



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

“Análisis comparativo del proteoma de *Aspergillus brasiliensis* en cultivos sólido y líquido”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en B. Carlos Guerrero Urrutia

Matrícula: 2153804170

COMITÉ TUTORAL:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Asesor: Dr. Gerardo Corzo Burguete

JURADO

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Dra. Diana Verónica Cortes Espinosa

Dr. Gerardo Corzo Burguete

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Iztapalapa, Ciudad de México, 18 de Mayo de 2022

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”.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00266

Matrícula: 2153804170

Análisis comparativo del proteoma de *Aspergillus brasiliensis* en cultivos sólido y líquido

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:30 horas del día 18 del mes de mayo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA
DRA. DIANA VERONICA CORTES ESPINOSA
DR. GERARDO CORZO BURGUETE
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

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 BIOTECNOLOGIA
DE: CARLOS GUERRERO URRUTIA

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.



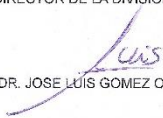
CARLOS GUERRERO URRUTIA
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALVA GUERRERO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



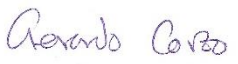
DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

VOCAL



DRA. DIANA VERÓNICA CORTES ESPINOSA

VOCAL



DR. GERARDO CORZO BURGUETE

SECRETARIO



DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi director de tesis, Dr. Ernesto Favela Torres por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo dentro de la PP4. Quiero agradecerle por confiar en mí, por todo el apoyo que me brindó, por sus sabios consejos y también por los oportunos regaños.

Igualmente quiero agradecer a mi asesora, Dra. Tania Volke Sepúlveda por ser siempre tan amable conmigo, por tenerme paciencia, por todos sus consejos y observaciones que sirvieron para el desarrollo y mejora del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Francisco Figueroa Martínez por sus opiniones, consejos y participación en el desarrollo y publicación de una parte del proyecto.

Agradezco al Dr. Ulises Carrasco Navarro por su disposición para ayudarme, por sus consejos y por su participación e impulso para el desarrollo de la última parte del trabajo que desafortunadamente no se concluyó a causa de la pandemia.

Finalmente quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio y amigos de la UAMI por el ambiente de trabajo y opiniones constructivas y por todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi familia. Mis padres y hermanos son las personas más importantes en mi vida. Para mí son un ejemplo de lucha continua. De ellos obtuve la fortaleza e inspiración que me ha llevado a ser quien soy en este momento de mi vida. Siempre han confiado en mí, me han apoyado y me han motivado a seguir adelante, lo cual les agradeceré eternamente.

CONTENIDO

i.	ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ii.	ÍNDICE DE TABLAS	vi
iii.	LISTA DE ABREVIATURAS	viii
iv.	RESUMEN	xii
v.	ABSTRACT	xiv
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	Cultivo en medio sólido (CMS).....	3
2.2.	Cultivo en medio líquido (CML).....	5
2.3.	Aplicaciones del CMS y CML	6
2.4.	Comparación de CMS y CML	14
2.5.	Importancia del género <i>Aspergillus</i>	16
2.6.	Importancia de las inulinasas e invertasas	18
2.7.	Aplicaciones de la proteómica en hongos filamentosos	22
2.8.	Técnicas para el análisis proteómico	26
2.8.1.	Separación de proteínas en geles SDS-PAGE (1D y 2D).....	27
2.8.2.	Digestión tróptica	29
2.8.3.	Espectrometría de masas.....	29
2.8.4.	Análisis bioinformático	35
3.	ANTECEDENTES DIRECTOS.....	38
4.	JUSTIFICACIÓN	39
5.	HIPÓTESIS	40
6.	OBJETIVOS	40
6.1.	Objetivo general	40
6.2.	Objetivos particulares	40
7.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	41
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
8.1.	Microorganismo	43
8.1.1.	Producción de preinóculo	43
8.1.2.	Propagación del inóculo	43
8.2.	Medio de cultivo	43
8.3.	Cultivo en medio líquido (CML).....	43
8.4.	Cultivo en medio sólido (CMS).....	44
8.5.	Medición en línea de la producción de CO ₂	45
8.6.	Recuperación de proteína extracelular	45
8.6.1.	Cultivo en medio líquido	45
8.6.2.	Cultivo en medio sólido.....	46
8.7.	Concentración y diálisis de proteína extracelular.....	46
8.8.	Ruptura celular y procesamiento de proteína intracelular	46
8.8.1.	Extracción de proteína intracelular en CML.....	46

8.8.2. Extracción de proteína intracelular en CMS	47
8.9. Separación de proteína por SDS-PAGE	47
8.9.1. Proteína extracelular (secretoma)	47
8.9.2. Proteína intracelular (proteoma intracelular)	48
8.9.3. Zimogramas de actividad inulinasa e invertasa	48
8.10. Digestión trípica	49
8.11. LC-MS/MS	50
8.11.1. Proteína extracelular (secretoma)	50
8.11.2. Proteína intracelular (proteoma intracelular)	51
8.12. Análisis bioinformático	51
8.13. Clasificación y regulación de proteínas identificadas en el proteoma	53
8.14. Métodos analíticos	54
8.14.1. Cuantificación de azúcares	54
8.14.2. Determinación de actividad inulinasa e invertasa	54
8.14.3. Cuantificación de proteína	55
8.14.4. Cuantificación de biomasa	55
8.14.5. Cuantificación de pH	55
8.14.6. Cuantificación de humedad	55
8.15. Análisis estadístico	55
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
9.1. Cinéticas de crecimiento de <i>A. brasiliensis</i> en CMS y CML	56
9.2. Producción de inulinasa e invertasa en CMS y CML	61
9.3. Proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS y CML	65
9.4. Comparación del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS y CML	65
9.4.1. Proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos	66
9.4.2. Proteínas clasificadas como misceláneas	70
9.4.3. Proteínas clasificadas como componente/proceso celular	74
9.4.4. Proteínas asociadas al metabolismo redox y al estrés	78
9.4.5. Proteínas asociadas con la síntesis de proteínas o proteólisis	80
9.4.6. Proteínas del metabolismo de aminoácidos	82
9.4.7. Proteínas del metabolismo energético	83
9.5. Descripción del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS	85
9.5.1. Proteínas únicas en CMS	91
9.5.2. Proteínas abundantes no reguladas en CMS	99
9.5.3. Proteínas abundantes reguladas en CMS	107
9.6. Descripción del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML	114
9.6.1. Proteínas únicas	119
9.6.2. Proteínas abundantes no reguladas	126
9.6.3. Proteínas abundantes reguladas	129
10. CONCLUSIONES	133
10.1. Conclusión general	133
10.2. Conclusiones parciales	133
11. PERSPECTIVAS	134
12. REFERENCIAS	136
13. ANEXOS	187
13.1. Anexo 1	187
13.2. Anexo 2	192

13.3. Anexo 3	193
13.4. Anexo 4	194
13.5. Anexo 5	195
13.6. Anexo 6	200
13.7. Anexo 7	209
13.8. Anexo 8	214
13.9. Anexo 9	220
13.10. Anexo 10	225
13.11. Anexo 11	229
13.12. Anexo 12	236
13.13. Anexo 13	240
13.14. Anexo 14	244

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura lineal de la inulina (imagen modificada de Singh y Singh, (2017)).	19
Figura 2. Mecanismo de acción de inulinasas e invertasa y productos de hidrólisis de inulina (imagen modificada de Singh y Singh, (2017)).	20
Figura 3. Flujo de trabajo para la identificación de proteínas con datos MS/MS, tomada de Cottrell, (2011).	27
Figura 4. Proceso de ionización ESI, tomada de El-Aneed et al. (2009).	31
Figura 5. Proceso de ionización MALDI tomada de El-Aneed et al. (2009).	32
Figura 6. Configuraciones comunes de fuente de iones y analizadores en espectrómetros de masas (imagen modificada de Aebersold y Mann (2003)).	34
Figura 7. Diagrama de la estrategia experimental general.	42
Figura 8. Esquema de medición del sistema de respirometría.	45
Figura 9. Parámetros cinéticos estimados a partir de la producción de CO ₂ por <i>A. brasiliensis</i> en CMS y CML.	57
Figura 10. Rendimiento molar de producción de CO ₂ y consumo de sacarosa (Y _{CO₂/S}) en función de la concentración inicial de sacarosa.	60
Figura 11. Producción de invertasa e inulina por <i>A. brasiliensis</i> cultivado en condiciones de CMS y CML con diferente concentración inicial de sacarosa.	62
Figura 12. Análisis zimográfico de actividad inulina e invertasa obtenida de cultivos de <i>A. brasiliensis</i> en CMS y CML. Línea M: marcador de pesos moleculares. En todos los casos 0.25 U de actividad enzimática fueron cargadas por línea.	64
Figura 13. Clasificación del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS y CML basada en la cuenta espectral ponderada de las proteínas únicas, abundantes no reguladas y abundantes reguladas según el metabolismo o proceso biológico en que participan.	65
Figura 14. Producción de invertasa e inulina por <i>A. brasiliensis</i> cultivado en condiciones de CMS y CML con diferente concentración inicial de sacarosa. Las actividades enzimáticas fueron cuantificadas en el tiempo en el que se alcanza la tasa máxima de producción de CO ₂ .	68
Figura 15. Distribución de proteínas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS en función de la concentración de sacarosa (20 a 60 g/L).	86
Figura 16. Distribución de proteínas "Extra-Intra" del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS en función de la concentración de sacarosa (20 a 60 g/L).	87
Figura 17. Clasificación del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> obtenido en CMS con 20 a 180 g/L de sacarosa en función del metabolismo o proceso biológico en que participan las proteínas.	88
Figura 18. Top 10 proteínas más abundantes del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 20 a 180 g/L de sacarosa en función de su CEP.	90

Figura 19. Distribución de proteínas únicas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS en función de la concentración de sacarosa y ubicación en la célula.....	92
Figura 20. Clasificación CAZy de las enzimas únicas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS.....	95
Figura 21. Clasificación de las proteínas únicas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS...98	
Figura 22. Clasificación CAZy de las enzimas abundantes no reguladas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS.....	103
Figura 23. Clasificación de las proteínas abundantes no reguladas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS.....	106
Figura 24. Clasificación CAZy de las enzimas abundantes reguladas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS.....	110
Figura 25. Clasificación de las proteínas abundantes reguladas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS.....	114
Figura 26. Distribución de proteínas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML en función de la concentración de sacarosa.....	115
Figura 27. Distribución de proteínas “Extra-Intra” del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML en función de la concentración de sacarosa.....	116
Figura 28. Clasificación del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML en función del metabolismo o proceso biológico en que participan las proteínas.....	116
Figura 29. Top 10 proteínas más abundantes del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML en función de su CEP.....	117
Figura 30. Distribución de proteínas únicas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML en función de la concentración de sacarosa y ubicación en la célula.....	120
Figura 31. Clasificación CAZy de las enzimas únicas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML.....	124
Figura 32. Clasificación de las proteínas únicas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML.....	125
Figura 33. Clasificación CAZy de las enzimas abundantes no reguladas del proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML.....	127
Figura 34. Clasificación de las proteínas abundantes no reguladas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML.....	128
Figura 35. Clasificación de las proteínas abundantes reguladas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML.....	132
Figura A2. Tasa de producción de CO ₂ de <i>A. brasiliensis</i> cultivado en CMS y CML	192
Figura A3. Ejemplo de corte de cada carril de los geles SDS-PAGE previo a su digestión trípica.	193
Figura A4. Ejemplo del procedimiento seguido para identificar la regulación y el nivel de regulación de las proteínas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS y CML.....	194

ii. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de enzimas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.	9
Tabla 2. Comparación entre el CMS y CML (Raimbault, 1998; Krishna, 2005).....	15
Tabla 3. Producción de inulinasa e invertasa por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.	21
Tabla 4. Reportes de análisis proteómicos aplicados a hongos del género <i>Aspergillus</i> en diferentes sistemas de cultivo.	24
Tabla 5. Consumo de sacarosa y producción de proteína por <i>A. brasiliensis</i> cultivado en CMS y CML con diferente concentración inicial de sacarosa*	59
Tabla 6. Relación I/S estimada a partir de los resultados de actividad invertasa e inulinasa obtenidos en CMS y CML de <i>A. brasiliensis</i> con diferente concentración inicial de sacarosa *	63
Tabla 7. Proteínas “misceláneas” involucradas en el metabolismo de hidrocarburos, biosíntesis de antibióticos y patogenicidad en CMS y CML.....	72
Tabla A1.1. Producción de ácidos orgánicos por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.....	187
Tabla A1.2. Producción de antibióticos y fármacos por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.	188
Tabla A1.3. Producción de biocombustibles por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.....	189
Tabla A1.4. Producción de otros metabolitos por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.....	190
Tabla A5. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa.	195
Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa.	200
Tabla A7. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa.	209
Tabla A8. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa.	214
Tabla A9. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa.....	220
Tabla A10. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa.	225
Tabla A11. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa.	229
Tabla A12. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa.....	236

Tabla A13. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de <i>A. brasiliensis</i> en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa.....	240
--	-----

iii. LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de varianza

AR: azúcares reductores

AspGD: Base de datos del genoma de *Aspergillus*

a_w: Actividad de agua

BCA: Ácido bicinconínico

big-PI: Base de datos predictora del sitio de modificación de glicosilfosfatidilinositol

BLASTp: Herramienta básica de búsqueda de alineación local de proteínas

CAZy: Base de datos de enzimas activas en carbohidratos

CEP: Cuenta espectral ponderada

CID: Disociación inducida por colisión

CML: Cultivo en medio líquido

CMS: Cultivo en medio sólido

C/N: Relación Carbono/Nitrógeno

CO₂: Dióxido de carbono

Comet: Motor de búsqueda para la identificación de péptidos

CRONOS: Herramientas bioinformática para identificación de proteínas por referencia cruzada

CS: Cultivo superficial

DIGE: Electroforesis diferencial

DTT: Ditioneitol

ECD: Disociación inducida por captura de electrones

EsembleFungi: Base de datos de genomas fúngicos

ESI: Ionización pro electroespray

ETD: Disociación por transferencia de electrones

FDR: Tasa de identificación falsa

FTICR: Analizador de resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier

FunSecKB2: Base de datos predictora de localización subcelular de proteínas

g: La fuerza centrífuga relativa o fuerza g (RCF) es la cantidad de aceleración que se aplicará a la muestra

GeLC-MS/MS: Gel de electroforesis acoplado a cromatografía líquida y espectrometría de masas

GO: Base de datos de ontología genética

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

I/S: Relación de actividad enzimática sobre inulina y sacarosa

ITS: Secuencias de ADN utilizadas para diferenciar entre especies de hongos

K: Lisina

KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kioto

kDa: Kilodalton

K_i: Constante de inhibición para cultivos en lote (g/L)

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

Luz UV: Luz ultravioleta

M: Concentración molar (mol/L)

MALDI: Ionización por desorción láser asistida por matriz

Mascot: Motor de búsqueda para la identificación de péptidos

MaxQuant: Herramienta bioinformática para el procesamiento de espectros e identificación de proteínas

mM: Concentración milimolar (mmol/L)

MS: Espectrometría de masas

MS/MS: Espectrometría de masas en tandem

MWCO: corte de peso molecular que determina el tamaño de poro de las membranas utilizadas para ultrafiltración

MyriMatch: Motor de búsqueda para la identificación de péptidos

m/z: Relación masa carga de los iones generados por espectrometría de masas

mzXML: Formato de datos (crudos) de salida del espectrómetro de masas

N: Concentración normal

NMWL: Tamaño de poro o límite de peso molecular nominal

OMMSA: Motor de búsqueda para la identificación de péptidos

OpenMS Proteomics Pipeline: Herramienta bioinformática para el procesamiento de espectros e identificación de proteínas

PDA: Agar papa dextrosa

pI: Punto isoeléctrico

Phobius: Base de datos predictora de péptido señal y sitios transmembrana

PICR: Herramientas bioinformática para identificación de proteínas por referencia cruzada

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PredGPI: Base de datos predictora de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol

Protcomp: Base de datos predictora de localización subcelular de proteínas

ProteoWizard: Herramienta bioinformática para el procesamiento de espectros e identificación de proteínas

Q3: Espectrómetro de triple cuadrupolo

Q-TOF: Espectrómetro cuadrupolo-tiempo de vuelo

R: Arginina

RAW: Formato de datos (crudos) de salida del espectrómetro de masas

Rf: Movilidad electroforética de la proteína

rpm: revoluciones por minuto

SecretomeP: Base de datos para predecir mecanismos de secreción de proteínas

SEQUEST: Motor de búsqueda para la identificación de péptidos

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE 1D o 2D: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, en una dimensión o en dos dimensiones

Shotgun: Enfoque de análisis proteómico aplicado a muestras complejas para obtener un perfil global de la proteína dentro de la muestra

SignalP: Base de datos para la identificación de péptido señal en proteínas

Sp: Espectros de masa

SpC: Espectros de masa por mL de extracto proteico para la proteína i

Spot: Punto de proteína observado en geles bidimensionales

SPSS statistics: Software para análisis estadístico

Swiss-Prot: Base de datos de proteínas

TargetP: Base de datos predictora de péptido señal

TCA: Ácido tricloroacético

TMHMM: Base de datos predictora de sitios transmembrana

TMPC: Tasa máxima de producción de CO₂ (g/mL h)

TOF: Analizador de tiempo de vuelo

TOF-TOF: Espectrómetro híbrido con doble analizador de tiempo de vuelo

Top-down: Enfoque de análisis proteómico en el que se omite la digestión con tripsina

Trans-Proteomic Pipeline: Herramienta bioinformática para el procesamiento de espectros e identificación de proteínas

TrEMBL: Base de datos de proteínas

TTC: Cloruro de 2,3,5-trifeniliterazolo

Tween 80: Detergente polisorbato 80

U: Unidad de actividad enzimática

UniProtKB: Base de conocimientos sobre proteínas

WoLF PSORT: Base de datos predictora de localización subcelular de proteínas

X!Tandem: Motor de búsqueda para la identificación de péptidos

Y_{CO₂/S}: Rendimiento de CO₂ producido en función del sustrato consumido

Y_{X/S}: Rendimiento de biomasa producida en función del sustrato consumido

μ_{CO₂}: Tasa específica de producción de CO₂ (h⁻¹)

iv. RESUMEN

El presente proyecto se centró en la caracterización del proteoma de *Aspergillus brasiliensis*, evaluando el efecto del sistema de cultivo y la concentración de sacarosa presente en el medio. El trabajo fue dividido en dos etapas. En la primera etapa se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa en CMS (20 a 210 g/L, utilizando agrolita como soporte) y en CML (20 a 80 g/L) sobre (i) la actividad inulinasa e invertasa y (ii) variables asociadas con el crecimiento de *A. brasiliensis*, estimadas mediante la medición en línea de la producción de CO₂. El análisis de las variables obtenidas reveló menor tiempo de fase *Lag* en CMS comparado con CML y disminución de la tasa específica de producción de CO₂ (μCO_2) en ambos sistemas de cultivo al aumentar la concentración de sacarosa. El valor máximo de la tasa máxima de producción de CO₂ (10.45 ± 0.72 mg/h mL) y producción total de CO₂ (138.53 ± 6.48 mg/mL) se obtuvo en CMS con 210 g/L de sacarosa. La producción de inulinasa e invertasa en CML fue independiente de la concentración inicial de sacarosa (1.13 ± 0.02 y 5.84 ± 0.12 U/mL, respectivamente); mientras que en CMS ambas actividades enzimáticas incrementaron con el aumento en la concentración de sacarosa, alcanzando valores máximos de 5.88 ± 0.78 y 41.69 ± 3.60 U/mL (inulinasa e invertasa, respectivamente), con la concentración más alta de sacarosa (210 g/L). Zimogramas de actividad inulinasa e invertasa desarrollados con extractos enzimáticos obtenidos con 60 g/L de sacarosa en CMS y CML revelaron una banda de inulinasa y dos de invertasa involucradas en la hidrólisis de sacarosa. En la segunda etapa, se obtuvieron los proteomas de *A. brasiliensis* en CMS (sacarosa: 20 a 180 g/L) y CML (sacarosa: 20 a 60 g/L). El proteoma fue más complejo en CMS que en CML. Se identificaron 1471 y 953 proteínas, respectivamente. En CMS, 237 proteínas (88 únicas, 75 abundantes no reguladas y 74 abundantes reguladas) fueron analizadas con concentraciones de sacarosa <60 g/L y 343 proteínas (195 únicas, 98 abundantes no reguladas y 50 abundantes reguladas) fueron analizadas con concentraciones de sacarosa > 60 g/L. En CML, 277 proteínas (128 únicas, 73 abundantes no reguladas y 76 abundantes reguladas) fueron analizadas. El proteoma en CMS fue 3.3 (de 20 a 60 g/L) y 4.8 (de 60 a 180 g/L) veces más abundante que en CML. En CMS hubo presencia de proteínas involucradas en mayor número de procesos que en CML. La cuenta espectral ponderada de las proteínas asociadas con el transporte, sin caracterizar, del metabolismo de nucleótidos y aminoácidos fue tan baja que se puede considerar despreciable en CML. Las proteínas asociadas con el metabolismo de carbohidratos fueron el grupo más abundante en CMS (49.98 y 80.42 cuentas

espectrales/mL con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L, respectivamente). La suma de la cuenta espectral ponderada de todas las proteínas involucradas en este metabolismo fue casi 12 y 19 veces más abundante que en CML, donde ocupó el sexto lugar en términos de abundancia. El grupo de proteínas clasificadas como misceláneas fue el segundo grupo más abundante en CMS (40.89 y 59.66 cuentas espectrales/mL con concentraciones de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L, respectivamente). Este grupo de proteínas en CML ocupó el tercer lugar en términos de abundancia. En el proteoma en CMS y CML se encontraron proteínas involucradas en la degradación de hidrocarburos, biosíntesis de antibióticos y patogenicidad, habiendo mayor variedad de éstas en CMS. En el proteoma en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa, el tercer grupo de proteínas más abundante fue el clasificado como componente/proceso celular (40.44 cuentas espectrales/mL) mientras que con 60 a 180 g/L de sacarosa ocupó el cuarto lugar (41.85 cuentas espectrales/mL). Este grupo de proteínas en CML fue el más abundante (27.77 cuentas espectrales/mL) dando evidencia de que en este sistema de cultivo predominan procesos celulares asociados con la replicación y transcripción de ADN, y la síntesis de pared celular. Por lo tanto, los hallazgos obtenidos en el presente trabajo muestran nuevas evidencias para proponer que en CMS el catabolismo predomina sobre el anabolismo.

v. ABSTRACT

The present work was focused on the characterization of *Aspergillus brasiliensis* proteome, assessing the culture system and sucrose concentration present in the culture medium. The work was parted into two stages. In the first stage, the effect of sucrose concentration under SSF (20 to 210 g/L, using perlite as support) and SmF (20 to 80 g/L) over (i) extracellular inulinase and invertase production and (ii) associated variables with *A. brasiliensis* growth, estimated from online CO₂ production measurement was evaluated. The analysis revealed a lower *Lag* phase in SSF compared to SmF and, decrease in the specific CO₂ production rate (μCO_2) in both systems as the sucrose concentration increased. The highest maximum CO₂ production rate (10.45 ± 0.72 mg/h mL) and total CO₂ production (138.53 ± 6.48 mg/mL) were obtained in SSF with a sucrose concentration of 210 g/L. Inulinase and invertase production in SmF was independent of the initial sucrose concentration (1.13 ± 0.02 and 5.84 ± 0.12 U/mL, respectively); meanwhile in SSF, both activities increased with the increase in the sucrose concentration, reaching maximum values of 5.88 ± 0.78 and 41.69 ± 3.60 U/mL (inulinase and invertase, respectively), at the highest sucrose concentration (210 g/L). The zymographic analysis developed with enzymatic extracts obtained with 60 g/L of sucrose under SSF and SmF showed one band of inulinase and two bands of invertases involved in sucrose hydrolysis. In the second stage, the *A. brasiliensis* proteomes were obtained under SSF (sucrose: 20 to 180 g/L) and SmF (sucrose: 20 to 60 g/L) conditions. The proteome was more complex in SSF than in SmF. A total of 1471 and 953 proteins were identified, respectively. In SSF, 237 proteins (88 unique, 75 abundant unregulated, and 74 abundant regulated) were studied at sucrose concentrations < 60 g/L and 343 proteins (195 unique, 98 abundant unregulated, and 50 abundant regulated) were analyzed at sucrose concentrations > 180 g/L. In SmF, 277 proteins (128 unique, 73 abundant unregulated, and 76 abundant regulated) were examined. The proteome in SSF was 3.3 (from 20 to 60 g/L) and 4.8 (from 60 to 180 g/L) times more abundant than in SmF. In SSF there was the presence of proteins involved in a greater number of processes than in SmF. The weighted spectral count of uncharacterized, transport-associated proteins, of nucleotide and amino acid metabolism was so low that it can be considered negligible in SmF. The associated carbohydrate metabolism proteins were the most abundant group in SSF (49.98 and 80.42 spectral count/mL at sucrose concentrations of 20 to 60 g/L and 60 to 180 g/L, respectively). The sum of the weighted spectral count of all the proteins involved in this metabolism was almost 12 and 19 times more abundant than in SmF, where it ranked sixth in terms of abundance. Proteins classified as miscellaneous were the second most

abundant group in SSF (40.89 and 59.66 spectral count/mL with concentrations of 20 to 60 g/L and 60 to 180 g/L, respectively). This group of proteins in SmF ranked third in terms of abundance. In the proteome in SSF and SmF, proteins involved in hydrocarbon degradation, antibiotic biosynthesis, and pathogenicity were found, with a greater variety of these in CMS. In the proteome in SSF with 20 to 60 g/L of sucrose, the third most abundant group of proteins was classified as cellular component/process (40.44 spectral count/mL), while with 60 to 180 g/L of sucrose, it ranked fourth (41.85 spectral count/mL). This group of proteins in SmF was the most abundant (27.77 spectral count/mL), giving evidence that cellular processes associated with DNA replication and transcription, and cell wall synthesis predominate in this culture system. Therefore, the findings obtained in the present work show new evidence to propose that catabolism predominates over anabolism in SSF.

1. INTRODUCCIÓN

La industria biotecnológica produce una amplia gama de productos; entre los cuales, destacan ácidos orgánicos, antibióticos y enzimas. La mayoría de éstos son producidos en cultivo en medio líquido (CML) (Hansen *et al.*, 2015). En la actualidad, es bien sabido que las enzimas de interés industrial son producidas por diferentes tipos de microorganismos, entre los que destacan los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, levaduras del género *Saccharomyces* y bacterias del género *Bacillus*. Es importante mencionar que en CML, la producción de enzimas se ve afectada negativamente por diferentes factores cuando la concentración de glucosa en el medio es mayor a 10 g/L (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006). Entre estos factores se encuentran: la represión catabólica, el estrés osmótico y la inhibición por sustrato y por producto. Sin embargo, el cultivo en medio sólido (CMS) es una alternativa para la producción de enzimas con hongos filamentosos, ya que se ha demostrado que, bajo este sistema de cultivo se alcanza mayor producción de enzimas con respecto al CML (Guerrero-Urrutia *et al.*, 2021). Algunos autores sugieren que en CMS se alcanzan mejores producciones de enzimas porque se minimiza la represión catabólica debido a la baja humedad, la falta de agitación, adherencia de las células al soporte y por la menor difusión de nutrientes (Aguilar, 1998). Se han realizado numerosos estudios con el propósito de dar explicación a este tipo de fenómenos y sugieren que nuevas proteínas están involucradas en la adaptación fisiológica de los microorganismos a cualquiera de las condiciones mencionadas (Kim *et al.*, 2007a). Dado lo anterior, con el uso de métodos de análisis proteómico se pueden elucidar algunos mecanismos microbianos para adaptar el metabolismo a diferentes condiciones ambientales y a variaciones en la fuente de carbono o de nitrógeno (Kniemeyer, 2011). Por tal motivo, la estrategia del presente trabajo fue caracterizar cultivos de *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 9642) en medios sólido y líquido, evaluando diferentes concentraciones de sacarosa (fuente de carbono inductora de invertasa); esto permitió establecer diferencias entre los sistemas de cultivo con base en la actividad invertasa e inulinasa tomadas como enzimas modelo, por poseer la capacidad de hidrolizar sacarosa. Una vez identificadas las diferencias en el crecimiento y actividad enzimática de *A. brasiliensis* en cada sistema de cultivo, se establecieron las condiciones y tiempo de cultivo para obtener los proteomas de *A. brasiliensis*, los cuales fueron analizados con la finalidad de establecer diferencias entre CMS y CML con un enfoque global y entender las adaptaciones metabólicas del hongo ante los cambios en las condiciones de cultivo.

El presente documento se divide en 9 secciones. La primera es la presente introducción. En la segunda se presenta el marco teórico, que brinda un panorama general de CMS y CML, las aplicaciones y diferencias de ambos sistemas de cultivo, así como una breve descripción de la importancia de hongos del género *Aspergillus* (haciendo énfasis en *Aspergillus brasiliensis*). También, se describe la producción de inulinasa e invertasa (enzimas que hidrolizan inulina y sacarosa) y la identificación de proteínas basada en un enfoque proteómico. La tercera sección presenta los antecedentes directos del trabajo. Posteriormente, se justifica el trabajo y se presentan la hipótesis y los objetivos. La séptima sección contiene la estrategia experimental, seguido de la metodología desarrollada para la obtención de resultados. En la novena sección se presentan y discuten los resultados más relevantes obtenidos al evaluar el efecto de la concentración de sacarosa y el sistema de cultivo sobre la producción de inulinasa e invertasa y el crecimiento de *A. brasiliensis*. A continuación, se describen y discuten los resultados del análisis del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML. Finalmente, se presentan las conclusiones y algunas perspectivas para darle continuidad al estudio.

2. MARCO TEÓRICO

Durante la bioconversión de sustratos complejos por microorganismos se generan productos de interés como enzimas, antibióticos, péptidos y factores de crecimiento. Estos han demostrado gran importancia económica e industrial, principalmente en la industria farmacéutica y de alimentos (Subramaniyam y Vimala, 2012). A nivel industrial, se han desarrollado dos formas de cultivo de microorganismos para la producción de compuestos con valor agregado: el CMS y CML (Pandey, 2003).

2.1. Cultivo en medio sólido (CMS)

El CMS es una forma de cultivar microorganismos sobre un soporte sólido prácticamente en ausencia de agua libre, pero con la suficiente humedad para permitir el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey, 2003). La humedad más baja a la que se puede desarrollar el CMS es aproximadamente del 12% y la más alta varía de acuerdo con la cantidad de líquido que puede absorber el soporte o sustrato sólido; es decir, depende de la naturaleza del soporte/sustrato. Sin embargo se han reportado procesos de CMS donde la humedad es cercana al 80% (Krishna, 2005). Existen dos sistemas de CMS dependiendo de la naturaleza del soporte sólido empleado: el primero y más común es el cultivo de microorganismos sobre residuos agrícolas que funcionan como soporte y fuente de nutrientes y el otro sistema es el cultivo de microorganismos sobre un material inerte que se impregna con el medio de cultivo que proporciona los nutrientes (Ooijkaas *et al.*, 2000).

Recientemente, el CMS se ha evaluado en diferentes centros de investigación alrededor del mundo y se han revelado diferentes ventajas económicas y prácticas sobre el CML (Thomas *et al.*, 2013). Estas ventajas dependen del proceso en particular, por ejemplo, el desarrollo de cultivos en condiciones no asépticas para la producción de esporas, ensilaje o el compostaje; esta ventaja es únicamente aplicable para estos procesos ya que, en contraste con la producción de antibióticos, se requiere de cultivos de microorganismos puros (Ooijkaas *et al.*, 2000). En el caso de la producción de enzimas por CMS, especialmente enzimas hidrolíticas que no requieren pasos de purificación, es decir, no importa su pureza (pueden recuperarse y aplicarse como “cocteles enzimáticos”), surgen ventajas como la disminución de costos en la producción al ahorrarse solventes y procesos posteriores a la recuperación del producto “procesos downstream” (Sato y Sudo, 1999). También, en CMS se ha reportado elevada productividad, rendimiento y concentración de enzimas, mayor estabilidad a la temperatura y pH y menor represión catabólica respecto al CML (Hansen *et al.*, 2015). Por otro lado, emplear

residuos agroindustriales como sustrato, el uso de gran variedad de soportes con diferentes características (composición, tamaño, resistencia mecánica, porosidad, capacidad de retención de agua), menores gastos energéticos, bajo consumo de agua y mínimas descargas de aguas residuales pueden verse como ventajas generales de los procesos de CMS (Krishna, 2005).

Múltiples reportes indican que el CMS ofrece ventajas sobre el CML. Sin embargo, tiene limitaciones que le impiden reemplazar al CML para la producción de compuestos con alto valor agregado. Por mencionar algunas, pueden destacarse problemas de agitación que dan como resultado condiciones heterogéneas en la distribución de nutrientes, dificultad en el control de parámetros (temperatura, pH, humedad y aireación) lo que implica acumulación de calor metabólico y dificultad en la determinación del crecimiento microbiano, etc. (Mitchel *et al.*, 2003).

En los últimos veinte años, el CMS ha adquirido bastante interés, las investigaciones se han centrado en optimizar esta técnica de cultivo en tres parámetros principales: microorganismo, sustrato y condiciones ambientales (Subramaniyam y Vimala, 2012). La elección del microorganismo a utilizar es un paso muy importante ya que se requiere que sea buen productor de enzimas y otros productos. Los microorganismos más empleados son los hongos filamentosos principalmente del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans*) y son considerados adecuados porque las condiciones del medio simulan su hábitat natural (Soccol *et al.*, 2017). Basados en el concepto de actividad de agua (a_w), las levaduras también son empleadas ya que, al igual que los hongos filamentosos, pueden crecer en ambientes con baja a_w . De hecho, levaduras del género *Saccharomyces* ya han sido reportadas para la producción de invertasa en CMS (Rashad y Nooman, 2009). Sin embargo, bacterias del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *Lactobacillus sp.*) han sido reportadas para la producción de enzimas hidrolíticas (amilasas, poligalacturonasas y tanasas) y ácidos orgánicos (ácido láctico) (Rani *et al.*, 2009) bajo condiciones de CMS. Por su parte, los actinomicetos (*Streptomyces sp.*), han sido reportados como productores de antibióticos (estreptomina, tetraciclina y cefamicina) bajo condiciones de CMS (Barrios-González y Mejía, 1996).

Los principales factores que se deben considerar para la elección del sustrato son el costo y la disponibilidad seguidos de otras características como la porosidad, la cristalinidad, el tamaño de partícula, el área de la superficie, etc. (Rani *et al.*, 2009). Los sustratos más importantes para el CMS son los residuos agroindustriales ya que se producen en grandes cantidades, tienen bajo valor comercial y su utilización es limitada (Farinas, 2015). Dentro de

estos sustratos destacan el bagazo de caña de azúcar, cascaras de cereales (salvado de trigo, salvado de arroz, salvado de avena y salvado de soja), pulpa y cascaras de café, pulpa y cascaras de frutas, etc. (Rani *et al.*, 2009). La composición de estos residuos es principalmente celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón y pectina, lo que hace que funcionen no solo como soporte si no como fuente de carbono y nutrientes (Farinas, 2015). Sin embargo, usualmente es necesario suplementar los sustratos con macro y micro nutrientes que son necesarios para un crecimiento óptimo de los microorganismos (Pandey, 2003).

Por otro lado, se vuelve complicado el control de los parámetros ambientales durante el proceso de CMS; primero se debe diseñar el reactor, que debe ser apropiado de modo que permita mantener controladas las condiciones ambientales, las cuales son establecidas y optimizadas dependiendo del proceso, microorganismo y sustrato empleados (Mitchell *et al.*, 2003).

2.2. Cultivo en medio líquido (CML)

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

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

El CML presenta algunas ventajas comparado con el CMS. Sin embargo, también tiene limitaciones y retos que, al ser resueltos, pueden permitir obtener rendimiento y productividad elevados (Hansen *et al.*, 2015). A continuación, se presentan algunos retos, ventajas y desventajas de CML (Krull *et al.*, 2013; Papagianni, 2004; Viniegra-González *et al.*, 2003).

Ventajas:

- Bases tecnológicas bien establecidas para el escalamiento a nivel industrial.

- Alto grado de control de los parámetros de operación (temperatura, pH, agitación, formación de espuma, oxígeno, etc.).

Desventajas:

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

Retos:

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

2.3. Aplicaciones del CMS y CML

El uso de microorganismos para la producción de compuestos con valor agregado por CML se ha incrementado en los últimos 50 años (Papagianni, 2004). El CML es utilizado para la producción de la mayoría de productos comerciales (Tabla 1, Anexo 1) (Sharma *et al.*, 2016). Más del 75% de las enzimas producidas a nivel industrial se obtienen por procesos en CML, y una de las razones es porque el CML permite la utilización de organismos genéticamente modificados en mayor medida que el CMS (Subramaniyam y Vimala, 2012). Los procesos de CMS han sido una práctica con importancia económica desde hace cientos de años. Recientemente, el conocimiento sobre el uso de microorganismos para la obtención de diferentes productos con valor agregado ha sido exitosamente aplicado en diferentes sectores industriales tales como el alimentario, textil y farmacéutico (Farinas, 2015). Dentro de los productos que son obtenidos por CMS a nivel industrial destacan las enzimas, ácidos orgánicos, biopolímeros, biosurfactantes, pigmentos, metabolitos secundarios, biofertilizantes, biopesticidas, sabores y aromas (Thomas *et al.*, 2013).

A nivel comercial, las enzimas son aplicadas en detergentes, procesamiento de pulpa y papel, fabricación de textiles, industria del cuero, producción de fármacos y producción de biocombustibles (Binod *et al.*, 2013), siendo el sector de alimentos y piensos el que mayor ventas anuales tiene, seguido del sector de detergentes (Patel *et al.*, 2017). La mayoría de las investigaciones enfocadas a la producción de enzimas por CMS se centran principalmente en celulasas, xilanasas, proteasas, lacasas, lipasas y amilasas (Tabla 1) (Soccol *et al.*, 2017). Las

celulasas y xilanasas tienen importancia por la conversión de biomasa a etanol y son aplicadas en las industrias textil, de papel y de alimentos y bebidas (Yoon *et al.*, 2014). Las proteasas comprenden el tercer grupo de enzimas más estudiado en la literatura, representan alrededor del 60% del mercado global de enzimas y son aplicadas como aditivo en detergentes, procesamiento de pieles, en la industria alimentaria como ablandadores de carne, en el tratamiento de residuos, etc. (Kumar y Takagi, 1999; Sethi *et al.*, 2016). Las lacasas son un grupo de enzimas con actividad oxidoreductasa que han sido aplicadas principalmente al tratamiento de aguas contaminadas con colorantes (Dhillon *et al.*, 2012). Las lipasas son enzimas cuya principal aplicación es en detergentes, pero recientemente se están empleando en la producción de biodiesel (Ferrarezi *et al.*, 2014). Por su parte, las amilasas constituyen un grupo de enzimas hidrolíticas que representan alrededor del 30% del mercado global y tienen importancia por su utilización en la producción de etanol a partir de residuos de almidón (Singh y Gupta, 2014).

Tabla 1. Producción de enzimas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

Producto ^a	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción		Referencia
				CMS: U/gss	CML: U/mL	
Celulasas (15-90 dólares/Kg)	<i>Aspergillus niger</i> ^b	CMS	Residuos de orujo de uva y salvado de trigo	CMCasa, 668.0		(Papadaki <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Aspergillus niger</i>		Bonote	CMCasa, 9.8		(Mrudula y Murugammal, 2011)
	<i>Aspergillus niger</i>		Paja de trigo	CMCasa, 310.0		(Bansal <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Aceite de tronco de palma	CMCasa, 54.3		(Ang <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Paja de trigo	CMCasa, 1044.0 U/mL		(Saqib <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Trichoderma harzianum</i>		Paja de arroz	CMCasa, 111.3		(Rahnama <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Trichoderma harzianum</i>		Aserrín de pino	CMCasa, 9.1		(Lopez-Ramirez <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Rhizopus oryzae</i> ^b		Hojas de palma	CMCasa, 94.7		(Ezeilo <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Rhizopus oryzae</i>		Salvado de trigo	CMCasa, 452.2		(Pandey y Negi, 2020)
	<i>Neurospora sitophila</i>		Paja de trigo	CMCasa, 30.2		(Li <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ^b		Olote de maíz	CMCasa, 19.5		(Amadi <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Aspergillus niger</i>		Bonote	CMCasa, 3.5		(Mrudula y Murugammal, 2011)
	<i>Aspergillus niger</i> ^b		Cáscara de cacahuete	CMCasa, 87.7		(Sulyman <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Aspergillus awamori</i>		Pulpa de uva y cáscara de naranja	CMCasa, 6.2		(Díaz <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Paja de trigo	CMCasa, 321.0		(Saqib <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Trichoderma gamsii</i> ^b		Celulosa microcristalina	CMCasa, 61.3		(Baskaran y Krishnan, 2020)
	<i>Trichoderma harzianum</i>		Celulignina parcialmente deslignificada	CMCasa, 0.6		(Castro <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Penicillium janthinellum</i>		Paja de trigo	PF, 3.1		(Singhania <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium echinulatum</i> ^c	Celulosa	CMCasa, 37.3		(Reis <i>et al.</i> , 2013)		

a: Costo aproximado en dólares de un Kg de enzima, según Kapoor *et al.* (2016). b: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. c: microorganismo modificado (mutante). CMCasa: actividad celulasa medida con carboximetilcelulosa como sustrato. PF: actividad celulasa medida con papel filtro.

Tabla 1. Producción de enzimas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido (continuación).

Producto ^a	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción		Referencia
				CMS: U/gss	CML: U/mL	
Amilasas (1500-10000 dólares/Kg)	<i>Aspergillus niger</i> ^b	CMS	Residuos de orujo de uva y salvado de trigo	1099.0		(Papadaki <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Aspergillus flavus</i>		Residuos de semillas de <i>Shorea robusta</i>	1.8		(Singh y Gupta, 2014)
	<i>Aspergillus oryzae</i> ^b		Cáscara de soja y residuos de molino de harina	47000.0		(Melnichuk <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>		Salvado de trigo	358.0		(Barros Ranke <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Rhizopus oligosporus</i> ^b		Salvado de trigo	367.6		(Escaramboni <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ^b		Residuos de cocina	833.0		(Bhatt <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Bacillus subtilis</i>		Salvado de trigo adicionado con almidón soluble	126.2		(Pranay <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Bacillus subtilis</i> ^b		Salvado de trigo	1239.0		(Almanaa <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Bacillus</i> sp.		Salvado de trigo	140.0		(Hashemi <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Aspergillus flavus</i> ^b		Residuos de semillas de <i>Shorea robusta</i>	26.4		(Singh y Gupta, 2014)
	<i>Bacillus</i> sp.		Dextrina	3.8		(Hashemi <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Bacillus tequilensis</i> ^b	CML	Salvado de arroz	39.7		(Paul <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Bacillus velezensis</i>		Almidón	2.8		(Bhatt <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Bacillus cereus</i>		Almidón	1.9		(Priyadarshini <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus</i> sp. ^b		Almidón	400.0		(Kokila y Mrudula, 2010)	

a: Costo aproximado en dólares de un Kg de enzima, según Kapoor *et al.* (2016). b: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. c: microorganismo modificado (mutante).

Tabla 1. Producción de enzimas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido (continuación).

Producto ^a	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción		Referencia
				CMS: U/gss	CML: U/mL	
Xilanasas (10-80 dólares/Kg)	<i>Aspergillus niger</i> ^b		Cáscara de arroz	7.0 U/mL		(Razali <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Aspergillus niger</i>		Bagazo de caña de azúcar	1400.8		(Moran-Aguilar <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Aspergillus niger</i> ^b		Residuos de orujo de uva y salvado de trigo	579.0		(Papadaki <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Aspergillus awamori</i>		Cáscara de naranja	43.7		(Díaz <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Aceite de tronco de palma	418.7		(Ang <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	CMS	Aserrín de pino	109.3		(Lopez-Ramirez <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Trichoderma harzianum</i> ^b		Desechos de melón y sandía	80.0		(Mohamed <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Trichoderma harzianum</i>		Paja de arroz	433.8		(Rahnama <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Rhizopus oryzae</i> ^b		Hojas de palma	214.0		(Ezeilo <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		Polvo de rastrojo de maíz	28.0		(Liu <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ^b		Olote de maíz	56.9		(Amadi <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Aspergillus niger</i> ^c		Olote de maíz	9.4		(Ire <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Aspergillus nidulans</i> ^c		Glucosa	1250.0		(Abdella <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Trichoderma reesei</i>		Bagazo de caña de azúcar	93.1		(Silva <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Trichoderma gamsii</i> ^b	CML	Celulosa microcristalina	681.0		(Baskaran y Krishnan, 2020)
	<i>Penicillium echinulatum</i> ^c		Celulosa	177.0		(Reis <i>et al.</i> , 2013)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		Polvo de rastrojo de maíz	0.14		(Liu <i>et al.</i> , 2020)	
<i>Bacillus licheniformis</i> ^b		Salvado de trigo	5.5		(Limkar <i>et al.</i> , 2019)	

a: Costo aproximado en dólares de un Kg de enzima, según Kapoor *et al.* (2016). b: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. c: microorganismo modificado (mutante).

Tabla 1. Producción de enzimas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido (continuación).

Producto ^a	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción		Referencia	
				CMS: U/gss	CML: U/mL		
Lipasas	<i>Aspergillus niger</i>		Harina de soja		Hidrólisis: 163.3	(Prabaningtyas <i>et al.</i> , 2018)	
	<i>Aspergillus niger</i> ^b		Mezcla de mezquite, cáscara de gramo rojo y residuos semilla de algodón procesada		Hidrólisis: 269.9	(Mandari <i>et al.</i> , 2020)	
	<i>Rhizopus microsporus</i> ^b	CMS	Salvado de trigo y bagazo de caña de azúcar		Hidrólisis: 264.0 Esterificación: 13.3	(Pitol <i>et al.</i> , 2017)	
	<i>Penicillium roqueforti</i> ^b		Cáscara de cacao		Hidrólisis: 48.0	(Sales de Menezes <i>et al.</i> , 2021)	
	<i>Fusarium</i> sp.		Residuos de crambe procesado		Hidrólisis: 74.0	(Oliveira <i>et al.</i> , 2020)	
	<i>Yarrowia lipolytica</i>		Cáscara de soja		Hidrólisis: 32	(Nascimento <i>et al.</i> , 2021)	
	<i>Aspergillus</i> sp.		Aceite de semilla de soja		Hidrólisis: 17.9	(Tacin <i>et al.</i> , 2019)	
	<i>Fusarium</i> sp.		Aceite de crambe		Hidrólisis: 2.9	(Oliveira <i>et al.</i> , 2020)	
	<i>Pichia pastoris</i> ^c		Glicerol		Hidrólisis: 6570.7	(Zheng <i>et al.</i> , 2019)	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^b	CML	Suero de queso		Hidrólisis: 285.8	(Knob <i>et al.</i> , 2020)	
	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> ^b		Aceite de oliva		Hidrólisis: 416.0	(Phukon <i>et al.</i> , 2020)	
	<i>Streptomyces</i> sp.		Fructosa		Hidrólisis: 162.0	(Al-Dhabi <i>et al.</i> , 2020)	
	Lacasas (1-99 dólares/Kg)	<i>Pycnoporus sanguineus</i>		Bagazo de caña de azúcar		22.0	(Pereira Scarpa <i>et al.</i> , 2019)
		<i>Tricholoma giganteum</i> ^b		Paja de trigo		269000.0	(Patel y Gupte, 2016)
		<i>Bacillus</i> sp. ^b	CMS	Residuos de jugo de fruta		1645.0	(Sondhi y Saini, 2019)
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>			Salvado de trigo		7.0 U/mL	(Neifar <i>et al.</i> , 2016)	
<i>Trametes pubescens</i>		CMLSSS	Cáscara de café		0.2	(Gonzalez <i>et al.</i> , 2013)	
<i>Aspergillus</i> sp. Omeje			Cáscara de cacahuete		0.9	(Omeje <i>et al.</i> , 2020)	
<i>Trametes pubescens</i>			Cáscara de café		0.2	(Gonzalez <i>et al.</i> , 2013)	
<i>Myrothecium verrucaria</i> ^b		CML	Glucosa		1.3	(Agrawal <i>et al.</i> , 2019)	
<i>Arthrospira máxima</i> ^b		Sacarosa y guayacol		54.7	(Afreeen <i>et al.</i> , 2018)		

a: Costo aproximado en dólares de un Kg de enzima, según Kapoor *et al.* (2016). b: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. c: microorganismo modificado (mutante).

Tabla 1. Producción de enzimas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido (continuación).

Producto ^a	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción		Referencia
				CMS: U/gss	CML: U/mL	
Proteasas (13-30 dólares/Kg)	<i>Aspergillus niger</i> ^b	CMS	Residuos de orujo de uva y salvado de trigo	Proteasa ácida: 204.0		(Papadaki <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Aspergillus awamori</i>		Salvado de trigo	Proteasa ácida: 798.6		(Negi, Gupta and Banerjee, 2011)
	<i>Aspergillus terreus</i> ^b		Cáscara de arveja	5266.8		(Sethi <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Neurospora crassa</i>		Pulpa de soja	Proteasa alcalina: 1959.8		(Zheng <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Yarrowia lipolytica</i>		Cáscaras de soja suplementadas con medio YPD	0.1 U/mL		(do Nascimento <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Bacillus halodurans</i> ^b		Salvado de trigo	397.1 U/mL		(Balachandran <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Aspergillus niger</i>	CML	Bagazo de caña de azúcar	0.002		(De Castro <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Aspergillus niger</i> ^b		Grano de trigo descascarado	Proteasa ácida: 183.1		(Siala <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Aspergillus terreus</i> ^b		Cáscara de arveja	Proteasa ácida: 500.0		(Sethi <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ^b		Glucosa	422.8		(Lario <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Streptomyces sp.</i>		Maltosa	218.0		(Al-Dhabi <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Bacillus spp</i> ^b		Salvado de trigo	Proteasa alcalina: 3.7		(Limkar, Pawar and Rathod, 2019)
	<i>Bacillus subtilis</i>		Galactosa	243.3		(Pant <i>et al.</i> , 2015)

a: Costo aproximado en dólares de un Kg de enzima, según Kapoor *et al.* (2016). b: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. c: microorganismo modificado (mutante).

2.4. Comparación de CMS y CML

Actualmente, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, vitaminas, antibióticos, solventes y combustibles son obtenidos a través del cultivo de microorganismos (Tabla 1, Anexo 1). Algunas de las razones para la obtención de productos mediante el cultivo de microorganismos son porque se trata de moléculas complejas y costosas para producirlas por métodos químicos. En las fermentaciones se utilizan principalmente recursos renovables, las condiciones de reacción durante la fermentación son moderadas y los subproductos generados son amigables con el medio ambiente (Anderson, 2009). A nivel de investigación, el CMS y el CML se han modificado y refinado en diferentes parámetros (sustrato, condiciones ambientales y microorganismo) con la finalidad de maximizar la productividad de metabolitos y enzimas (Subramaniyam y Vimala, 2012). Aunque el CML es principalmente empleado a nivel industrial para la producción de enzimas, el CMS ha adquirido importancia para pocas aplicaciones e industrias específicas (Singhania *et al.*, 2015). A escala laboratorio se ha demostrado mayor producción de enzimas y mayor velocidad de crecimiento en CMS comparado con CML (Romero-Gómez *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2018), lo cual es atribuido principalmente a una alta transferencia de oxígeno hacia las células, baja inhibición por sustrato y nula represión catabólica en condiciones de CMS (Guerrero-Urrutia *et al.*, 2021). Además, el efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la actividad enzimática es diferente para las enzimas producidas en CMS o CML (Graminha *et al.*, 2008). El CMS y el CML por sí mismos son diferentes, lo cual hace difícil su comparación (Hölker y Lenz, 2005). Entre las ventajas del primer sistema sobre el segundo, destacan que en CMS se emplean sustratos poco costosos (residuos agroindustriales) que pueden utilizarse por sí mismos como soporte y fuente de carbono, el producto de interés no se diluye (lo cual facilita su posterior purificación), el inóculo es más grande que en CML y el contenido de humedad es relativamente bajo (disminuye el riesgo de contaminación microbiana), la cantidad de efluentes generados es menor y las enzimas presentan nula o muy baja represión catabólica (Ramos y Malcata, 2011). No obstante, el CMS al ser un sistema complejo y difícil de caracterizar presenta dificultad para el control adecuado de parámetros de proceso (pH, humedad, remoción de calor metabólico), dificultades para el escalamiento, para la purificación de productos y determinación de biomasa (Rani *et al.*, 2009). En la Tabla 2 se presentan las principales diferencias entre CMS y CML.

Tabla 2. Comparación entre el CMS y CML (Raimbault, 1998; Krishna, 2005).

Comparación	CMS	CML
Microorganismo	Principalmente hongos filamentosos, dependiendo del proceso bacteria y levaduras o un consorcio microbiano	Hongos filamentosos, levaduras y bacterias
Sustrato	Azúcares complejos insolubles (residuos agrícolas)	Azúcares simples (solubles)
Agua	Menor volumen (baja humedad y a_w)	Elevado consumo
Asepsia	Tratamiento con vapor, sin condiciones estériles	Esterilización por calentamiento y condiciones asépticas
Morfología	Micelio	Pellets
Inóculo	Suspensión de esporas o micelio (procesos en lote)	Suspensión de esporas (procesos continuos)
Temperatura	Difícil control (acumulación de calor metabólico)	Fácil control
pH	Difícil control durante el proceso	Fácil control
Aireación	Fácil aireación, alto intercambio en la superficie aire-sustrato	Dependiente de la solubilidad del oxígeno (elevados volúmenes de aire son requeridos)
Agitación	Inadecuada porque puede dañar a los microorganismos	Buena en términos de homogenización
Espuma	No se genera espuma	Uso de antiespumantes
Contaminación	Riesgo de contaminación por lento crecimiento de los hongos	Riesgos de contaminación por bacterias
Escalamiento	Necesidad de diseño de equipos (pocos equipos disponibles y diseñados para producciones específicas)	Disponibilidad de equipos a nivel industrial
Gasto energético	Bajo gasto energético	Alto gasto energético
Volumen y costo de equipos	Disponibilidad en bajos volúmenes y menor costo de equipo	Disponibilidad en grandes volúmenes y elevado costo de equipo

2.5. Importancia del género *Aspergillus*

Aspergillus es un género de hongos filamentosos ampliamente distribuido alrededor del mundo, comprende un grupo muy importante de ascomicetos e incluye especies con importancia a nivel industrial y otras patógenas que inciden en la salud humana (Ward *et al.*, 2006). El género *Aspergillus* comprende hasta 837 especies (Krijghsheld *et al.*, 2013), de las cuales más de 350 son conocidas y presentan variación en su estilo de vida (hábitat y patogenicidad) y propiedades metabólicas (Brandl y Andersen, 2017).

Aspergillus nidulans fue el primer hongo del género *Aspergillus* estudiado para la producción de proteínas heterólogas en los años 1940s (Ward *et al.*, 2006) Es considerado uno de los más importantes organismos eucariotas modelo en genética y tiene un rol central en el estudio genético del desarrollo celular sexual y asexual, regulación génica mediada por el pH, metabolismo del nitrógeno y regulación génica mediada por nitrógeno y fuente de carbono (Baker y Bennett, 2008). A pesar de ser empleados como organismos modelo, gran variedad de *Aspergillus* son patógenos oportunistas de animales y humanos (Krijghsheld *et al.* 2013). *Aspergillus fumigatus* es la causa infecciosa más común de mortalidad humana y junto con *A. terreus*, han surgido como patógenos humanos importantes que causan aspergilosis invasiva (Ward *et al.*, 2006), principalmente en individuos cuyo sistema inmune está comprometido (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2014). No obstante, *A. terreus*, es una especie estudiada para la producción de estatinas, entre ellas la lovastatina que ayuda a disminuir los niveles de colesterol en la sangre (Barrios-González y Tarragó-Castellanos, 2017). Especies del género *Aspergillus* son productoras de micotoxinas, las cuales tienen gran impacto agrícola, epidemiológico y económico (Palumbo *et al.*, 2008). Especies de la sección *Flavi* producen aflatoxinas, dentro de las cuales la aflatoxina B₁ es el metabolito secundario más tóxico producido por hongos, siendo *A. flavus* junto con *A. parasiticus* los principales productores (Varga *et al.*, 2011). Otros *Aspergillus* de la sección *Circumdati* (*A. steynii* y *A. westerdijkiae*) y de la sección *Nigri* (*A. carbonarius*) son productores de ocratoxina A, una micotoxina teratogénica, carcinogénica, inmunosupresora y nefrotóxica en animales (Pfliegler *et al.*, 2020). *Aspergillus carbonarius* es una de las principales especies responsables de la producción de ocratoxina A (Reinis *et al.*, 2014) que contamina productos derivados de uvas, café y cacao (Samson *et al.*, 2007). Otras especies de *Aspergillus* también pueden ocasionar problemas al crecer en construcciones y dañar materiales (Frisvad y Larsen, 2015). Mientras que *A. niger* y *A. oryzae*, al ser microorganismos reconocidos como seguros (Brandl y Andersen, 2017) y al

tener la capacidad de secretar grandes cantidades de enzimas y otros metabolitos (ácidos orgánicos), son utilizados a nivel industrial junto con *A. awamori*, *A. sojae* y *A. terreus* para la producción de proteínas homólogas y heterólogas así como de diferentes metabolitos (Meyer *et al.*, 2011). *Aspergillus oryzae* es un microorganismo con elevada capacidad de secreción de proteínas, además de ser importante para la elaboración de alimentos fermentados y bebidas en Japón (Machida *et al.*, 2005). Este hongo ha sido utilizado en diferentes procesos alimenticios, como en la fermentación de soja para producir salsa de soja “shoyu” y un condimento llamado “miso” y en la fermentación de arroz para producir la bebida llamada “sake” (Gugnani, 2003). Por su parte, *A. niger* es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial por CML alcanzando niveles de producción mayores a 200 g/L empleando cepas sobre productoras (Reyes-Ocampo *et al.*, 2013; Steiger *et al.*, 2019). *Aspergillus niger* ha sido utilizado desde 1923 en la producción a nivel industrial de ácido cítrico; sin embargo, fue hasta 1960 que se empleó para la producción de α -amilasa, celulasas y pectinasas (Nielsen *et al.*, 2009). También es empleado para la producción de ácido glucurónico utilizando licor de maíz fermentado suplementado con glucosa (Gugnani, 2003), además de ácido glucónico y fumárico, que son ácidos de menor importancia económica que el ácido cítrico (Baker y Bennett, 2008). Algunas de las enzimas más importantes de *A. niger* son la glucosa oxidasa, que es empleada para la cuantificación de glucosa en sangre (Brandl y Andersen, 2017). Las amilasas son empleadas para la hidrólisis de almidón durante la elaboración de pan y cerveza, la invertasa es utilizada en la fabricación de dulces, las pectinasas son utilizadas para eliminar la turbidez de jugos de frutas y vinos, las proteasas como ablandadores de carne (Baker y Bennett, 2008). Al ser un microorganismo con metabolismo muy versátil, en 2007 fue publicada la secuencia del genoma de la cepa *A. niger* CBS 513.88, ancestro de las cepas actuales destinadas a la producción de enzimas (Pel *et al.*, 2007). Esta cepa fue derivada de la cepa *A. niger* NRRL 3122, la cual fue desarrollada para la producción de glucoamilasa A (Andersen *et al.*, 2011). El genoma de *A. niger* CBS 513.88 consta de 33.9 millones de pares de bases. Mediante análisis bioinformáticos se predijo la presencia de 14,165 genes codificantes de proteínas de las cuales, se le pudo asignar función asociada al metabolismo, transporte celular y destino a 6505 proteínas (Pel *et al.*, 2007).

A pesar de su importancia industrial, los *Aspergillus* de la sección *Nigri* son uno de los grupos más difíciles de identificar y clasificar (Samson *et al.*, 2007). Su taxonomía no es clara, lo cual ha provocado el intento por ordenarlos bajo criterios taxonómicos adecuados

(Abarca *et al.*, 2004). En el mismo año que se publicó la secuencia del genoma de *A. niger* CBS 513.88, se realizaron estudios fenotípicos y genotípicos a una cepa aislada en Brasil, Australia y EUA. Dicha cepa era nombrada *A. niger* ATCC 9642; sin embargo, se encontraron diferencias en la morfología de sus conidios los cuales resultaron ser equinulados y diferentes a los de *A. niger* (Varga *et al.*, 2007). Además, al comparar las regiones ITS (*Internal Transcribed spacer*) de este hongo con *A. niger*, se encontraron diferencias en cinco posiciones de la secuencia (diferencia del 1%) y por este motivo fue reclasificada y nombrada *A. brasiliensis* ATCC 9642 (Houseknecht *et al.*, 2008). También, al analizar el perfil de crecimiento entre hongos de la sección *Nigri*, se observó que *A. brasiliensis* es el único hongo capaz de crecer con D-galactosa como fuente de carbono (Meijer *et al.*, 2011). Las normas de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (del inglés ASTM) utilizan a *A. brasiliensis* como referencia en pruebas para la biodegradación de plásticos, y pruebas para la resistencia de diversos materiales al crecimiento de hongos, por ejemplo, la norma ASTM D3273 “Método de prueba estándar para la resistencia al crecimiento de moho en la superficie de revestimientos interiores en una cámara ambiental” (American Society for Testing and Materials. 2012). Se ha usado también para la producción de xilanas, β -xilosidasa termoestable y poligalacturonasa (Pedersen *et al.*, 2007; Pili *et al.*, 2015). Estudios recientes han demostrado que *A. brasiliensis* produce gran variedad de enzimas extracelulares tanto en SSF como en SmF (Salgado-Bautista *et al.*, 2020) y que además tiene potencial para la biorremediación. Por ejemplo en estudios sobre la biodegradación de hexadecano mostraron alta velocidad de consumo y eficiencia de biodegradación de hexadecano en CMS (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003, 2006).

2.6. Importancia de las inulinasas e invertasas

Entre las enzimas producidas en la industria biotecnológica, destacan las inulinasas y las invertasas. Estas enzimas participan en la hidrólisis de inulina y sacarosa teniendo las inulinasas mayor especificidad por la inulina que las invertasas (Dinarvand *et al.*, 2017). La inulina es un carbohidrato de reserva que consiste de cadenas lineales de 2 a 140 monómeros de fructosa terminados con un enlace a glucosa (Figura 1) (Das *et al.*, 2019). La inulina se almacena en raíces y tubérculos de algunas plantas tales como alcachofa de jerusalén, achicoria, dalia, diente de león y bardana (Singh *et al.*, 2020). Este biopolímero es utilizado para producir jarabes ricos en fructosa, que son benéficos para personas diabéticas ya que son más dulces que la sacarosa, pero contienen menos calorías (Singh *et al.*, 2007), y fructooligosacáridos que actúan como prebióticos, ayudan a reducir niveles

de azúcar en sangre y contribuyen al control del contenido de lípidos en sangre y enfermedades cardiovasculares (Jiang *et al.*, 2019).

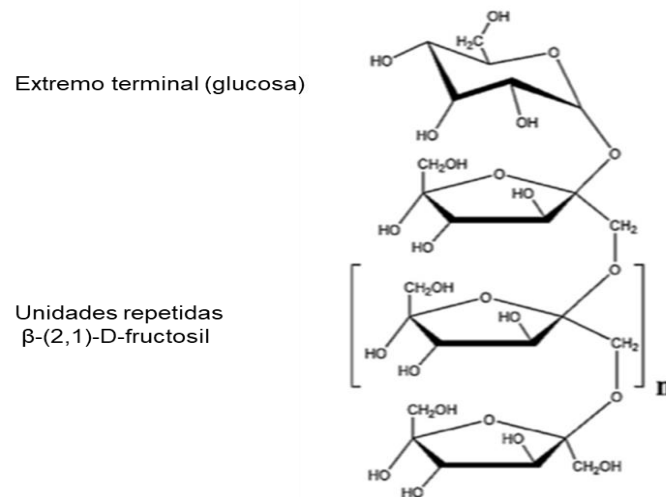


Figura 1. Estructura lineal de la inulina (imagen modificada de Singh y Singh, (2017)).

Los métodos enzimáticos para la hidrólisis de inulina son preferidos sobre la hidrólisis ácida debido a que ésta puede provocar la degradación de la fructosa dando como resultado productos indeseables tales como di-fructosa anhidra (Singh *et al.*, 2017). De acuerdo con el mecanismo de hidrólisis (Figura 2), las inulinasas son clasificadas como endoinulinasas (EC 3.2.1.7) y exoinulinasas (EC 3.2.1.8). Las endoinulinasas hidrolizan al azar enlaces internos β -2,1 y producen fructooligosacáridos y las exoinulinasas actúan en la unidad de fructosa terminal produciendo fructosa como principal producto (Das *et al.*, 2019). En contraste, las invertasas (EC 3.2.1.26) hidrolizan los enlaces entre fructosa y glucosa (Nadeem *et al.*, 2015).

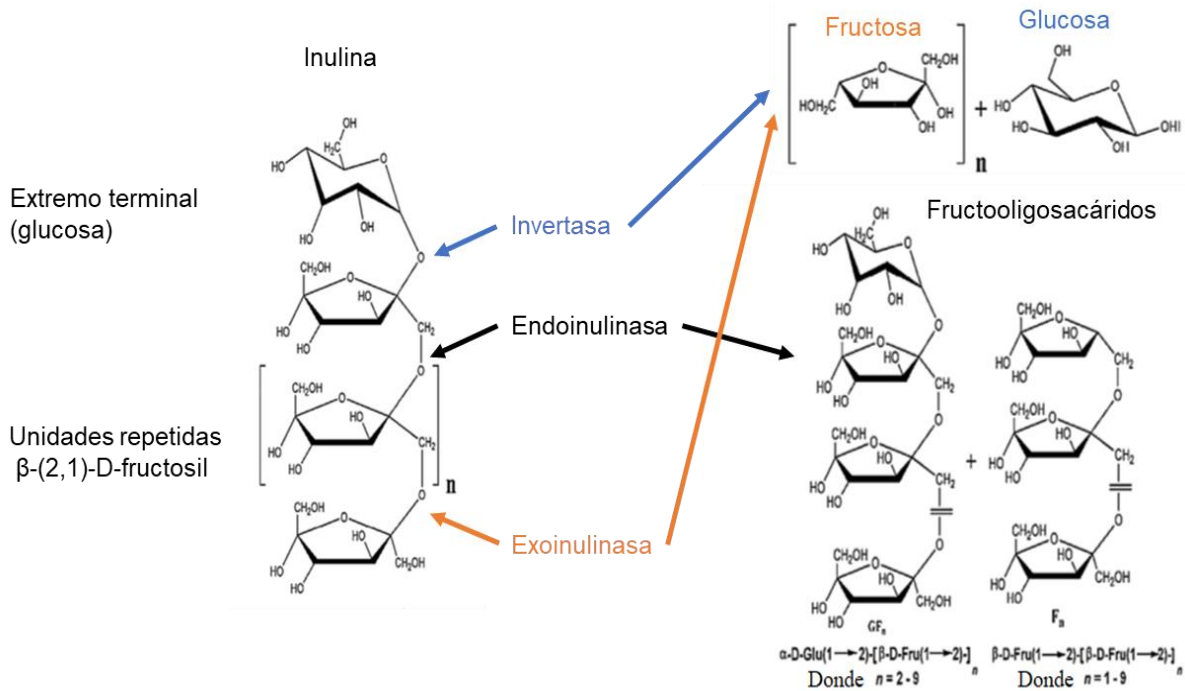


Figura 2. Mecanismo de acción de inulinasas e invertasa y productos de hidrólisis de inulina (imagen modificada de Singh y Singh, (2017)).

El rendimiento, localización y modo de acción de las enzimas dependen del tipo de microorganismo, sustrato, composición del medio y condiciones de cultivo en las que son producidas (Tabla 3) (Dinarvand *et al.*, 2013). Diferentes estudios han mostrado que la producción de invertasa usando sacarosa como sustrato en CML alcanza valores comprendidos entre 0.35 y 107.41 U/mL y 2.4 a 34 U/mL cuando es producida por *S. cerevisiae* y *A. niger*, respectivamente (Nadeem *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando la inulina es utilizada como inductor y fuente de carbono en condiciones de CML, la producción de invertasa por *Emericella nidulans* es al menos tres veces mayor (28.6 U/mL) que cuando es obtenida con sacarosa (Alves *et al.*, 2013). Además, el uso de inulina como inductor resultó en 2.1 y 3.7 veces mayor actividad inulinasa que invertasa con *A. ficuum* (Jing *et al.*, 2003) y *K. marxianus* (Singh *et al.*, 2007), respectivamente. Se ha reportado que las inulinasas microbianas tienen actividad invertasa debido a la especificidad de sus sitios activos por inulina y sacarosa (Singh *et al.*, 2018).

Tabla 3. Producción de inulinasa e invertasa por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

Microorganismo	Sustrato	Inulinasa	Invertasa	I/S ^a	Referencia
Cultivo en medio sólido ^b					
<i>A. tamarii</i>	Tubérculos de <i>Helianthus tuberosus</i>	26.78	6.33	4.23	Abd Allah AbdAl-Aziz <i>et al.</i> , 2012
<i>P. oxalicum</i>	Orujo de zanahoria con inulina	322.10 U/g	95.30	3.38	Singh <i>et al.</i> , 2018
<i>A. flavus var. flavus</i>	Caña de azúcar resistente	3.48	1.36	2.56	Das <i>et al.</i> , 2019b
<i>A. tubingensis</i>	Salvado de trigo	257.00	1358.60	0.18	Trivedi <i>et al.</i> , 2012
<i>A. brasiliensis</i>	Sacarosa	5.39	34.74	0.16	Este trabajo
Cultivo en medio líquido ^c					
<i>P. oxalicum</i>	Lactosa con-inulina	11.06	4.19	2.64	Singh y Chauhan, 2017
<i>A. ficuum</i>	Lactosa	3.22	1.30	2.47	Jing <i>et al.</i> , 2003
<i>A. niger</i>	Inulina	1664.00	1052.00	1.58	Dinarvand <i>et al.</i> , 2013
<i>A. ficuum</i>	Fructosa	4.52	3.31	1.37	Jing <i>et al.</i> , 2003
<i>A. niger</i>	Sacarosa	2553.00	1983.00	1.29	Dinarvand <i>et al.</i> , 2013
<i>A. ficuum</i>	Sacarosa	5.21	4.07	1.28	Jing <i>et al.</i> , 2003
<i>A. niger</i>	Melaza de remolacha azucarera	1011.02	834.28	1.22	Germec <i>et al.</i> , 2020
<i>A. ficuum</i>	Inulina	11.02	9.63	1.14	Jing <i>et al.</i> , 2003
<i>A. tamarii</i>	Inulina	21.53	20.10	1.07	Abd Allah AbdAl-Aziz <i>et al.</i> , 2012
<i>P. citrinum</i>	Inulina	20.15	19.10	1.05	Abd Allah AbdAl-Aziz <i>et al.</i> , 2012
<i>A. brasiliensis</i>	Sacarosa	1.13	5.84	0.19	Este trabajo
<i>A. tubingensis</i>	Sacarosa	12.10	146.20	0.18	Trivedi <i>et al.</i> , 2012
<i>A. tubingensis</i>	Inulina	18.90	67.20	0.12	Trivedi <i>et al.</i> , 2012
<i>K. marxianus</i>	Sacarosa/Inulina	NR	NR	0.07	Rouwenhorst <i>et al.</i> , 1988

a: Relación de actividad inulinasa/invertasa (I/S). b: Resultados de actividad enzimática en CMS reportados en unidades por gramo de soporte seco (U/gss). c: Resultados de actividad enzimática en CML reportados en unidades por mL (U/mL). NR: No reportado.

Para determinar la predominancia de una actividad sobre la otra, se utiliza la relación inulinasa/invertasa (I/S). Es aceptado que valores de I/S mayores a 0.01 indican

predominancia de actividad inulinasa (Das *et al.*, 2019). Entre hongos y levaduras, varias especies de *Aspergillus* y *Kluyveromyces* son consideradas como la mejor elección para la producción de inulinasa ya que producen una amplia variedad de isoformas extracelulares de exo y endoinulinasas con elevada actividad enzimática (Jing *et al.*, 2003; Singh y Gill, 2006). Las inulinasas son bien conocidas por tener elevados rendimientos (>95%) de hidrólisis de inulina (Singh *et al.*, 2017). Adicionalmente, las inulinasas producidas por *Aspergillus* son más termoestables que las obtenidas con levaduras (Singh y Gill, 2006). Aunque el CML se utiliza generalmente para la producción industrial de invertasa e inulinasas, la producción industrial de enzimas por CMS tiene un gran potencial para tal propósito debido a la alta productividad enzimática y los bajos costos de producción (Al-Dabbagh y Mahmood, 2015). Está comprobado que bajo condiciones de CMS es posible alcanzar elevada producción de inulinasa por cepas de *A. niger* (300 U/mL), *P. citrinum* (120 U/mL) y *T. viride* (180 U/mL) (Housseiny, 2014). El CMS también permite el uso de altas concentraciones de sustrato con poca o nula represión catabólica. Además, diferentes residuos agroindustriales de escaso valor comercial pueden emplearse como soportes sólidos (Singh *et al.*, 2018). Por ejemplo, la producción de inulinasa por *A. tubingensis* utilizando polvo de raíz de achicoria como sustrato, fue 2.1 veces mayor en CMS que la obtenida por CML, alcanzando hasta 46.7 U/mL en condiciones de CML (Trivedi *et al.*, 2012). Del mismo modo, la productividad de invertasa producida por *A. niger* en CMS (0.09 U/mL h) fue 4.35 veces mayor que la obtenida en CML (Romero-Gómez *et al.*, 2000). La producción de inulinasa o invertasa utilizando medios de cultivo complejos en CMS y CML ha sido ampliamente evaluada. Sin embargo, solo hay una publicación donde se compara la producción de inulinasa e invertasa en ambos sistemas de cultivo, utilizando diferentes medios de cultivo en cada sistema, haciendo difícil la comparación entre CMS y CML (Trivedi *et al.*, 2012).

2.7. Aplicaciones de la proteómica en hongos filamentosos

Las proteínas son de gran importancia, ya que son los principales efectores en todos los procesos celulares (Freson, 2019); de este modo, para integrar la información del genoma con posibles fenotipos y comprender la forma en la que trabaja un sistema vivo implica tener un amplio conocimiento de todo el conjunto proteico del organismo (Oliveira y Graaff, 2011). El conjunto de proteínas codificadas por el genoma de un organismo en un momento dado y a lo largo de la vida del mismo, recibe el nombre de “proteoma” (Senzel *et al.*, 2009), término que fue empleado por vez primera en 1994 por Mark Wilkins y que deriva de las palabras proteína y genoma (Mishra, 2010). Para ocuparse del estudio global de los perfiles

de expresión y de modificaciones postraduccionales de las proteínas, de su abundancia relativa, de la expresión diferencial de enzimas, así como de las interacciones entre proteínas surge la “proteómica” (Mishra, 2010; Pomastowski y Buszewski, 2014), que es una disciplina que implica la aplicación de varias técnicas para visualizar, cuantificar e identificar proteínas (Senzel *et al.*, 2009). Los estudios de proteómica de hongos filamentosos son relativamente recientes a pesar de su rol tan importante en la salud y en procesos industriales (Kim *et al.*, 2007b). Los hongos tienen una gran capacidad para crecer en medios con diferentes fuentes de carbono; además, tienen la habilidad para percibir el ambiente en el que se encuentran y producir y secretar enzimas a la región extracelular (Aro *et al.*, 2005). Por lo que es de interés conocer a fondo el patrón del ciclo de vida de los hongos para poder desarrollar diferentes métodos que permitan comprender mejor las consecuencias clínicas de las infecciones fúngicas oportunistas y que permitan aprovechar las cualidades de los hongos mediante el estudio y aprovechamiento de sus enzimas (Doyle, 2011; Sharma *et al.*, 2017).

Con la secuenciación de los genomas de diferentes hongos filamentosos y la disponibilidad de tecnologías de proteómica potentes (LC-MS/MS) se incrementó la posibilidad de predecir funciones de proteínas codificadas por el genoma, ya sean enzimas hidrolíticas o proteínas que participan en la biosíntesis de metabolitos (Doyle, 2011; Oliveira y Graaff, 2011). Como muchas proteínas están asociadas con procesos que se llevan a cabo dentro de la célula, resulta útil subdividir el proteoma analizando por ejemplo proteínas asociadas con la secreción y secretadas (secretoma), proteínas intracelulares y asociadas a la mitocondria o proteínas de envoltura celular (Kim *et al.*, 2007b). Fue a partir del año 2000 que los trabajos sobre proteómica de hongos filamentosos incrementaron (Sharma *et al.*, 2017). Uno de los primeros estudios en la era post genómica reportó 220 proteínas identificadas asociadas a la envoltura celular de *T. reesei* de las cuales la mayoría de proteínas fueron nuevas (Lim *et al.*, 2001). Los primeros estudios de *Aspergillus* comenzaron a aparecer a partir del año 2002. El análisis del proteoma de *A. nidulans* reveló el cambio en la expresión de 20 proteínas debido al tratamiento de *A. nidulans* con concanamicina A (Melin *et al.*, 2002). Posteriormente, se demostró que el crecimiento de *A. nidulans* es inhibido al ser cultivado junto a *Lactobacillus plantarum* (microorganismo productor de metabolitos antifúngicos) y en consecuencia de ello la expresión de proteínas fúngicas fue alterada (Ström *et al.*, 2005). El siguiente proteoma de *Aspergillus* en ser caracterizado fue el de *A. fumigatus*, posiblemente por ser patógeno en humanos (Kim *et*

al., 2007b). *A. fumigatus* fue cultivado con dos fuentes de carbono (glucosa y etanol), con el análisis proteómico se demostró que el crecimiento en etanol permite la activación del ciclo del glioxilato (esencial para procesos de patogénesis en hongos y bacterias) además de que enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ciclo del glioxilato, gluconeogénesis y asociadas con la utilización del etanol fueron sobre reguladas (Kniemeyer *et al.*, 2006). En este mismo año, se comparó por primera vez el CMS y el CML con un enfoque proteómico (Oda *et al.*, 2006). Estos autores estudiaron el secretoma de *A. oryzae* y encontraron que los mecanismos de secreción y expresión de proteínas difieren en cada sistema de cultivo. Más recientemente, se ha investigado la naturaleza dinámica de los proteomas fúngicos bajo diferentes condiciones de cultivo (Doyle, 2011). En especial, especies del género *Aspergillus* se han estudiado bajo un enfoque proteómico con la finalidad de descubrir nuevas enzimas con mejor actividad, estabilidad o afinidad (Kniemeyer, 2011). En la Tabla 4 se enlistan algunos de los trabajos recientes con hongos del género *Aspergillus* basados en un enfoque proteómico.

Tabla 4. Reportes de análisis proteómicos aplicados a hongos del género *Aspergillus* en diferentes sistemas de cultivo.

Microorganismo	Proteoma	Resultados	Referencia
Cultivo en medio sólido			
<i>A. oryzae</i>	Secretoma	Se identificaron 41 proteínas únicas, 17 secretadas de forma convencional, 10 por mecanismos no convencionales Se identificaron nuevas proteínas secretoras	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. fumigatus</i>	Secretoma	Identificación de celulasas, hemicelulasas, enzimas degradadoras de lignina, proteasas, enzimas de transporte e hipotéticas, todas con expresión dependiente de la temperatura	(Adav <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. niger</i>	Secretoma	Presencia de proteínas sin péptido señal con funciones “moonlighting” a elevada concentración de glucosa en el medio Incremento en la actividad volumétrica de amilasa debido al incremento en la concentración de glucosa en el medio Presencia de diferentes isoformas de amilasa	(Carrillo-Sancen <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. brasiliensis</i>	Secretoma	Análisis respirométrico en línea para la obtención de muestras en el mismo estado fisiológico (tasa máxima de producción de CO ₂) Incremento en la concentración de glucosa favorece la actividad catabólica y bajo regula enzimas asociadas con estrés y proteólisis	(Volke-Sepulveda <i>et al.</i> , 2016)

Tabla 4. Reportes de análisis proteómicos aplicados a hongos del género *Aspergillus* en diferentes sistemas de cultivo (continuación).

Microorganismo	Proteoma	Resultados	Referencia
Cultivo en medio líquido			
<i>A. flavus</i>	Secretoma	15 proteínas inducidas por rutina, 7 no inducidas por rutina y 90 puntos de proteínas nuevas o no secuenciadas	(Medina <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. niger</i>	Secretoma	222 proteínas identificadas, de las cuales 74 son únicas de una sola condición estudiada Mucho mayor proporción de enzimas degradadoras de biomasa con actividad "exo" que "endo"	(Tsang <i>et al.</i> , 2009)
<i>A. niger</i>	Secretoma	Identificación de 102 proteínas únicas La mayoría de las proteínas son hidrolasas con aplicación en la degradación de biomasa y producción de combustibles La producción de enzimas puede ser estimulada y regulada controlando el pH del medio de cultivo	(Adav <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. niger</i>	Proteoma	Utilización de xilosa o maltosa afecta la composición del secretoma, pero no tiene efecto significativo en la composición del proteoma intracelular Diferencias en las condiciones de cultivo derivadas de control de pH, temperatura y agitación en biorreactor versus en matraz, tienen un profundo efecto en la composición del proteoma intracelular	(Lu <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. niger</i>	Secretoma-microsoma	Se identificaron 102 proteínas secretadas y 1126 proteínas microsomales inducción por D-maltosa y D-xilosa resultó en el incremento de glucoamilasa α y β -xilosidasa D, respectivamente Inducción con D-maltosa conduce al reclutamiento de proteínas implicadas en la degradación mediada por proteasomas	(Ferreira de Oliveira <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. niger</i>	Secretoma	Cicloheximida inhibe la secreción de proteínas en la periferia del micelio Cicloheximida incrementa la liberación de proteínas en zonas centrales del micelio (posiblemente por degradación de la pared celular) Se identificaron 124 proteínas, de las cuales 19 no se habían identificado antes y 53 estuvieron ausentes en el micelio sin tratamiento con cicloheximida	(Krijgsheld <i>et al.</i> , 2012)
Cultivo en medio superficial			
<i>A. nidulans</i>	Proteoma de conidios	57 proteínas identificadas de las cuales 27, 13 y 6 están asociadas a metabolismo energético, síntesis de proteínas y plegamiento de proteínas, respectivamente 8 proteínas asociadas con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno	(Oh <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. flavus</i>	Proteoma	3566 proteínas identificadas. 403 sobre expresadas con a_w de 0.99, 434 sobre expresadas con a_w de 0.93	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)

Tabla 4. Reportes de análisis proteómicos aplicados a hongos del género *Aspergillus* en diferentes sistemas de cultivo (continuación).

Microorganismo	Proteoma	Resultados	Referencia
Cultivo en medio sólido y líquido			
<i>A. terreus</i>	Secretoma	CMS mejora de 1.5 a 3 veces la actividad enzimática Isoformas de endo- β -glucanasa, β -glucosidasa y xilanasas expresadas en CMS 63 proteínas identificadas, principalmente glicosil hidrolasas y proteasas	(Saritha <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. brasiliensis</i>	Secretoma	Bajo regulación de proteínas en CML por efecto del incremento en la concentración de glucosa Sobre regulación de proteínas en CMS por efecto del incremento en la concentración de glucosa CMS mejora parámetros cinéticos asociados al crecimiento, evita represión catabólica, incrementa el nivel de ramificación y metabolismo oxidativo, incrementa la concentración y diversidad de proteínas secretadas, favorece la secreción de proteínas comúnmente intracelulares	(Salgado-Bautista <i>et al.</i> , 2020)

2.8. Técnicas para el análisis proteómico

El enfoque más común utilizado en proteómica es el denominado “*shotgun*” que es ampliamente utilizado para la caracterización de proteínas en muestras biológicas (Shteynberg *et al.*, 2013). Este enfoque se centra en el análisis directo de una muestra compleja de proteínas para generar rápidamente un perfil global de la proteína dentro de la mezcla (García-Alonso *et al.*, 2007). La Figura 3 describe el flujo de trabajo que se sigue para la identificación de proteínas utilizando datos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Partimos de la muestra proteica, que puede ser una proteína purificada o una mezcla compleja de proteínas en solución, o separadas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE 1D o 2D). Se realiza la digestión para producir péptidos (usualmente se utiliza tripsina). Uno o más pasos de cromatografía son utilizados para regular el flujo de los péptidos dentro del espectrómetro de masas. A continuación, los péptidos son seleccionados uno a la vez en la primera etapa de análisis de masