014). The importance of recognizing and reporting sequence database contamination for proteomics. *EuPA Open Proteomics*, 3, 246–249. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.04.001>
- Rabilloud, T. (2009). Solubilization of proteins in 2DE: an outline. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 519, 19–30. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-281-6_2
- Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, 27(3), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>
- Rahardjo, Y. S. P., Sie, S., Weber, F. J., Tramper, J., & Rinzema, A. (2005). Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomolecular Engineering*, 21(6), 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.01.001>
- Ramesh, M. V., & Lonsane, B. K. (1991). Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 591–593. <https://doi.org/10.1007/BF00169621>
- Ramsubramaniam, N., Harris, S. D., & Marten, M. R. (2014). The phosphoproteome of *Aspergillus nidulans* reveals functional association with cellular processes involved in morphology and secretion. *Proteomics*, 14(21–22), 2454–2459. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400063>
- Read, N. D. (2011). Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. *Molecular Microbiology*, 81(1), 4–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07702.x>

- Renovato, J., Gutiérrez-Sánchez, G., Rodríguez-Durán, L. V., Bergman, C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2011). Differential properties of *Aspergillus niger* tannase produced under solid-state and submerged fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(1), 382–395. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9258-3>
- Ries, L. N. A., Beattie, S. R., Espeso, E. A., Cramer, R. A., & Goldman, G. H. (2016). Diverse Regulation of the CreA Carbon Catabolite Repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 203(1), 335–352. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187872>
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., & Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1312–1326. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0299>
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R. R., Mourriño-Pérez, R., Plamann, M., Rasmussen, C., Richthammer, C., Roberson, R. W., Sanchez-Leon, E., Seiler, S., & Watters, M. K. (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha - a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 115(6), 446–474. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.008>
- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2008). Vesicular trans-cell wall Transport in fungi: A mechanism for the delivery of virulence-associated macromolecules? In *Lipid Insights: Vol. 2 1* (pp. 27–40). NIH Public Access. <https://doi.org/10.4137/lpi.s1000>
- Rodrigues, M. L., Nosanchuk, J. D., Schrank, A., Vainstein, M. H., Casadevall, A., & Nimrichter, L. (2011). Vesicular transport systems in fungi. In *Future Microbiology* (Vol. 6, Issue 11, pp. 1371–1381). <https://doi.org/10.2217/fmb.11.112>
- Romano, J., Nimrod, G., Ben-Tal, N., Shadkhan, Y., Baruch, K., Sharon, H., & Osherov, N. (2006). Disruption of the *Aspergillus fumigatus* ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. *Microbiology*, 152(7), 1919–1928. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28936-0>
- Romero-Gómez, S. J., Augur, C., & Viniestra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 22(15), 1255–1258. <https://doi.org/10.1023/A:1005659217932>
- Romero Gómez, S. de J. (2001). *Producción de Invertasa por Aspergillus niger en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Salgado Bautista, D. A. (2015). *Análisis comparativo del secretoma de Aspergillus brasiliensis obtenido con diferentes concentraciones de glucosa en medio sólido*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78(1), 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sánchez-León, E., Bowman, B., Seidel, C., Fischer, R., Novick, P., & Riquelme, M. (2015). The Rab GTPase YPT-1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkörper microvesicles in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 95(3), 472–490. <https://doi.org/10.1111/mmi.12878>
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689–2694. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>

- Saqib, A. A. N., Hassan, M., Khan, N. F., & Baig, S. (2010). Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry*, *45*(5), 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.12.011>
- Schachtschabel, D., Arentshorst, M., Lagendijk, E. L., & Ram, A. F. J. (2012). Vacuolar H⁺-ATPase plays a key role in cell wall biosynthesis of *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, *49*(4), 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.12.008>
- Serrano-Fujarte, I., López-Romero, E., & Cuéllar-Cruz, M. (2016). Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microbial Pathogenesis*, *90*, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.001>
- Shah, P., Gutierrez-Sanchez, G., Orlando, R., & Bergmann, C. (2009). A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *PROTEOMICS*, *9*(11), 3126–3135. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800933>
- Shen, H. D., Lin, W. L., Tam, M. F., Chou, H., Wang, C. W., Tsai, J. J., Wang, S. R., & Han, S. H. (2001). Identification of vacuolar serine proteinase as a major allergen of *Aspergillus fumigatus* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. *Clinical and Experimental Allergy*, *31*(2), 295–302. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.01026.x>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli[sbrev], J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, *1*(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Shoji, J., Kikuma, T., & Kitamoto, K. (2014). Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, *20*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.03.002>
- Shteynberg, D., Nesvizhskii, A. I., Moritz, R. L., & Deutsch, E. W. (2013). Combining results of multiple search engines in proteomics. In *Molecular and Cellular Proteomics* (Vol. 12, Issue 9, pp. 2383–2393). American Society for Biochemistry and Molecular Biology. <https://doi.org/10.1074/mcp.R113.027797>
- Shukla, S., Kim, D. H., Chung, S. H., & Kim, M. (2017). Occurrence of Aflatoxins in Fermented Food Products. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 653–674). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00028-5>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *44*(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2008.10.019>
- Sluchanko, N. N., & Gusev, N. B. (2017). Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins. *The FEBS Journal*, *284*(9), 1279–1295. <https://doi.org/10.1111/febs.13986>
- Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniestra-González, G., & Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *39*(1), 36–41. <https://doi.org/10.1007/BF00166845>
- Solis-Pereyra, S., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P., & Viniestra-Gonzalez, G. (1996). Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *12*(3), 257–260. <https://doi.org/10.1007/BF00360924>
- Sørensen, L. M., Lametsch, R., Andersen, M. R., Nielsen, P. V., & Frisvad, J. C. (2009). Proteome analysis of *Aspergillus niger*: Lactate added in starch-containing medium can increase production of the mycotoxin

- fumonisin B2 by modifying acetyl-CoA metabolism. *BMC Microbiology*, 9(1), 255. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-255>
- Steiger, M. G., Rassinger, A., Mattanovich, D., & Sauer, M. (2019). Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. *Metabolic Engineering*, 52, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.004>
- Stevens, L. M., Sijbesma, E., Botta, M., Mackintosh, C., Obsil, T., Landrieu, I., Cau, Y., Wilson, A. J., Karawajczyk, A., Eickhoff, J., Davis, J., Hann, M., O'Mahony, G., Doveston, R. G., Brunsveld, L., & Ottmann, C. (2018). Modulators of 14-3-3 Protein-Protein Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(9), 3755–3778. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00574>
- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.004>
- Svanström, Å., Boveri, S., Boström, E., & Melin, P. (2013). The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. *BMC Research Notes*, 6(1), 464. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-464>
- Tamayo-Ramos, J. A., Flipphi, M., Pardo, E., Manzanares, P., & Orejas, M. (2012). L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans* α -L-rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake. *Microbial Cell Factories*, 11, 26. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-26>
- Todd, R. B., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature Protocols*, 2(4), 811–821. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>
- Tsang, A., Butler, G., Powlowski, J., Panisko, E. A., & Baker, S. E. (2009). Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 46 Suppl 1(1), S153–S160. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.014>
- Tsiatsiani, L., & Heck, A. J. R. (2015). Proteomics beyond trypsin. In *FEBS Journal* (Vol. 282, Issue 14, pp. 2612–2626). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.13287>
- Umekawa, M., Ujihara, M., Nakai, D., Takematsu, H., & Wakayama, M. (2017). Ecm33 is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast. In *FEBS Letters* (Vol. 591, Issue 22, pp. 3721–3729). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12882>
- Vallejo, M. C., Nakayasu, E. S., Matsuo, A. L., Sobreira, T. J. P., Longo, L. V. G., Ganiko, L., Almeida, I. C., & Puccia, R. (2012). Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparative analysis with other pathogenic fungi. *Journal of Proteome Research*, 11(3), 1676–1685. <https://doi.org/10.1021/pr200872s>
- Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., & Samson, R. A. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1925–1932. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65021-0>
- Vasara, T., Keränen, S., Penttilä, M., & Saloheimo, M. (2002). Characterisation of two 14-3-3 genes from *Trichoderma reesei*: interactions with yeast secretory pathway components. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1590(1–3), 27–40. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(02\)00197-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00197-0)
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet—relationship between

- morphology and productivity. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 7, pp. 2997–3006). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>
- Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2007). Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(3), 231–237. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02183.x>
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2–3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)
- Vivek-Ananth, R. P., Mohanraj, K., Vandanasree, M., Jhingran, A., Craig, J. P., & Samal, A. (2018). Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Scientific Reports*, *8*(1), 6617. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25016-4>
- Volke-Sepúlveda, T. ., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, *87*(1), 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00207-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00207-9)
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2006). Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*, *97*(14), 1583–1591. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.07.026>
- 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). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00663>
- Wang, M., Yang, H., Zhang, M., Liu, K., Wang, H., Luo, Y., & Fang, X. (2015). Functional analysis of *Trichoderma reesei* CKII α 2, a catalytic subunit of casein kinase II. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(14), 5929–5938. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6544-y>
- Wang, P., Chang, P. K., Kong, Q., Shan, S., & Wei, Q. (2019). Comparison of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* at different temperatures and media: Proteome analysis based on TMT. *International Journal of Food Microbiology*, *310*, 108313. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108313>
- Westermann, C., Gleinser, M., Corr, S. C., & Riedel, C. U. (2016). A Critical Evaluation of *Bifidobacterial* Adhesion to the Host Tissue. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01220>
- Wucherpennig, T., Hestler, T., & Krull, R. (2011). Morphology engineering - Osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-58>
- Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q., & Cheng, G. (2005). Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*, *35*(3 SPEC.ISS.), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.08.013>
- Yu, L. R., Stewart, N. A., & Veenstra, T. D. (2010). Proteomics. The Deciphering of the Functional Genome. In *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* (pp. 89–96). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374934-5.00008-8>
- Yuan, Z. F., Lin, S., Molden, R. C., & Garcia, B. A. (2014). Evaluation of proteomic search engines for the analysis of histone modifications. *Journal of Proteome Research*, *13*(10), 4470–4478. <https://doi.org/10.1021/pr5008015>
- Zamith-Miranda, D., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., & Nosanchuk, J. D. (2018). Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host. *Microbes and Infection*, *20*(9–

10), 501–504. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.011>

- Zeiner, C. A., Purvine, S. O., Zink, E. M., Paša-Tolić, L., Chaput, D. L., Haridas, S., Wu, S., LaButti, K., Grigoriev, I. V., Henrissat, B., Santelli, C. M., & Hansel, C. M. (2016). Comparative Analysis of Secretome Profiles of Manganese(II)-Oxidizing Ascomycete Fungi. *PLOS ONE*, *11*(7), e0157844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157844>
- Zeni, J., Cence, K., Grando, C. E., Tiggermann, L., Colet, R., Lerin, L. A., Cansian, R. L., Toniazzo, G., de Oliveira, D., & Valduga, E. (2011). Screening of Pectinase-Producing Microorganisms with Polygalacturonase Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *163*(3), 383–392. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9046-5>
- Zhang, B., Guan, Z. B., Cao, Y., Xie, G. F., & Lu, J. (2012). Secretome of *Aspergillus oryzae* in Shaoxing rice wine koji. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(3), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.014>
- Zhang, F., Zhong, H., Han, X., Guo, Z., Yang, W., Liu, Y., Yang, K., Zhuang, Z., & Wang, S. (2015). Proteomic profile of *Aspergillus flavus* in response to water activity. *Fungal Biology*, *119*(2–3), 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.005>
- Zhang, J., & Zhang, J. (2016). The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 36, Issue 6, pp. 1066–1077). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084262>
- Zhao, G., Ding, L.-L., Pan, Z.-H., Kong, D.-H., Hadiatullah, H., & Fan, Z.-C. (2019). Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, *271*, 606–613. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.07.199>
- Zhao, W., Lu, Y., Ouyang, H., Zhou, H., Yan, J., Du, T., & Jin, C. (2013). N-Glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall -glucan synthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology*, *23*(8), 955–968. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt032>

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1

En esta sección se muestra información adicional para las proteínas identificadas en ambos secretomas, conservando la información como fue identificada en las bases de datos.

Tabla A1. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas únicas identificadas en cultivo líquido.

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	20	20	40	40	60	60
					g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
					PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM
20	OJJ75131.1	OJJ75131.1	HP ASPBRDRAFT_53082		4	7	0	0	0	0
20	OJJ73670.1	XP_001392640.1	endoglucanase-4	Carbohydrate metabolism	4	4	0	0	0	0
20	OJJ77019.1	XP_001400902.1	endoglucanase A	Starch and sucrose metabolism	9	7	0	0	0	0
20	OJJ76633.1	XP_001399223.1	endo-1,3(4)-beta-glucanase	Endohydrolysis of (1->3)- or (1->4)-linkages in beta-D-glucans when the glucose residue whose reducing group is involved in the linkage to be hydrolyzed is itself substituted at C-3	4	7	0	0	0	0
60	OJJ72339.1	XP_001391302.1	malate dehydrogenase	Citrate cycle (TCA cycle); Cysteine and methionine metabolism; Pyruvate metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; Methane metabolism	0	0	0	0	3	11
60	OJJ74607.1	XP_001389342.1	tyrosinase	Tyrosine metabolism; Isoquinoline alkaloid biosynthesis; Betalain biosynthesis	0	0	0	0	24	10
60	OJJ77535.1	XP_001394119.2	aldehyde reductase 1	Pentose and glucuronate interconversions; Fructose and mannose metabolism; Galactose metabolism; Glycerolipid metabolism; Folate biosynthesis	0	0	0	0	7	17
60	OJJ67898.1	XP_001402471.1	purine nucleoside permease	transmembrane transport	0	0	0	0	8	9
60	OJJ75269.1	XP_001388595.1	catalase R	Tryptophan metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0	0	0	0	10	11
60	OJJ66423.1	OJJ66423.1	HP ASPBRDRAFT_49057		0	0	0	0	3	19
60	OJJ66103.1	XP_001389956.2	glucan endo-1,6- β -glucosidase BGN16.3	Random hydrolysis of (1->6)-linkages in (1->6)-beta-D-glucans	0	0	0	0	5	7
60	OJJ78081.1	OJJ78081.1	HP ASPBRDRAFT_167552		0	0	0	0	30	8
60	OJJ69630.1	XP_001393626.1	alpha-amylase	Starch and sucrose metabolism	0	0	0	0	8	7
60	OJJ66434.1	OJJ66434.1	HP ASPBRDRAFT_666063		0	0	0	0	6	15
60	OJJ74134.1	XP_001389884.1	L-asparaginase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism; Cyanoamino acid metabolism	0	0	0	0	5	15
60	OJJ74808.1	XP_001389120.1	reductase-like protein	Oxydoreductase activity	0	0	0	0	13	19
60	OJJ75721.1	XP_001400266.1	extracellular serine-rich protein	carbohydrate metabolic process	0	0	0	0	11	13

^{a1} Número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. brasiliensis* CBS 101740; ^{a2} número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. niger*, principalmente la cepa CBS 513.88; ^b Nombre de la proteína encontrado en las bases de datos; ^c función encontrada en la base de datos KEGG; PSM=*peptide spectral match*, número de péptidos alineados con las secuencias de proteína de las bases de datos, HP= *Hypothetical protein*

Tabla A2. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas únicas identificadas en cultivo sólido.

Glucosa g/L	No. Acceso ^{a1}	No. Acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60	60	120	120	180	180
					g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM
60	OJJ67062.1	OJJ67062.1	HP ASPBRDRAFT_347736		84	92	0	0	0	0
60	OJJ66216.1	OJJ66216.1	HP ASPBRDRAFT_138427		5	3	0	0	0	0
60	OJJ69961.1	XP_001395879.1	inulinase	Fructose and mannose metabolism	4	6	0	0	0	0
60	OJJ70755.1	XP_001399078.1	enolase	Glycolysis / Gluconeogenesis; Methane metabolism	7	9	0	0	0	0
120	OJJ66777.1	OJJ66777.1	HP ASPBRDRAFT_137377		0	0	15	11	0	0
120	OJJ73362.1	XP_001392987.1	carboxypeptidase Y	Release of a C-terminal amino acid with broad specificity	0	0	4	4	0	0
120	OJJ72073.1	XP_001397549.1	aldo/keto reductase	Vitamin B6 metabolism	0	0	4	8	0	0
120	OJJ71369.1	XP_001401510.1	aspartic-type endopeptidase ctsD	Preferential cleavage: hydrophobic, preferably aromatic, residues in P1 and P1' positions. Cleaves Phe1!Val, Gln4!His, Glu13!Ala, Ala14!Leu, Leu15!Tyr, Tyr16!Leu, Gly23!Phe, Phe24!Phe and Phe25!Tyr bonds in the B chain of insuli	0	0	5	4	0	0
120	OJJ70333.1	OJJ70333.1	mono- and diacylglycerol lipase	Glycerolipid metabolism	0	0	8	12	0	0
120	OJJ77603.1	XP_001394208.2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1	PPP and glutathione metabolism	0	0	4	27	0	0
120	OJJ72134.1	XP_001397476.1	zinc-binding oxidoreductase CipB		0	0	4	7	0	0
120	OJJ67114.1	XP_001402325.1	pectinesterase A	Pentose and glucuronate interconversions	0	0	4	4	0	0
180	OJJ65940.1	OJJ65940.1	HP ASPBRDRAFT_35578		0	0	0	0	4	5
180	OJJ66342.1	XP_001393442.1	lysophospholipase 1	Glycerophospholipid metabolism	0	0	0	0	13	16
180	OJJ66392.1	XP_001393389.1	HP ANI_1_54084		0	0	0	0	8	15
180	OJJ66415.1	XP_001393366.1	2-haloalkanoic acid dehalogenase	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation; Chloroalkane and chloroalkene degradation	0	0	0	0	5	5
180	OJJ66423.1	OJJ66423.1	HP ASPBRDRAFT_49057		0	0	0	0	14	10
180	OJJ68162.1	OJJ68162.1	HP ASPBRDRAFT_33455		0	0	0	0	12	5
180	OJJ70406.1	XP_001396334.2	aryl-alcohol dehydrogenase	Tyrosine metabolism; Phenylalanine metabolism; Xylene degradation; Toluene degradation	0	0	0	0	138	79
180	OJJ70449.1	XP_001390140.2	mannitol 2-dehydrogenase	Fructose and mannose metabolism	0	0	0	0	12	4
180	OJJ74036.1	XP_001392218.1	aminotransferase, class V		0	0	0	0	16	8
180	OJJ74104.1	XP_001392148.1	guanylate kinase	Purine metabolism	0	0	0	0	8	8
180	OJJ74700.1	OJJ74700.1	HP ASPBRDRAFT_459120		0	0	0	0	7	7
180	OJJ73138.1	XP_001390926.2	FAD dependent oxidoreductase	Riboflavin metabolism	0	0	0	0	14	9
180	OJJ71513.1	XP_001398224.1	heat shock protein	Translation, rRNA processing	0	0	0	0	23	43
180	OJJ75417.1	XP_001400609.1	protein disulfide-isomerase	Catalyses the rearrangement of -S-S- bonds in proteins	0	0	0	0	3	9

Glucosa g/L	No. Acceso ^{a1}	No. Acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60	60	120	120	180	180
					g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM
180	OJJ68720.1	XP_001398393.1	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino) methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	Histidine metabolism	0	0	0	0	4	3
180	OJJ75203.1	XP_001388657.1	thiamin pyrophosphokinase-related protein	Thiamine metabolism	0	0	0	0	5	10
180	OJJ76609.1	XP_001399260.2	coronin-like protein crn1	actin binding; actin filament binding	0	0	0	0	7	6
180	OJJ74849.1	OJJ74849.1	HP ASPBRDRAFT_40067		0	0	0	0	22	28
180	OJJ74959.1	XP_001388941.1	6-phosphogluconolactonase	Pentose phosphate pathway	0	0	0	0	38	23
180	OJJ75361.1	XP_001388485.2	aspartic endopeptidase (AP1	Similar to pepsin, but also cleaves on either side of Asp and at Lys!Arg	0	0	0	0	4	6
180	OJJ74669.1	XP_001389279.1	thioredoxin reductase	Selenocompound metabolism	0	0	0	0	16	5
180	OJJ68100.1	XP_001396351.1	aspartic-type endopeptidase opsB	Proteolysis	0	0	0	0	7	4
180	OJJ70280.1	XP_001402519.4	tyrosinase	Tyrosine metabolism; Isoquinoline alkaloid biosynthesis; Betalain biosynthesis	0	0	0	0	4	3
180	OJJ69293.1	XP_001393985.2	RNA binding protein Nrd1	RNA binding	0	0	0	0	5	6
180	OJJ76803.1	XP_001400684.1	alanine racemase family protein		0	0	0	0	11	7
180	OJJ66672.1	XP_001396184.1	uridylate kinase	Pyrimidine metabolism	0	0	0	0	4	5
180	OJJ69948.1	OJJ69948.1	HP ASPBRDRAFT_45261		0	0	0	0	10	7
180	OJJ69294.1	XP_001393983.1	citrate synthase	acetyl-CoA + H2O + oxaloacetate = citrate + CoA	0	0	0	0	5	4
180	OJJ74684.1	OJJ74684.1	HP ASPBRDRAFT_39873		0	0	0	0	6	15
180	OJJ73826.1	OJJ73826.1	HP ASPBRDRAFT_120976		0	0	0	0	4	5
180	OJJ67865.1	XP_001402447.1	inositol-3-phosphate synthase	Streptomycin biosynthesis; Inositol phosphate metabolism	0	0	0	0	7	7
180	OJJ71961.1	XP_001397686.1	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	Growth, signalization and oxidative stress (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	0	0	0	0	11	8
180	OJJ68803.1	XP_001397074.1	L-xylulose reductase	Pentose and glucuronate interconversions	0	0	0	0	6	6
180	OJJ71817.1	XP_001397850.1	glucose-6-phosphate isomerase	Glycolysis / Gluconeogenesis; Pentose phosphate pathway; Starch and sucrose metabolism; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0	0	0	0	12	15
180	OJJ73664.1	XP_001392647.1	heat shock protein Hsp88	Stress response; ATP binding (<i>Aspergillus terreus</i>)	0	0	0	0	2	4
180	OJJ71848.1	XP_001397810.1	protein vip1	actin related	0	0	0	0	6	5
180	OJJ76318.1	XP_001399596.1	dienelactone hydrolase family protein		0	0	0	0	16	12
180	OJJ68736.1	GAQ45375.1	UV excision repair protein	Repair nucleotide	0	0	0	0	6	6
180	OJJ78194.1	OJJ78194.1	HP ASPBRDRAFT_203008		0	0	0	0	4	4
180	OJJ75468.1	OJJ75468.1	HP ASPBRDRAFT_51220		0	0	0	0	8	8
180	OJJ72085.1	XP_001397530.1	epoxide hydrolase	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0	0	0	0	11	8
180	OJJ76621.1	XP_001399237.1	X-Pro dipeptidyl-peptidase (S15 family) protein	Proteolysis	0	0	0	0	5	5
180	OJJ66283.1	XP_001391100.1	HP ANI_1_8064		0	0	0	0	25	21

Glucosa g/L	No. Acceso ^{a1}	No. Acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60	60	120	120	180	180
					g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM
180	OJJ76083.1	XP_001399877.1	homoserine dehydrogenase	Glycine, serine and threonine metabolism; Cysteine and methionine metabolism; Lysine biosynthesis	0	0	0	0	18	17
180	OJJ66735.1	XP_001396247.1	ATP phosphoribosyltransferase	Histidine metabolism	0	0	0	0	17	33
180	OJJ66987.1	XP_001397271.1	ribokinase	Pentose phosphate pathway	0	0	0	0	10	9
180	OJJ75281.1	XP_001388583.1	FAD binding domain protein		0	0	0	0	9	10
180	OJJ72457.1	XP_001391440.1	L-xylulose reductase	Pentose and glucuronate interconversions	0	0	0	0	16	11
180	OJJ77967.1	EHA19736.1	6-phosphogluconate dehydrogenase	Cysteine and methionine metabolism	0	0	0	0	17	8
180	OJJ70000.1	OJJ70000.1	HP ASPBRDRAFT_56749		0	0	0	0	4	5
180	OJJ77211.1	XP_001401121.1	cell cycle control protein (Cwf8)	ubiquitin-protein transferase	0	0	0	0	8	8
180	OJJ69753.1	OJJ69753.1	HP ASPBRDRAFT_131175		0	0	0	0	12	5
180	OJJ71066.1	OJJ71066.1	HP ASPBRDRAFT_126631		0	0	0	0	7	6
180	OJJ70578.1	OJJ70578.1	HP ASPBRDRAFT_128823		0	0	0	0	5	6
180	OJJ69216.1	XP_001396580.2	formate dehydrogenase	formate + NAD+ = CO2 + NADH	0	0	0	0	18	8
180	OJJ70774.1	OJJ70774.1	HP ASPBRDRAFT_56532/ Phosphomannomutase	Fructose and mannose metabolism; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0	0	0	0	13	9
180	OJJ77452.1	XP_001394024.1	beta-glucosidase M	Cyanoamino acid metabolism; Starch and sucrose metabolism; Phenylpropanoid biosynthesis	0	0	0	0	6	5
180	OJJ69707.1	XP_001393532.1	lipase	Glycerolipid metabolism	0	0	0	0	5	4
180	OJJ73970.1	XP_001392293.1	glycerol dehydrogenase Gcy1		0	0	0	0	3	3
180	OJJ76051.1	OJJ76051.1	HP ASPBRDRAFT_38420 /Transcription regulator PAB1642	DNA replication	0	0	0	0	10	6
180	OJJ65888.1	XP_001391209.1	alcohol dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis; Fatty acid degradation Glycine, serine and threonine metabolism; Tyrosine metabolism alpha-Linolenic acid metabolism Chloroalkane and chloroalkene degradation; Naphthalene degradation; Retinol metabolism; Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0	0	0	0	5	6
180	OJJ68161.1	OJJ68161.1	HP ASPBRDRAFT_199302		0	0	0	0	6	6
180	OJJ72642.1	XP_001391662.1	formamidase	Cyanoamino acid metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0	0	0	0	6	7
180	OJJ75060.1	XP_001388823.2	proliferating cell nuclear antigen	DNA replication	0	0	0	0	3	6
180	OJJ68548.1	XP_001390302.2	exocyst complex component Sec8	Transport (Aspergillus nidulans)	0	0	0	0	30	12
180	OJJ75701.1	OJJ75701.1	HP ASPBRDRAFT_38007		0	0	0	0	16	22
180	OJJ67164.1	XP_001402270.2	defective in cullin neddylation protein 1	Neddylation of cullins play an essential role in the regulation of SCF-type complexes activity	0	0	0	0	5	9
180	OJJ67066.1	XP_001398731.2	glutathione S-transferase Ure2-like protein	Glutathione metabolism; Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0	0	0	0	8	17
180	OJJ71183.1	XP_001401701.1	pantetheine-phosphate adenylyltransferase family protein	Pantothenate and CoA biosynthesis	0	0	0	0	6	7
180	OJJ73228.1	XP_001393178.1	dienactone hydrolase family protein		0	0	0	0	13	14
180	OJJ73437.1	XP_001392906.1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Valine, leucine and isoleucine degradation	0	0	0	0	4	4
180	OJJ70171.1	XP_001395336.1	feruloyl esterase C	feruloyl-polysaccharide + H2O = ferulate + polysaccharide	0	0	0	0	11	22

Glucosa g/L	No. Acceso ^{a1}	No. Acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60	60	120	120	180	180
					g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM
180	OJJ69364.1	XP_001393901.1	uracil-DNA glycosylase	Hydrolyses single-stranded DNA or mismatched double-stranded DNA and polynucleotides, releasing free uracil	0	0	0	0	3	12
180	OJJ65896.1	XP_001391200.1	glutathione S-transferase	Glutathione metabolism; Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0	0	0	0	6	10
180	OJJ74366.1	XP_001389622.1	beta-galactosidase E	Galactose metabolism; Other glycan degradation; Glycosaminoglycan degradation; Sphingolipid metabolism; Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	0	0	0	0	6	8

^{a1} Número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. brasiliensis* CBS 101740; ^{a2} número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. niger*, principalmente la cepa CBS 513.88; ^b Nombre de la proteína encontrado en las bases de datos; ^c función encontrada en la base de datos KEGG; PSM=*peptide spectral match*, número de péptidos alineados con las secuencias de proteína de las bases de datos, HP= *Hypothetical protein*

Tabla A3. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas abundantes no reguladas identificadas en cultivo sólido.

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60	60	120	120	180	180
					g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM
60 y 120	OJJ77564.1	XP_001394158.2	cell wall glucanase		4	6	5	5	0	0
60 y 120	OJJ67069.1	XP_001398728.2	multicopper oxidase		11	6	7	8	0	0
60, 120 y 180	OJJ73275.1	OJJ73275.1	HP ASPBRDRAFT_40942/ nitrilase	Tryptophan and Cyanoamino acid metabolism; Aminobenzoate and Styrene degradation; Nitrogen metabolism	18	3	293	20	43	31
60 y 180	OJJ65853.1	XP_001391138.1	glucose oxidase	4 benzenediol + O ₂ = 4 benzo-semiquinone + 2 H ₂ O	4	9	0	0	4	5
60, 120 y 180	OJJ74153.1	GAQ46904.1	YkgB		451	672	195	207	266	180
60, 120 y 180	OJJ70100.1	OJJ70100.1	HP ASPBRDRAFT_45424 /Isopullulanase	Hydrolysis of pullulan to isopanose (6-alpha-maltosylglucose)	78	93	39	32	30	24
60 y 120	OJJ74240.1	XP_001389767.1	laccase-1	4 benzenediol + O ₂ = 4 benzo-semiquinone + 2 H ₂ O	9	5	4	3	0	0
60, 120 y 180	OJJ67831.1	OJJ67831.1	HP ASPBRDRAFT_134466 (FAD_binding_4)	Hidrolisis of chitin	34	40	14	18	10	11
60, 120 y 180	OJJ70876.1	XP_001402053.1	alpha-glucosidase	Galactose, starch and sucrose metabolism	87	106	28	49	36	52

^{a1} Número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. brasiliensis* CBS 101740; ^{a2} número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. niger*, principalmente la cepa CBS 513.88; ^b Nombre de la proteína encontrado en las bases de datos; ^c función encontrada en la base de datos KEGG; PSM=*peptide spectral match*, número de péptidos alineados con las secuencias de proteína de las bases de datos, HP= *Hypothetical protein*

Tabla A4. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas abundantes no reguladas identificadas en cultivo líquido.

Glucosa g/L	No acceso*	No acceso*	Proteína	Ruta metabólica o función***	20 g/L PSM	20 g/L PSM	40 g/L PSM	40 g/L PSM	60 g/L PSM	60 g/L PSM
20, 40 y 60	OJJ76295.1	XP_001399628.1	endopolygalacturonase C	Pentose and glucuronate interconversions	25	31	25	42	29	28
20, 40 y 60	OJJ73065.1	XP_001390847.1	tripeptidyl-peptidase sed2		13	15	15	10	15	14
20, 40 y 60	OJJ68547.1	GAQ44118.1	extracellular cellulase CelA/allergen Asp F7-like		3	7	4	3	5	4
20 y 60	OJJ74465.1	OJJ74465.1	HP ASPBRDRAFT_27493		14	22	0	0	5	19
20 y 40	OJJ75322.1	XP_001388522.1	endo-1,4-beta-xylanase A	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans	28	5	87	22	0	0
20, 40 y 60	OJJ77564.1	XP_001394158.2	cell wall glucanase		12	10	7	9	17	11
20, 40 y 60	OJJ75244.1	XP_001388621.1	catalase R	Tryptophan metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	31	16	26	42	40
20, 40 y 60	OJJ73817.1	XP_001392475.1	glucan 1,3-beta-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	4	7	4	3	4	8
20, 40 y 60	OJJ67200.1	OJJ67200.1	HP ASPBRDRAFT_59193		15	21	5	7	14	12
20, 40 y 60	OJJ67987.1	XP_001390410.1	glucan endo-1,3-beta-glucosidase egIC	Starch and sucrose metabolism	93	218	50	45	69	130
20 y 60	OJJ67114.1	XP_001402325.1	pectinesterase A	Pentose and glucuronate interconversions	9	6	0	0	5	4
20, 40 y 60	OJJ73062.1	OJJ73062.1	HP ASPBRDRAFT_53305		17	11	27	40	23	39
20, 40 y 60	OJJ74152.1	AGI04246.1	glucose oxidase	Pentose phosphate pathway	40	40	17	27	67	78
20, 40 y 60	OJJ68397.1	XP_001389998.1	alpha-L-arabinofuranosidase axhA	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	41	35	35	43	42	51
20, 40 y 60	OJJ67069.1	XP_001398728.2	multicopper oxidase		6	7	4	6	7	10
20, 40 y 60	OJJ68396.1	XP_001389996.2	endo-1,4-beta-xylanase F1	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans	61	43	48	40	58	93
20, 40 y 60	OJJ72358.1	OJJ72358.1	HP ASPBRDRAFT_42048 /D-6-hydroxynicotine oxidase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	8	8	6	5	15	12
20, 40 y 60	OJJ77774.1	XP_001394372.1	FAD binding domain protein		32	28	5	6	9	15
20, 40 y 60	OJJ70519.1	XP_001398816.1	beta-glucosidase A	Cyanoamino acid metabolism; Starch and sucrose metabolism; Phenylpropanoid biosynthesis	17	13	7	8	8	13
20, 40 y 60	OJJ65991.1	XP_001390530.1	glucoamylase	Starch and sucrose metabolism	2909	1593	520	645	1028	959
20, 40 y 60	OJJ71721.1	XP_001397982.2	endoglucanase A	carbohydrate metabolic process	29	24	5	10	12	11
40 y 60	OJJ71409.1	OJJ71409.1	HP ASPBRDRAFT_127351, partial		0	0	23	43	37	36

^{a1} Número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. brasiliensis* CBS 101740; ^{a2} número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. niger*, principalmente la cepa CBS 513.88; ^b Nombre de la proteína encontrado en las bases de datos; ^c función encontrada en la base de datos KEGG; PSM=*peptide spectral match*, número de péptidos alineados con las secuencias de proteína de las bases de datos, HP= *Hypothetical protein*

Tabla A5. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas reguladas identificadas en cultivo sólido.

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60 g/L PSM	60 g/L PSM	120 g/L PSM	120 g/L PSM	180 g/L PSM	180 g/L PSM
60, 120 y 180	OJJ74339.1	P_001389652.2	exo-beta-1,3-glucanase Exg0	Starch and sucrose metabolism	114	156	63	86	80	144
120 180	OJJ71129.1	XP_001401759.1	aminopeptidase 2		0	0	5	18	107	113
60, 120 y 180	OJJ68396.1	XP_001389996.2	endo-1,4-beta-xylanase F1	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans	126	105	68	59	96	128
60, 120 y 180	OJJ73817.1	XP_001392475.1	glucan 1,3-beta-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	23	29	18	14	16	53
60, 120 y 180	OJJ73563.1	XP_001392771.2	spermidine synthase	Cysteine and methionine metabolism; Arginine and proline metabolism; beta-Alanine metabolism; Glutathione metabolism	4	3	5	12	48	58
60, 120 y 180	OJJ68845.1	XP_001397010.2	glycosyl hydrolase family 71 protein/glucan endo-1,3-alpha-glucosidase	Endohydrolysis of (1->3)-alpha-D-glucosidic linkages in isolichenin, pseudonigeran and nigeran	14	15	9	5	4	5
120 180	OJJ66434.1	OJJ66434.1	HP ASPBRDRAFT_666063		0	0	10	6	82	24
120 y 180	OJJ69332.1	XP_001393937.1	vacuolar aspartyl aminopeptidase Lap4	Proteolysis	0	0	3	4	22	17
120 y 180	OJJ69282.1	XP_001393995.2	aminopeptidase	Proteolysis	0	0	6	12	64	33
120 y 180	OJJ68507.1	XP_001390247.2	glutathione reductase	Glutathione metabolism	0	0	8	5	34	33
60, 120 y 180	OJJ71535.1	XP_001398198.2	carboxypeptidase S1	Translation, rRNA processing	7	11	12	6	16	31
60, 120 y 180	OJJ72339.1	XP_001391302.1	malate dehydrogenase	Citrate cycle (TCA cycle); Cysteine and methionine metabolism; Pyruvate metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; Methane metabolism	33	39	67	67	310	195
60, 120 y 180	OJJ77535.1	XP_001394119.2	aldehyde reductase 1	Pentose and glucuronate interconversions; Fructose and mannose metabolism; Galactose metabolism; Glycerolipid metabolism; Folate biosynthesis	75	9	97	59	309	244
60, 120 y 180	OJJ77477.1	XP_001394051.1	ribose 5-phosphate isomerase A	Pentose phosphate pathway; Fructose and mannose metabolism	7	5	7	10	40	15
60, 120 y 180	OJJ77205.1	XP_001401115.1	triosephosphate isomerase	Glycolysis / Gluconeogenesis; Fructose and mannose metabolism; Inositol phosphate metabolism	24	5	60	21	89	177
60, 120 y 180	OJJ69630.1	XP_001393626.1	alpha-amylase	Starch and sucrose metabolism	43	50	30	38	37	65
60, 120 y 180	OJJ72478.1	OJJ72478.1	HP ASPBRDRAFT_54314 /Serine proteinase pepC	Proteolysis	13	31	26	64	88	163
120 180	OJJ70618.1	XP_001398917.1	Rho GDP-dissociation inhibitor	Rho GDP-dissociation inhibitor activity	0	0	3	6	9	22
60, 120 y 180	OJJ65770.1	XP_001390502.1	FAD binding domain protein		12	8	6	6	5	8

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60 g/L PSM	60 g/L PSM	120 g/L PSM	120 g/L PSM	180 g/L PSM	180 g/L PSM
60, 120 y 180	OJJ74329.1	OJJ74329.1	HP ASPBRDRAFT_27362/Probable mannosyl- oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase 1B		37	48	26	29	29	35
120 180	OJJ69032.1	XP_001396780.2	nmrA-like family protein		0	0	3	10	26	20
120 y 180	OJJ68942.1	XP_001396893.2	endo-arabinase	Endohydrolysis of (1->5)-alpha-arabinofuranosidic linkages in (1->5)-arabinans	0	0	15	5	9	53
60, 120 y 180	OJJ72358.1	OJJ72358.1	HP ASPBRDRAFT_42048 /D-6-hydroxynicotine oxidase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	17	9	23	23	66	58
120 y 180	OJJ67239.1	OJJ67239.1	HP ASPBRDRAFT_136183 /Orotate phosphoribosyltransferase	Pyrimidine metabolism	0	0	6	5	17	18
120 y 180	OJJ72415.1	XP_001391393.1	S-formylglutathione hydrolase	Methane metabolism	0	0	3	3	10	9
60, 120 y 180	OJJ71393.1	XP_001401488.1	protein ecm33		499	598	388	368	318	545
120 180	OJJ74465.1	OJJ74465.1	HP ASPBRDRAFT_27493		0	0	12	9	14	45
60, 120 y 180	OJJ75670.1	XP_001400329.2	Inorganic pyrophosphatase, partial	Oxidative phosphorylation	11	9	5	39	77	36
120 y 180	OJJ69155.1	XP_001396639.1	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxxygenase	Cysteine and methionine metabolism	0	0	3	4	13	9
120 y 180	OJJ69988.1	XP_001395835.2	glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0	0	14	11	44	34
120 180	OJJ68333.1	OJJ68333.1	HP ASPBRDRAFT_58357		0	0	7	5	4	27
120 y 180	OJJ69942.1	XP_001395912.1	glucokinase	Glycolysis / Gluconeogenesis; Galactose metabolism; Starch and sucrose metabolism; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; Streptomycin biosynthesis; Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	0	0	15	19	62	43
60, 120 y 180	OJJ75270.1	XP_001388594.1	acid trehalase	Starch and sucrose metabolism	30	15	26	39	54	78
60, 120 y 180	OJJ74889.1	XP_001389020.1	cyanovirin-N	Virucity (Volke et al.2016)	10	8	10	17	39	22
60, 120 y 180	OJJ75244.1	XP_001388621.1	catalase R	Tryptophan metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	59	51	39	53	68	67
120 y 180	OJJ67429.1	XP_001395432.1	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	Pyrimidine metabolism	0	0	5	6	14	17
60, 120 y 180	OJJ74607.1	XP_001389342.1	tyrosinase	Tyrosine metabolism; Isoquinoline alkaloid biosynthesis; Betalain biosynthesis	28	26	31	26	32	56
60, 120 y 180	OJJ75131.1	OJJ75131.1	HP ASPBRDRAFT_53082		20	47	17	26	17	19
60, 120 y 180	OJJ69946.1	XP_001395908.1	peroxiredoxin pmp20	Glutathione metabolism	59	15	92	105	266	193
60, 120 y 180	OJJ67851.1	XP_001402433.1	1,3-beta-glucanosyltransferase gel1		153	195	151	194	212	288

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60 g/L PSM	60 g/L PSM	120 g/L PSM	120 g/L PSM	180 g/L PSM	180 g/L PSM
60, 120 y 180	OJJ71337.1	XP_001401543.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-beta-homocysteine methyltransferase	Cysteine and methionine metabolism; Selenocompound metabolism	17	16	15	82	151	71
60, 120 y 180	OJJ69428.1	XP_001393823.2	cholinesterase	Glycerophospholipid metabolism	6	12	6	9	9	9
60, 120 y 180	OJJ67987.1	XP_001390410.1	glucan endo-1,3-beta-glucosidase eglC	Starch and sucrose metabolism	138	134	116	103	107	153
60, 120 y 180	OJJ71409.1	OJJ71409.1	HP ASPBRDRAFT_127351, partial		26	19	19	23	26	31
120 y 180	OJJ70469.1	XP_001398757.1	porphobilinogen deaminase/hydroxymethylbilane synthase	Porphyrin and chlorophyll metabolism	0	0	11	26	39	47
120 y 180	OJJ71358.1	XP_001401521.1	diphosphomevalonate decarboxylase	Terpenoid backbone biosynthesis	0	0	4	9	24	10
120 y 180	OJJ75814.1	XP_001400163.1	geranyltranstransferase	Terpenoid backbone biosynthesis	0	0	3	6	21	4
120 y 180	OJJ66955.1	XP_001397234.1	cyanate hydratase	Nitrogen metabolism	0	0	15	12	27	35
60, 120 y 180	OJJ71546.1	XP_001398185.1	triacylglycerol lipase	Translation, rRNA processing	4	4	9	5	11	14
120 y 180	OJJ66437.1	OJJ66437.1	HP ASPBRDRAFT_49077 /function chitinase (GO)		0	0	23	25	64	50
120 180	OJJ71176.1	XP_001401709.1	calcium homeostasis protein Regucalcin	L-ascorbic acid biosynthetic process	0	0	5	5	12	11
60, 120 y 180	OJJ76633.1	XP_001399223.1	endo-1,3(4)-beta-glucanase	Endohydrolysis of (1->3)- or (1->4)-linkages in beta-D-glucans when the glucose residue whose reducing group is involved in the linkage to be hydrolysed is itself substituted at C-3	10	13	6	11	4	11
60, 120 y 180	OJJ69362.1	XP_001393905.1	sulfhydryl oxidase	$2 R'C(R)SH + O_2 = R'C(R)S-S(R)CR' + H_2O_2$	52	66	50	44	60	47
120 180	OJJ73019.1	XP_001392074.2	heat shock protein	ATP binding	0	0	90	119	275	204
60, 120 y 180	OJJ74472.1	XP_001389510.2	alpha/beta-glucosidase agdC	Cyanoamino acid metabolism; Starch and sucrose metabolism; Phenylpropanoid biosynthesis; Galactose metabolism	4	11	27	16	16	57
60, 120 y 180	OJJ76993.1	XP_001400873.1	tripeptidyl-peptidase sed2		111	103	100	95	108	129
60, 120 y 180	OJJ66856.1	OJJ66856.1	HP ASPBRDRAFT_59296 /Ubiquitin-activating enzyme E1 1	ATP + ubiquitin + [E1 ubiquitin-activating enzyme]-L-cysteine = AMP + diphosphate + S-ubiquitinyl-[E1 ubiquitin-activating enzyme]-L-cysteine	5	9	10	19	25	24
60, 120 y 180	OJJ67200.1	OJJ67200.1	HP ASPBRDRAFT_59193		29	26	21	21	18	24
120 y 180	OJJ69906.1	XP_001395965.2	dienelactone hydrolase family protein		0	0	5	7	13	12
120 180	OJJ75723.1	XP_001400262.1	cell surface spherulin 4-like protein	Integral component of membrane	0	0	4	4	7	9
120 y 180	OJJ66125.1	XP_001389935.1	tyrosinase	Tyrosine metabolism; Isoquinoline alkaloid biosynthesis; Betalain biosynthesis	0	0	4	5	11	8
60, 120 y 180	OJJ72476.1	XP_001391467.1	transaldolase	Pentose phosphate pathway	111	11	527	188	687	717

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60 g/L PSM	60 g/L PSM	120 g/L PSM	120 g/L PSM	180 g/L PSM	180 g/L PSM
60, 120 y 180	OJJ68065.1	XP_001390497.2	1,3-beta-glucanosyltransferase gel3	Integral component of membrane	10	8	9	10	12	12
60, 120 y 180	OJJ67914.1	XP_001390337.1	aldo-keto reductase	2 phenolic donor + H2O2 = 2 phenoxyl radical of the donor + 2 H2O	6	4	6	11	11	14
120 y 180	OJJ71470.1	XP_001401404.1	dipeptidyl peptidase III	Release of an N-terminal dipeptide from a peptide comprising four or more residues, with broad specificity. Also acts on dipeptidyl 2-naphthylamides	0	0	34	36	76	64
120 y 180	OJJ71117.1	OJJ71117.1	HP ASPBRDRAFT_179180 /Peroxidase	Sulfur relay system/thioredoxin peroxidase activity	0	0	12	4	16	16
60, 120 y 180	OJJ72381.1	XP_001391356.2	SUN domain protein (Uth1)/triacylglycerol lipase	Glycerolipid metabolism	16	13	56	72	53	150
120 y 180	OJJ69042.1	XP_001396769.1	alpha-N-arabinofuranosidase B	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0	0	12	9	13	25
60, 120 y 180	OJJ67881.1	XP_001402471.1	purine nucleoside permease		95	92	102	66	53	116
60, 120 y 180	OJJ70519.1	XP_001398816.1	beta-glucosidase A	Cyanoamino acid metabolism; Starch and sucrose metabolism; Phenylpropanoid biosynthesis	49	37	72	54	83	90
120 y 180	OJJ76062.1	XP_001399898.1	phosphoglucomutase	Glycolysis / Gluconeogenesis; Pentose phosphate pathway; Galactose metabolism; Purine metabolism; Starch and sucrose metabolism; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; streptomycin biosynthesis	0	0	59	56	118	99
120 y 180	OJJ68567.1	XP_001390332.1	ADP-ribose pyrophosphatase	Purine metabolism	0	0	6	6	11	11
60, 120 y 180	OJJ66136.1	XP_001389926.1	pectin lyase F	Eliminative cleavage of (1->4)-alpha-D-galacturonan methyl ester to give oligosaccharides with 4-deoxy-6-O-methyl-alpha-D-galact-4-enuronosyl groups at their non-reducing ends	108	64	65	77	91	57
60, 120 y 180	OJJ75817.1	XP_001400160.1	protein NMT1	thiamine biosynthetic process	10	26	34	62	79	68
60, 120 y 180	OJJ72815.1	XP_001391851.1	14-3-3 protein	DNA/ protein binding Ras/MAPK signaling, exocytosis (Volke et al., 2016)	5	7	13	37	31	44
120 180	OJJ68739.1	XP_001398409.1	eukaryotic translation initiation factor 6	mature ribosome assembly; ribosomal large subunit biogenesis; ribosomal subunit export from nucleus	0	0	9	22	19	31
120 y 180	OJJ72208.1	XP_001397405.1	peroxiredoxin pmp20		0	0	7	7	14	11
60, 120 y 180	OJJ74808.1	XP_001389120.1	reductase-like protein		134	19	291	217	435	366
120 y 180	OJJ71861.1	XP_001397790.1	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	galactose metabolic process (AOA0F0IJE6)	0	0	16	4	20	16
60, 120 y 180	OJJ75322.1	XP_001388522.1	endo-1,4-beta-xylanase A	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans	159	168	325	376	447	513
120 y 180	OJJ75363.1	XP_001388482.1	alpha-N-arabinofuranosidase A	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0	0	7	6	8	13
120 y 180	OJJ68696.1	XP_001398362.1	adenosine kinase	Purine metabolism	0	0	25	17	56	22

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60 g/L PSM	60 g/L PSM	120 g/L PSM	120 g/L PSM	180 g/L PSM	180 g/L PSM
120 180	OJJ75191.1	XP_001388668.1	glial maturation factor	Debranching: negative regulation of Arp2/3 complex mediated actin nucleation	0	0	9	9	13	16
120 y 180	OJJ75576.1	XP_001400449.2	exo-beta-1,3-glucanase	Starch and sucrose metabolism	0	0	8	5	9	12
60, 120 y 180	OJJ77019.1	XP_001400902.1	endoglucanase A	Starch and sucrose metabolism	30	18	24	60	37	63
60, 120 y 180	OJJ73486.1	XP_001392850.1	1,3-beta-glucanosyltransferase gel2		12	19	19	19	10	28
60, 120 y 180	OJJ68834.1	XP_001397023.2	endo-beta-1,4-glucanase D	xyloglucan + H2O = xyloglucan oligosaccharides	40	43	33	35	29	30
60, 120 y 180	OJJ74152.1	AGI04246.1	glucose oxidase	Pentose phosphate pathway	166	75	144	139	159	158
120 y 180	OJJ71705.1	OJJ71705.1	HP ASPBRDRAFT_124942 /Cell wall glucanase		0	0	20	27	27	44
120 y 180	OJJ72059.1	XP_001397565.2	threonine synthase	Glycine, serine and threonine metabolism; Vitamin B6 metabolism	0	0	14	25	52	17
60, 120 y 180	OJJ68479.1	XP_001393538.1	N-acetylglucosaminidase	Other glycan degradation; Various types of N-glycan biosynthesis; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; Glycosaminoglycan degradation; Glycosphingolipid biosynthesis	4	6	5	7	5	7
120 180	OJJ76458.1	XP_001399436.1	acyl CoA binding protein family	fatty-acyl-CoA binding	0	0	10	10	12	17
60, 120 y 180	OJJ75269.1	XP_001388595.1	catalase R	Tryptophan metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	30	31	63	45	62	67
60, 120 y 180	OJJ72798.1	XP_001391828.2	glycosidase crf2		5	5	6	4	3	6
120 180	OJJ73804.1	XP_001392486.1	ADP-ribosylation factor	small GTPase mediated signal transduction	0	0	6	7	7	11
120 180	OJJ65941.1	OJJ65941.1	HP ASPBRDRAFT_49399		0	0	11	10	11	18
120 y 180	OJJ71229.1	XP_001401653.1	aminopeptidase C	Inactivates bleomycin B2 (a cytotoxic glycometallopeptide) by hydrolysis of a carboxamide bond of beta-aminoalanine, but also shows general aminopeptidase activity. The specificity varies somewhat with source, but amino acid arylamides of Met, Leu and Ala are preferred	0	0	21	14	35	19
120 y 180	OJJ67912.1	XP_001390334.1	HAD superfamily hydrolase		0	0	32	16	36	34
120 y 180	OJJ66428.1	GAQ45768.1	alpha-galactosidase C	Galactose metabolism; Glycerolipid metabolism; Sphingolipid metabolism; Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	0	0	7	5	8	9
120 y 180	OJJ71308.1	XP_001401570.2	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	peptidylproline (omega=180) = peptidylproline (omega=0)	0	0	4	5	10	4
120 y 180	OJJ72207.1	XP_001397406.1	thiJ/Pfpl family protein		0	0	13	11	17	17
60, 120 y 180	OJJ70569.1	XP_001398868.1	glucan 1,3-beta-glucosidase A	Starch and sucrose metabolism	28	21	28	31	23	33
120 y 180	OJJ71147.1	XP_001401742.1	aldose 1-epimerase	Glycolysis / Gluconeogenesis	0	0	19	22	31	27

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60	60	120	120	180	180
					g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM
120 180	OJJ71769.1	OJJ71769.1	HP ASPBRDRAFT_43145		0	0	10	7	10	13
120 y 180	OJJ68515.1	XP_001390256.1	laccase-1	4 benzenediol + O ₂ = 4 benzosemiquinone + 2 H ₂ O	0	0	9	6	8	12
120 y 180	OJJ68194.1	XP_001398680.2	Ras-related protein Rab7/ dGTPase	Purine metabolism	0	0	5	8	7	10
120 180	OJJ71021.1	XP_001401891.1	Aha1 domain family	cellular response to heat; protein folding	0	0	8	14	14	15
60, 120 y 180	OJJ67021.1	XP_001397301.1	alpha-amylase	Starch and sucrose metabolism	6	5	6	5	3	6
120 y 180	OJJ71246.1	XP_001401635.1	aldehyde reductase 1	Arachidonic acid metabolism; Folate biosynthesis; Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0	0	3	6	4	7
120 y 180	OJJ68449.1	XP_001390068.2	aminopeptidase Y	Preferentially, release of N-terminal lysine	0	0	6	3	6	6
120 y 180	OJJ74942.1	XP_001388959.2	minor allergen Alt a 7	FMN binding NAD(H) dehydrogenase; (quinone) activity (<i>Aspergillus lentulus</i>)	0	0	8	11	9	14
60, 120 y 180	OJJ72111.1	XP_001397501.1	lipase	Glycerolipid metabolism	92	27	151	106	42	202
120 180	OJJ69302.1	XP_001393974.1	heat shock protein 90	protein folding; response to stress	0	0	4	14	14	9
120 180	OJJ72869.1	XP_001391915.2	allergen Asp f 4		0	0	48	83	53	98
60, 120 y 180	OJJ66105.1	XP_001389952.1	FAD-dependent oxygenase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	10	10	11	7	7	7
120 180	OJJ69038.1	OJJ69038.1	HP ASPBRDRAFT_132071		0	0	11	22	16	22
120 y 180	OJJ77241.1	XP_001401157.2	cell wall glycosyl hydrolase YteR		0	0	9	8	10	10
120 y 180	OJJ67369.1	OJJ67369.1	Beta-xylanase	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans	0	0	19	12	20	16
120 180	OJJ66038.1	XP_001390822.1	laccase-1	4 benzenediol + O ₂ = 4 benzosemiquinone + 2 H ₂ O	0	0	16	11	14	16
120 180	OJJ70757.1	XP_001399080.1	14-3-3 protein		0	0	9	15	15	12
60, 120 y 180	OJJ73670.1	XP_001392640.1	endoglucanase-4		10	7	14	20	15	16
60, 120 y 180	OJJ72473.1	XP_001391459.1	superoxide dismutase [Cu-Zn]	2 superoxide + 2 H ⁺ = O ₂ + H ₂ O ₂	29	35	38	40	37	27
60, 120 y 180	OJJ77986.1	XP_001394632.2	beta-mannosidase A	Other glycan degradation	6	7	7	9	5	7
120 180	OJJ67850.1	XP_001402432.1	cellobiose dehydrogenase	cellobiose + acceptor = cellobiono-1,5-lactone + reduced acceptor	0	0	4	4	3	5
120 180	OJJ65854.1	XP_001391137.1	lipase 1 precursor	Glycerolipid metabolism	0	0	4	3	3	4
120 180	OJJ75173.1	XP_001388687.1	thioredoxin	AMP + sulfite + thioredoxin disulfide = 5'-adenylyl sulfate + thioredoxin	0	0	16	23	24	17
120 180	OJJ70172.1	XP_001395335.2	endoglucanase	Starch and sucrose metabolism; Hydrolysis of (1- >4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and similar substrates, releasing cellobiose from the reducing ends of the chains	0	0	11	4	12	5
120 180	OJJ69179.1	OJJ69179.1	HP ASPBRDRAFT_132450 /Elongation factor 1 gamma conserved domain family protein		0	0	6	12	10	8
60, 120 y 180	OJJ75520.1	XP_001400489.2	glycosyl hydrolase, family 18 /chitinase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	12	13	37	30	24	33

Glucosa g/L	No acceso ^{a1}	No acceso ^{a2}	Proteína ^b	Ruta metabólica o función ^c	60	60	120	120	180	180
					g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM	g/L PSM
120 180	OJJ69367.1	XP_001393898.1	nucleoside diphosphate kinase	Purine metabolism; Pyrimidine metabolism	0	0	6	17	11	11
120 180	OJJ69080.1	XP_001396717.2	2-methylcitrate dehydratase	Propanoate metabolism	0	0	6	18	18	7
120 180	OJJ71468.1	XP_001401406.1	branched-chain-amino-acid aminotransferase	Cysteine and methionine metabolism; Valine, leucine and isoleucine degradation; Valine, leucine and isoleucine biosynthesis; Pantothenate and CoA biosynthesis	0	0	12	11	12	10
60, 120 y 180	OJJ66611.1	XP_001395113.2	protein HMF1		13	8	11	16	13	7
120 180	OJJ72740.1	XP_001391760.1	dihydrolipoyl dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis; Citrate cycle (TCA cycle); Glycine, serine and threonine metabolism; Valine, leucine and isoleucine degradation; Pyruvate metabolism; Propanoate metabolism	0	0	5	10	5	3
60, 120 y 180	OJJ68547.1	GAQ44118.1	extracellular cellulase CelA/allergen Asp F7-like		15	13	18	19	17	10
120 180	OJJ78318.1	XP_001394989.2	endocytosis protein end4		0	0	4	11	7	6
120 180	OJJ70197.1	XP_001395660.1	extracellular serine carboxypeptidase	Release of an N-terminal dipeptide, Xaa-Yaa!, preferentially when Yaa is Ala or Pro. Substrates are oligopeptides, preferentially tripeptides	0	0	6	5	6	4
60, 120 y 180	OJJ65991.1	XP_001390530.1	glucoamylase	Starch and sucrose metabolism	526	209	472	303	266	229
120 180	OJJ66103.1	XP_001389956.2	glucan endo-1,6-beta -glucosidase BGN16.3	Random hydrolysis of (1->6)-linkages in (1->6)-beta-D-glucans	0	0	7	6	6	5
120 180	OJJ71413.1	XP_001401464.1	NADP-specific glutamate dehydrogenase	Arginine biosynthesis; Alanine, aspartate and glutamate metabolism; Taurine and hypotaurine metabolism	0	0	14	79	34	19
120 180	OJJ71046.1	XP_001401851.1	superoxide dismutase [Mn]	2 superoxide + 2 H+ = O ₂ + H ₂ O ₂	0	0	25	19	23	13
120 180	OJJ67996.1	XP_001390419.1	endoglucanase-1 precursor	Starch and sucrose metabolism	0	0	6	5	4	4
60, 120 y 180	OJJ77724.1	GAQ42198.1	acid-stable alpha-amylase	Starch and sucrose metabolism	22	9	34	18	18	15
60, 120 y 180	OJJ68397.1	XP_001389998.1	alpha-L-arabinofuranosidase axhA	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	57	46	36	41	16	19
120 180	OJJ69283.1	XP_001393994.1	GTP-binding protein ypt1		0	0	9	26	12	11
120 180	OJJ74881.1	XP_001389030.1	Ras-related protein Rab-11A		0	0	9	12	5	8

^{a1} Número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. brasiliensis* CBS 101740; ^{a2} número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. niger*, principalmente la cepa CBS 513.88; ^b Nombre de la proteína encontrado en las bases de datos; ^c función encontrada en la base de datos KEGG; PSM=*peptide spectral match*, número de péptidos alineados con las secuencias de proteína de las bases de datos, HP= *Hypothetical protein*

Tabla A6. Datos complementarios del análisis bioinformático de las proteínas reguladas identificadas en cultivo líquido.

Glucosa g/L	No acceso*	No acceso*	Proteína	Ruta metabólica o función***	20 g/L PS M	20 g/L PS M	40 g/L PS M	40 g/L PS M	60 g/L PS M	60 g/L PS M
20, 40 y 60	OJJ76685.1	XP_001399157.1	amidase	Arginine and proline metabolism; Phenylalanine metabolism; Tryptophan metabolism; Aminobenzoate degradation; Styrene degradation	9	15	6	7	7	9
20, 40 y 60	OJJ78207.1	OJJ78207.1	HP ASPBRDRAFT_142667/1,3-beta-glucanosyltransferase		7	5	5	8	32	31
20, 40 y 60	OJJ77724.1	GAQ42198.1	acid-stable alpha-amylase	Starch and sucrose metabolism	125	7	40	29	40	42
20, 40 y 60	OJJ66105.1	XP_001389952.1	FAD-dependent oxygenase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	25	18	7	11	10	10
20, 40 y 60	OJJ67851.1	XP_001402433.1	1,3-beta-glucanosyltransferase gel1		91	109	40	59	59	56
20, 40 y 60	OJJ74153.1	GAQ46904.1	YkgB		383	735	33	153	40	76
20, 40 y 60	OJJ71535.1	XP_001398198.2	carboxypeptidase S1	Proteolysis	16	14	9	17	8	11
20, 40 y 60	OJJ74329.1	OJJ74329.1	HP ASPBRDRAFT_27362/Probable mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase 1B		29	32	9	12	4	15
20, 40 y 60	OJJ73486.1	XP_001392850.1	1,3-beta-glucanosyltransferase gel2		4	19	4	11	10	10
20 y 40	OJJ68065.1	XP_001390497.2	1,3-beta-glucanosyltransferase gel3	Transferase activity	7	7	4	6	0	0
20, 40 y 60	OJJ65770.1	XP_001390502.1	FAD binding domain protein		7	10	5	7	3	3
20, 40 y 60	OJJ77191.1	XP_001401093.1	aspergillopepsin 1	Hydrolysis of proteins with broad specificity.	35	13	13	13	12	12
20, 40 y 60	OJJ71393.1	XP_001401488.1	protein ecm33		254	529	33	195	40	60
20, 40 y 60	OJJ76993.1	XP_001400873.1	tripeptidyl-peptidase sed2	Proteolysis/pathogenecity	172	227	79	100	57	67
20, 40 y 60	OJJ69362.1	XP_001393905.1	sulphydryl oxidase	$2 R'C(R)SH + O_2 = R'C(R)S-S(R)CR' + H_2O_2$	62	81	30	48	29	40
20, 40 y 60	OJJ70100.1	OJJ70100.1	HP ASPBRDRAFT_45424 /Isopullulanase	Hydrolysis of pullulan to isopanose (6-alpha-maltosylglucose)	40	50	21	42	36	31
20, 40 y 60	OJJ76937.1	XP_001400808.1	cell wall protein PhiA	Cell wall protein involved in development of asexual structures such as phialide and conidium development, and thus required for spore formation. Plays a role as a general stress protectant produced by the fungus in competition with antagonistic bacteria.	65	17	100	180	313	182
20, 40 y 60	OJJ73716.1	XP_001392582.1	tripeptidyl-peptidase 1	Proteolysis/pathogenecity	6	5	11	5	9	17
20, 40 y 60	OJJ75270.1	XP_001388594.1	acid trehalase	Starch and sucrose metabolism	19	21	10	17	10	11
40 y 60	OJJ67369.1	OJJ67369.1	HP ASPBRDRAFT_69025 /Beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans	0	0	13	18	31	52
20, 40 y 60	OJJ77986.1	XP_001394632.2	beta-mannosidase A	Other glycan degradation	5	15	4	7	6	4
20, 40 y 60	OJJ70876.1	XP_001402053.1	alpha-glucosidase	Galactose, starch and sucrose metabolism	16	18	5	15	5	7
40 y 60	OJJ66136.1	XP_001389926.1	pectin lyase F	Eliminative cleavage of (1->4)-alpha-D-galacturonan methyl ester to give oligosaccharides with 4-deoxy-6-O-methyl-alpha-D-galact-4-enuronosyl groups at their non-reducing ends	0	0	30	10	30	73

^{a1} Número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. brasiliensis* CBS 101740; ^{a2} número de acceso de la base de datos de NCBI alineando con la base de datos de *A. niger*, principalmente la cepa CBS 513.88; ^b Nombre de la proteína encontrado en las bases de datos; ^c función encontrada en la base de datos KEGG; PSM=*peptide spectral match*, número de péptidos alineados con las secuencias de proteína de las bases de datos, HP= *Hypothetical protein*

11.2. Anexo 2

En esta sección se muestra información adicional respecto a la abundancia relativa de las proteínas identificadas para cada metabolismo/proceso.

11.2.1 Abundancia relativa de las proteínas identificadas en cultivo líquido.

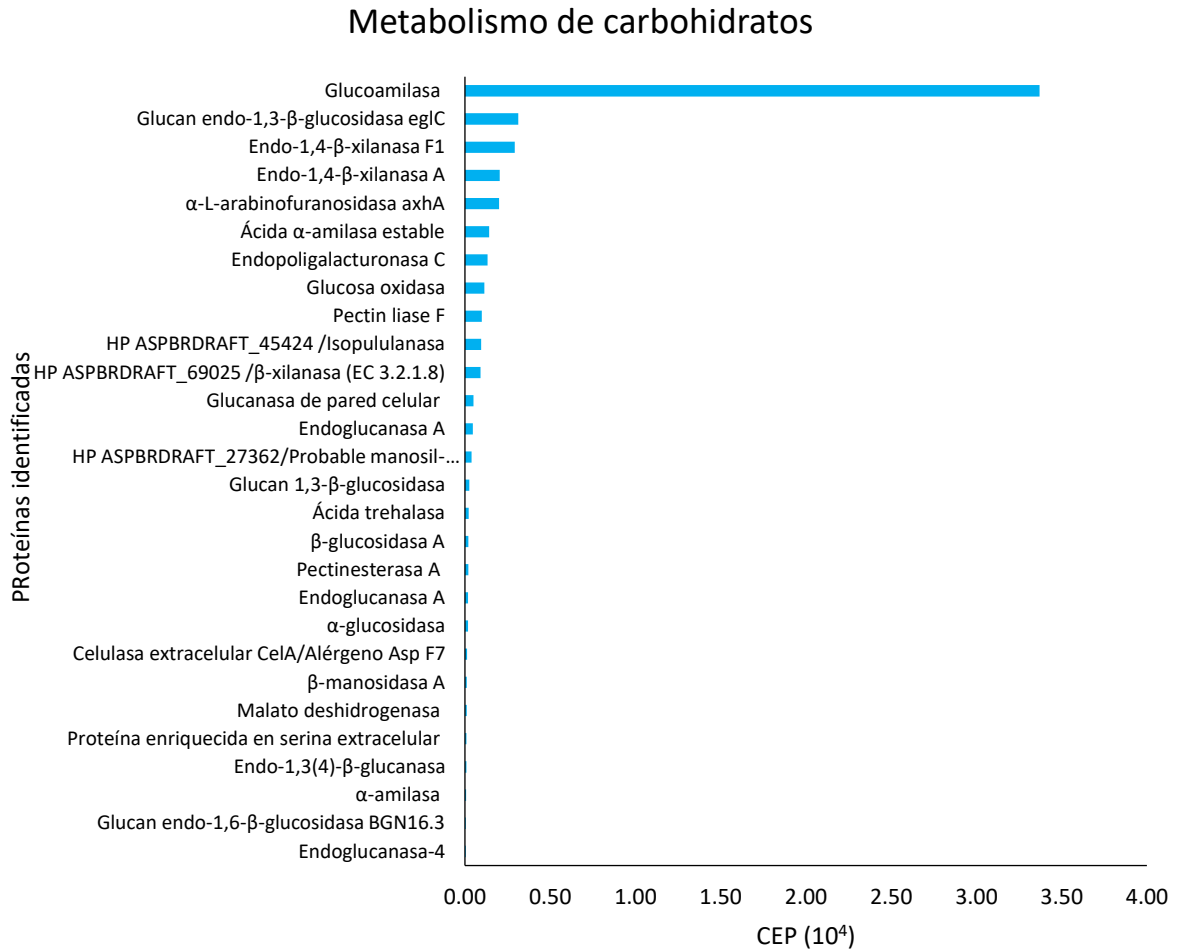


Figura 1A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos en cultivo líquido.

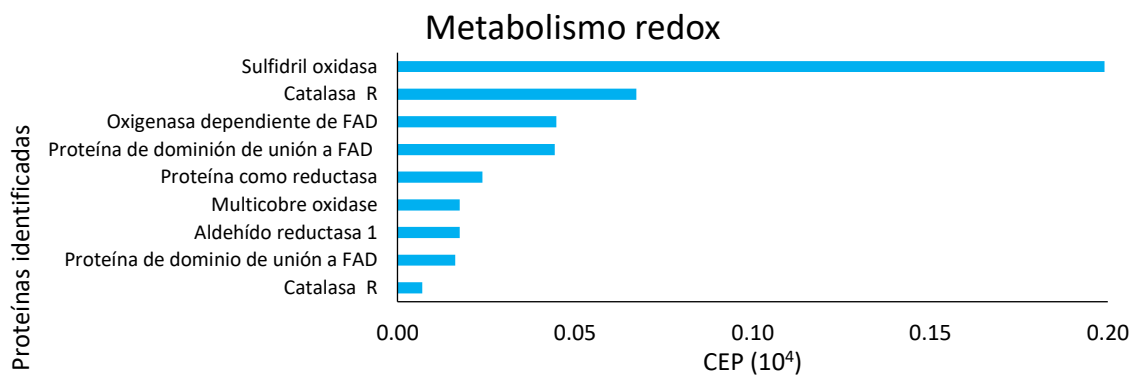


Figura 2A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al metabolismo redox en cultivo líquido.

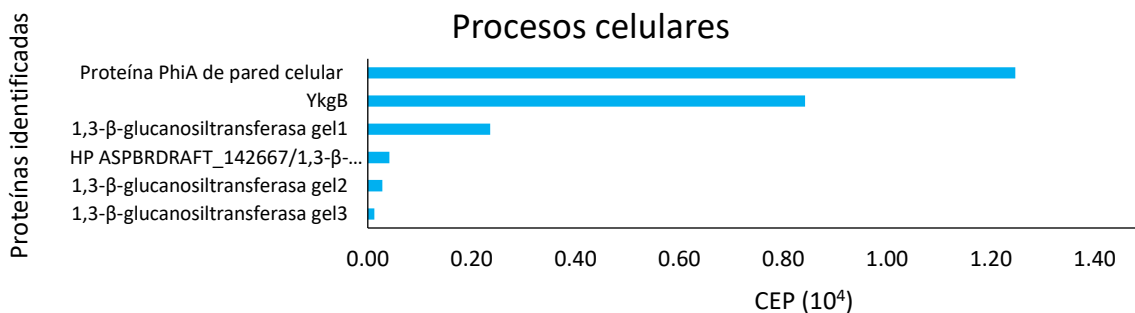


Figura 3A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas a diversos procesos celulares en cultivo líquido.

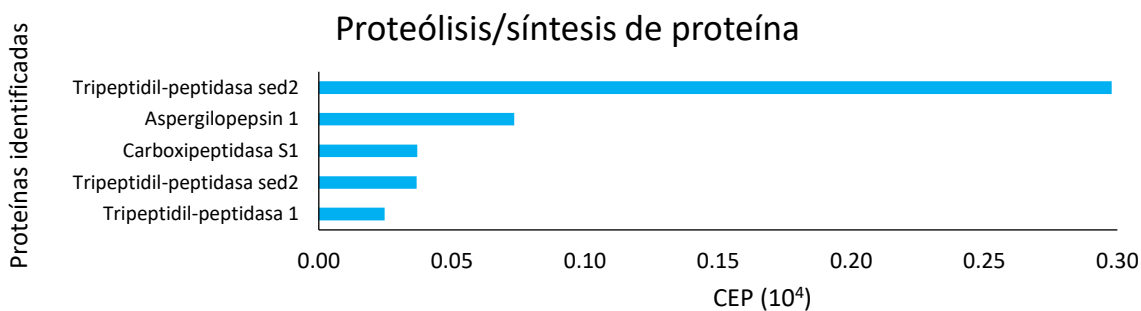


Figura 4A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al procesamiento/proteólisis de proteínas en cultivo líquido.

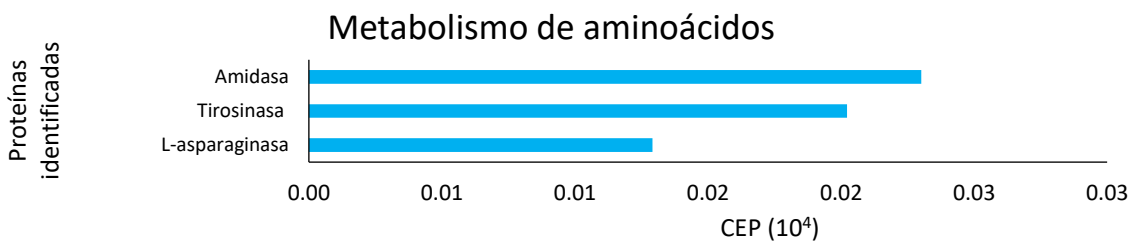


Figura 5A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al metabolismo de aminoácidos en cultivo líquido.

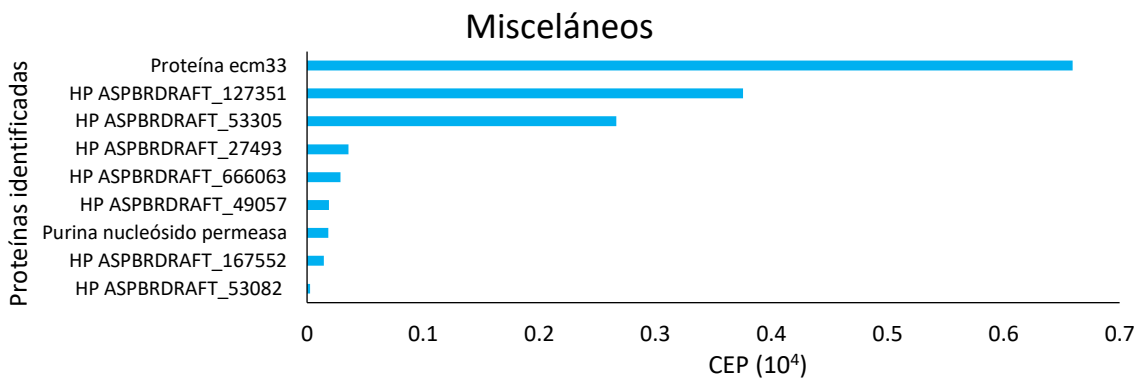


Figura 6A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas clasificadas como misceláneas en cultivo líquido.

11.2.2 Abundancia relativa de las proteínas identificadas en cultivo sólido.

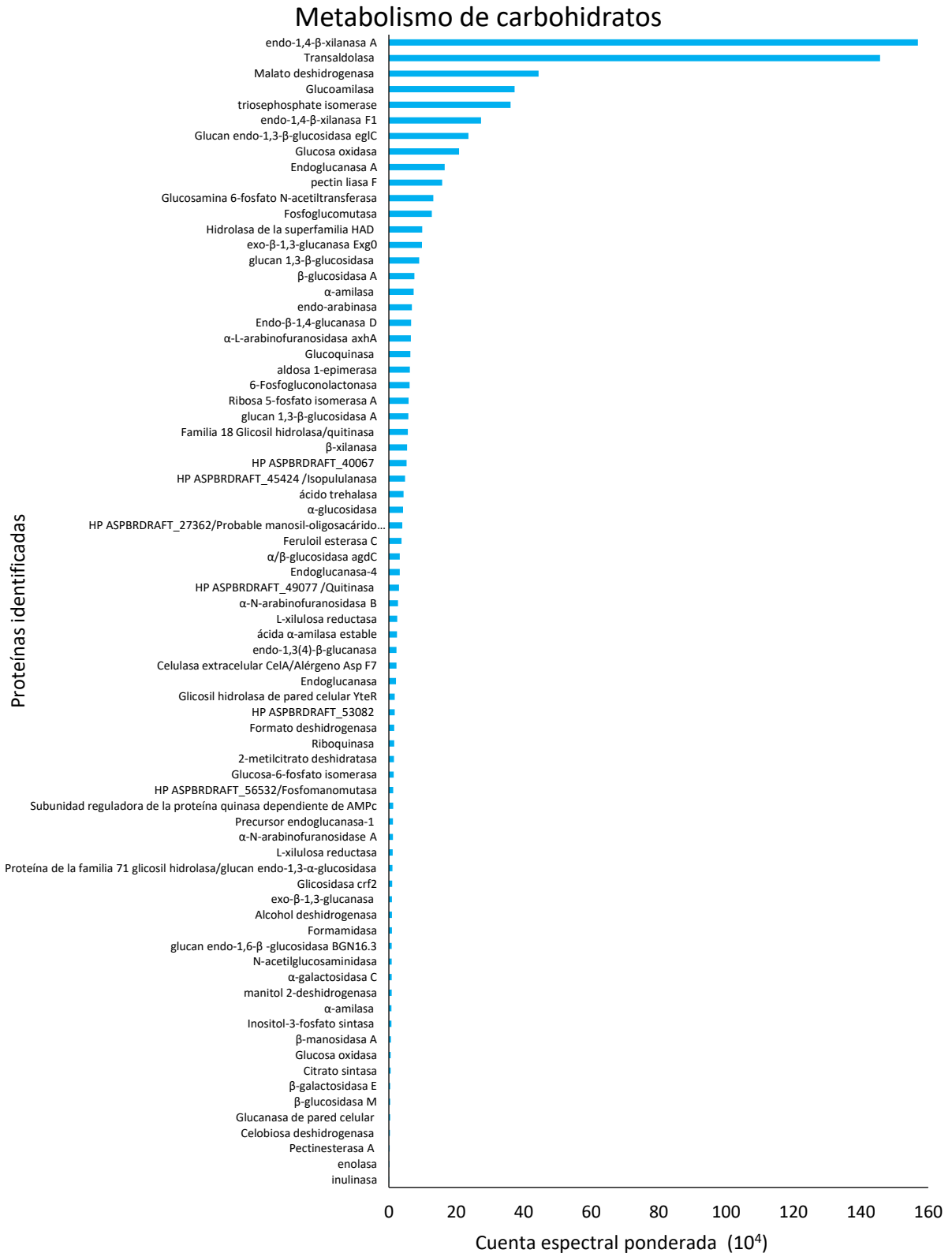


Figura 7A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos en cultivo sólido.

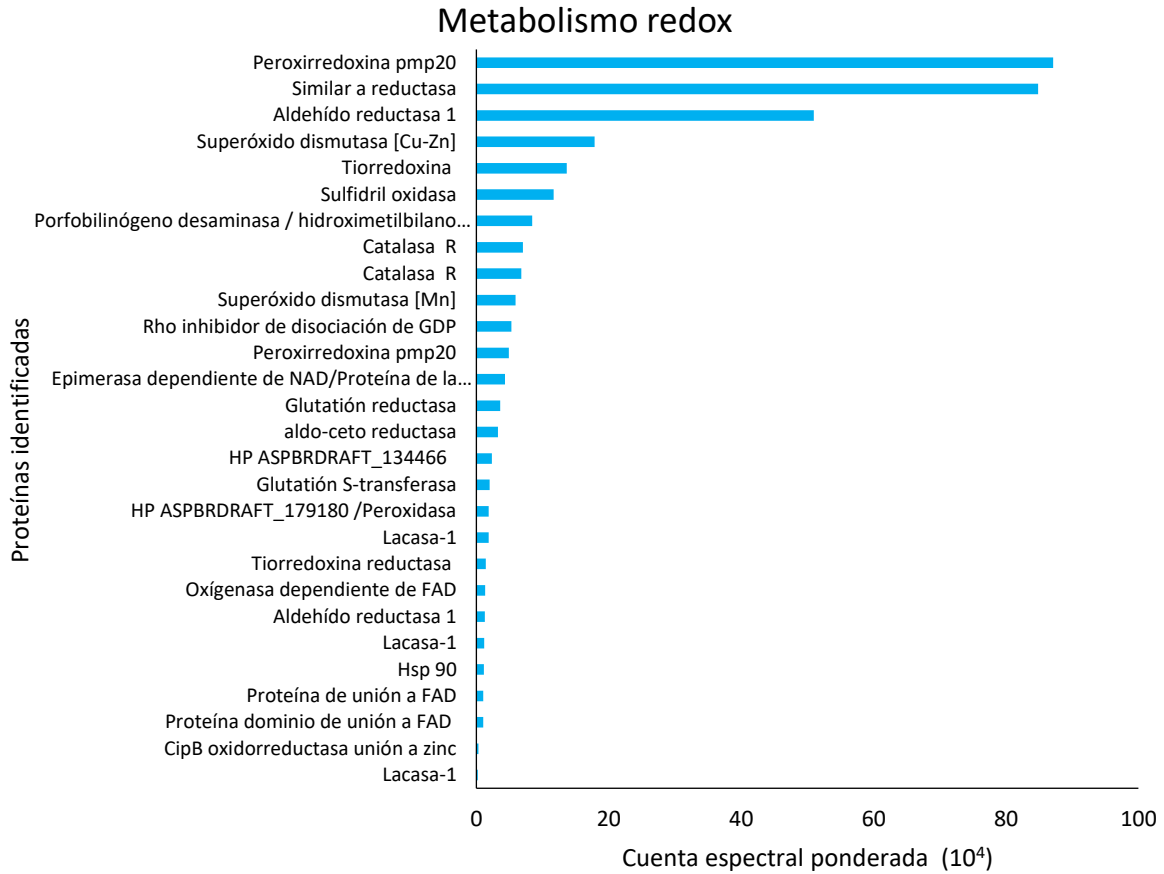


Figura 8A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas al metabolismo redox en cultivo sólido.

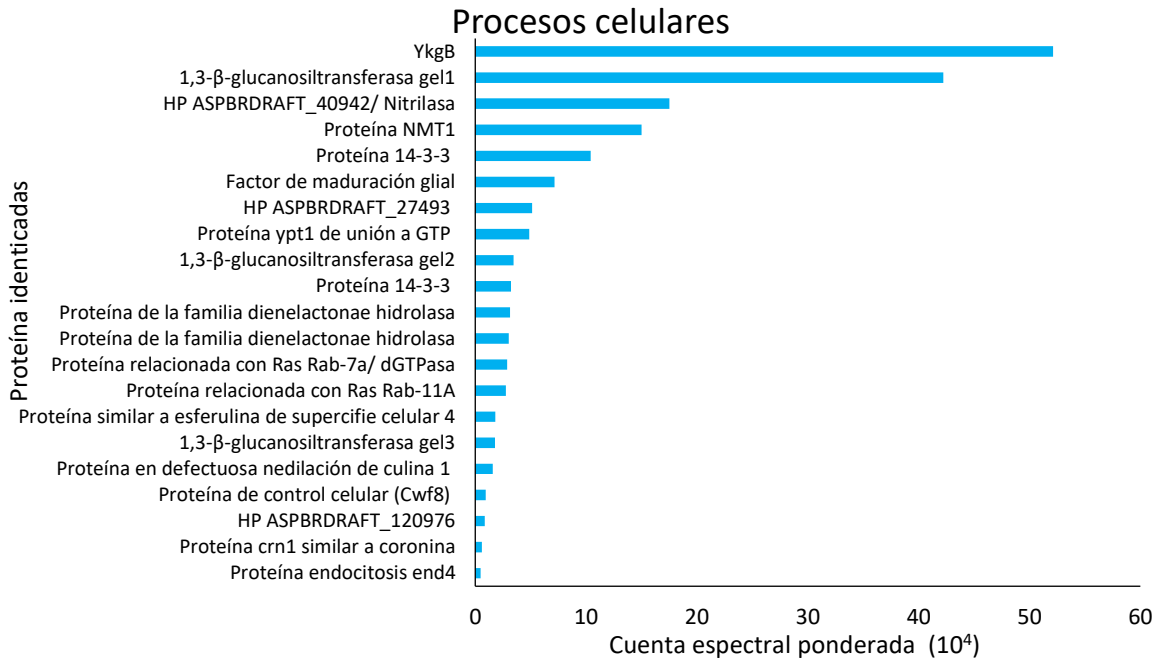


Figura 9A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas identificadas asociadas procesos celulares en cultivo sólido.

Procesamiento de proteínas/proteólisis

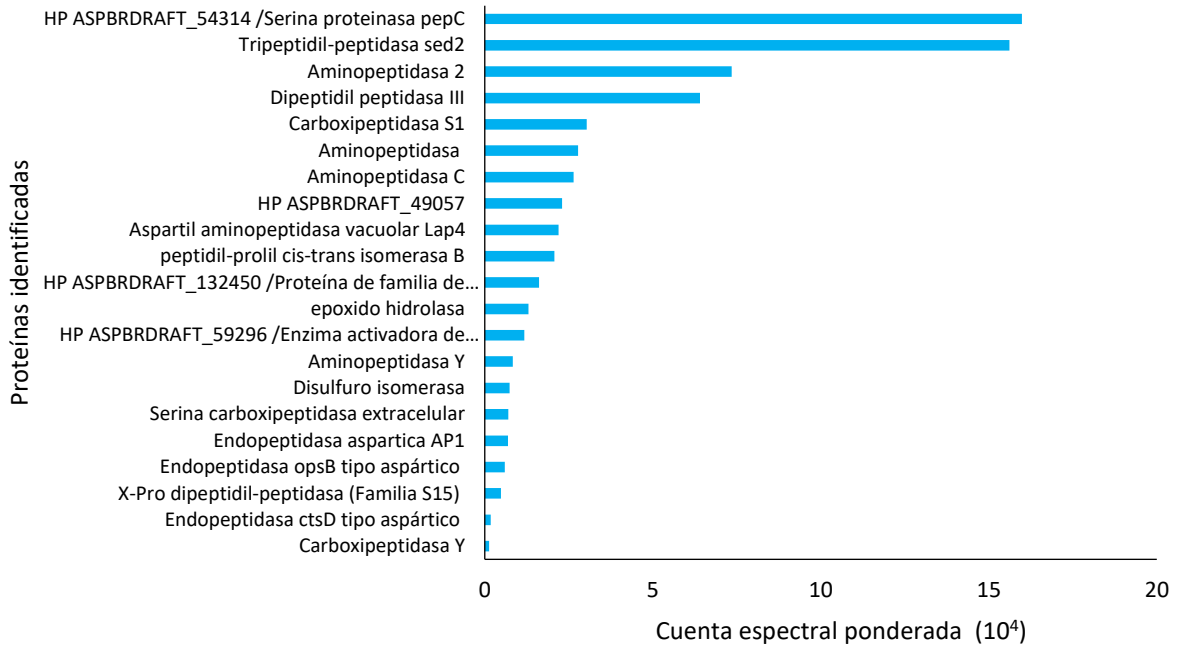


Figura 10A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas a procesamiento de proteínas/proteólisis en cultivo sólido.

Metabolismo de aminoácidos

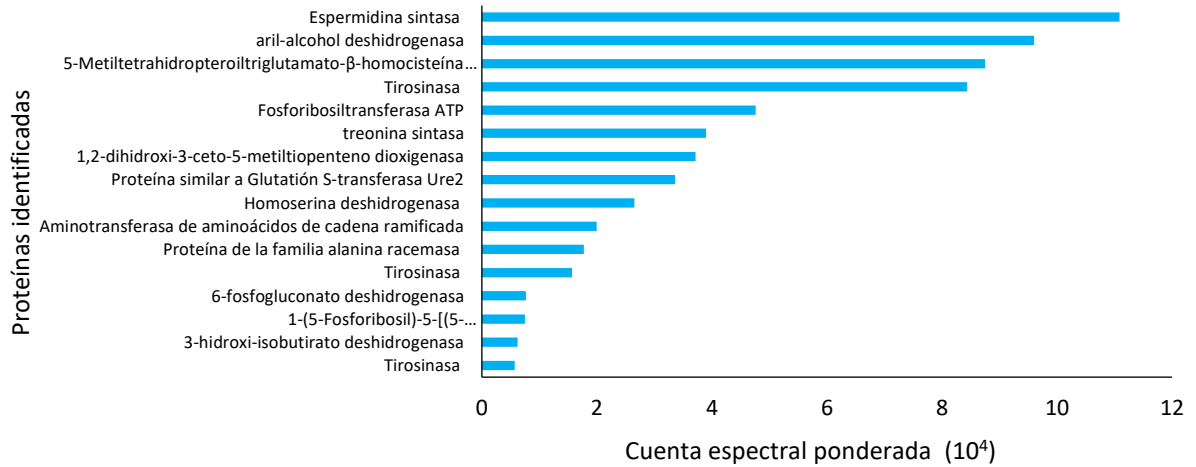


Figura 11A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de aminoácidos en cultivo sólido.

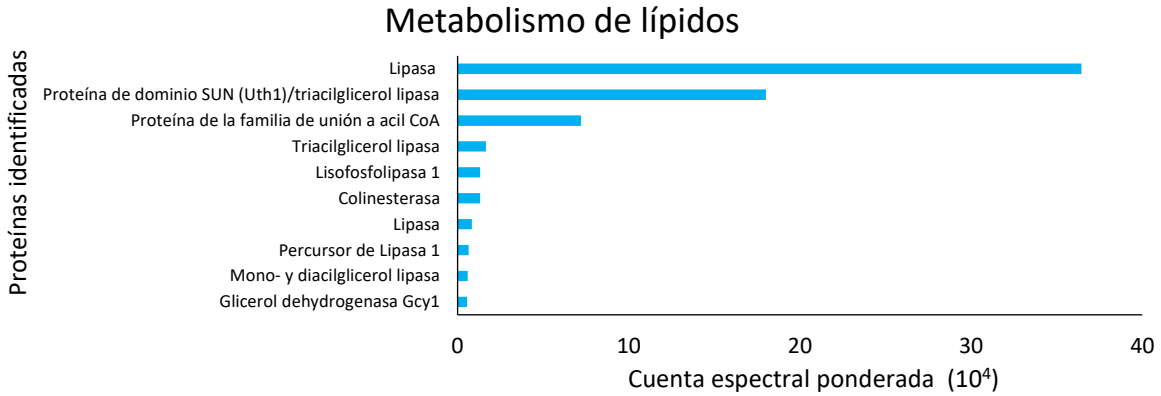


Figura 12A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de lípidos en cultivo sólido.

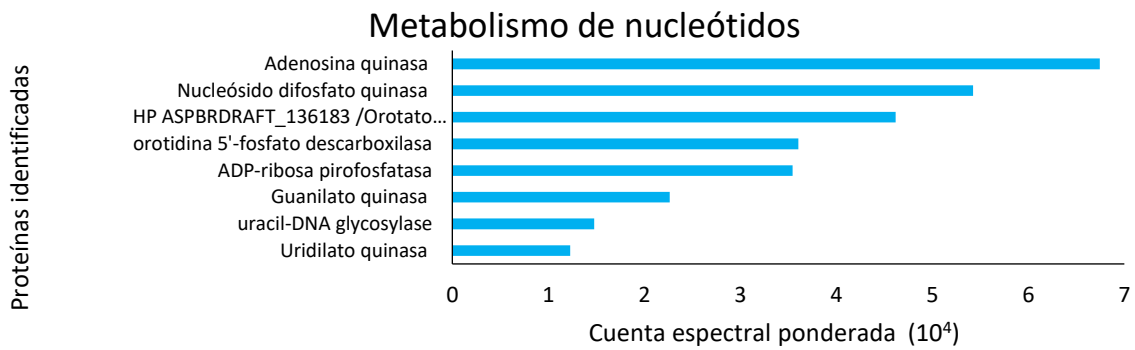


Figura 13A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de nucleótidos en cultivo sólido.



Figura 14A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de cofactores y vitaminas en cultivo sólido.

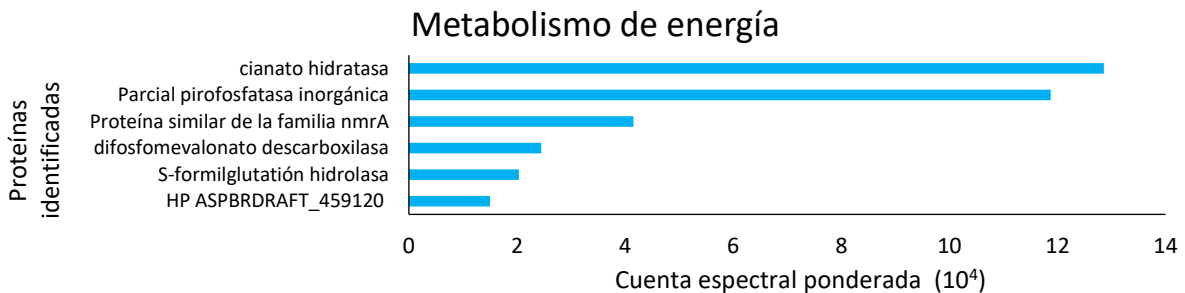


Figura 15A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de energía en cultivo sólido.

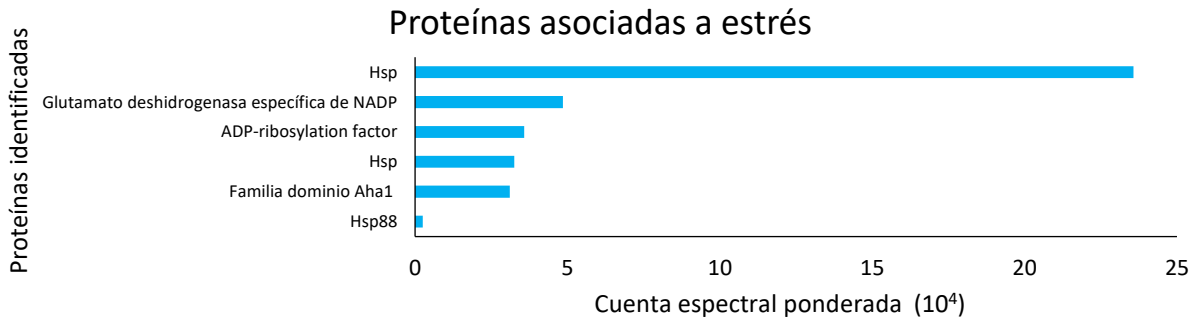


Figura 16A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas a mecanismos de defensa a estrés en cultivo sólido.

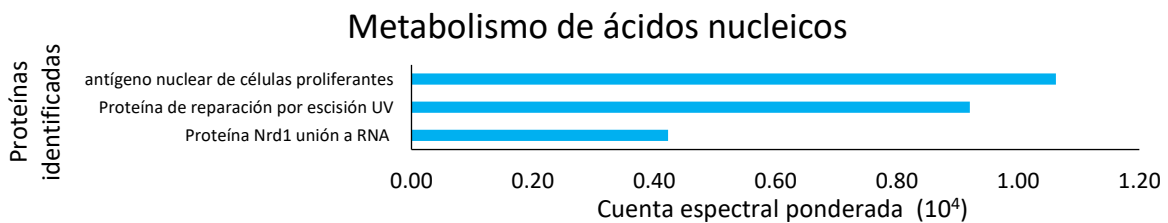


Figura 17A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas al metabolismo de ácidos nucleicos en cultivo sólido.

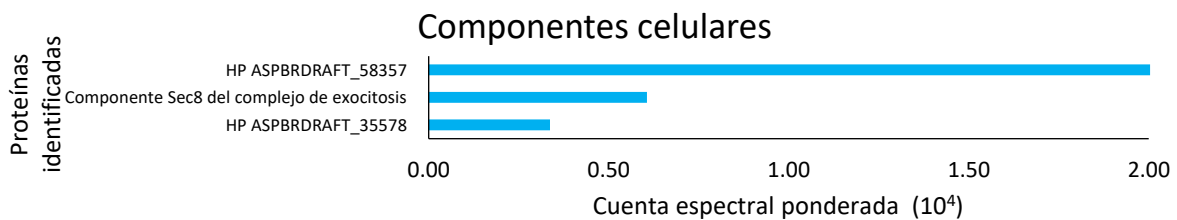


Figura 18A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas componentes celulares en cultivo sólido.

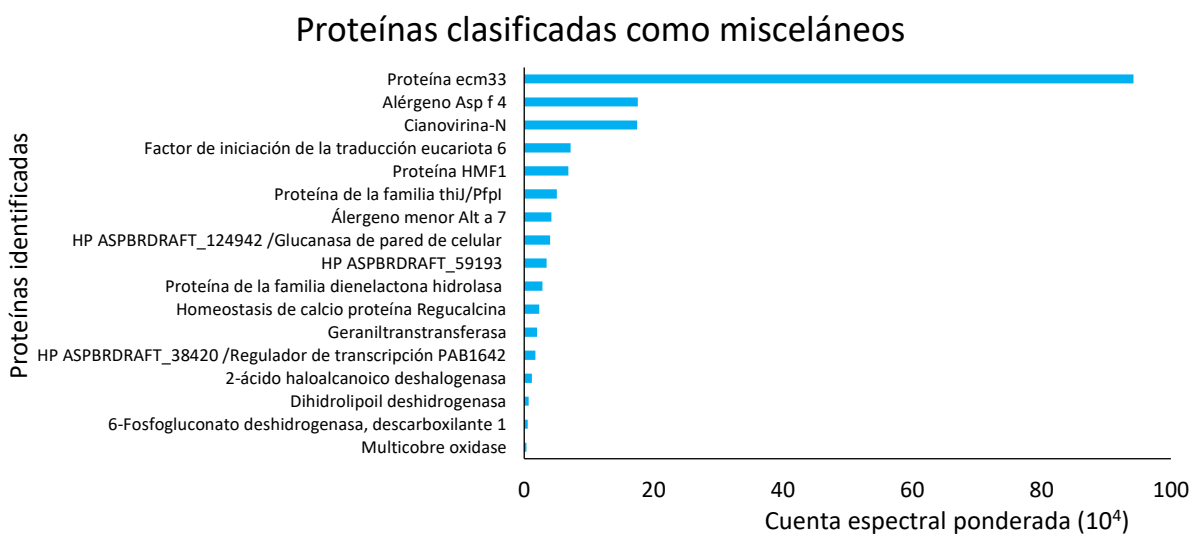


Figura 19A. Cuenta espectral ponderada de las proteínas clasificadas como misceláneos en cultivo sólido.

11.3. Anexo 3

Ejemplo de como fue realizado el conteo de número de puntas para las hifas de *Aspergillus brasiliensis*.

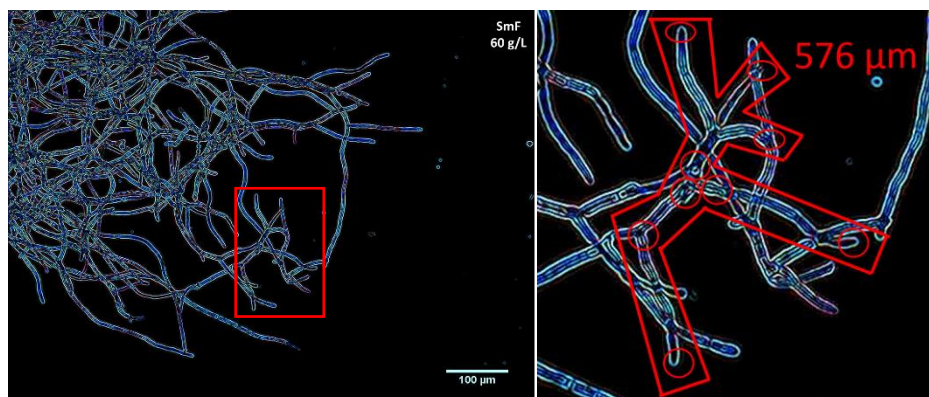


Figura 20A. Ejemplo de medición de la ramificación de *A. brasiliensis* con 60 g/L en cultivo líquido (imagen izquierda), el cuadro rojo indica la hifa que se utilizó para medir el número de puntas. La imagen derecha es un incremento de la imagen para observar la hifa medida junto con sus respectivas regiones apicales, la hifa medida (limitada por el entorno rojo) fue de 576 μm , la cual presentó 10 puntas (círculo rojo).

11.4. Anexo 4

Artículo publicado con la información reportada en la tesis.



Fungal Biology

Available online 7 May 2020

In Press, Corrected Proof



Solid-state fermentation increases secretome complexity in *Aspergillus brasiliensis*

Daniel Salgado-Bautista ^a, Tania Volke-Sepúlveda ^a, Francisco Figueroa-Martínez ^c, Ulises Carrasco-Navarro ^a, Alicia Chagolla-López ^b, Ernesto Favela-Torres ^a

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.006>

Get rights and content

Highlights

- The online CO₂ measurement allows to obtain physiologically homogenous secretomes.
- SSF increases the concentration and diversity of secreted proteins compared to SmF.
- SSF raises oxidative metabolism and branching level of hyphae in *A. brasiliensis*.
- All regulated proteins were upregulated in SSF and 74% were downregulated in SmF.
- SSF favors the secretion of proteins that could participate in fungal adhesion.



Análisis comparativo del secretoma de *Apergillus brasiliensis* obtenido en cultivo líquido y sólido



DANIEL ALFONSO SALGADO BAUTISTA
ALUMNO

REVISO

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 14:30 horas del día 10 del mes de julio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ
DR. EDUARDO ALBERTO CALLEGARI

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

DE: DANIEL ALFONSO SALGADO BAUTISTA

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

APROBAR

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 DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

VOCAL

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA
MARTINEZ

SECRETARIO

DR. EDUARDO ALBERTO CALLEGARI

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella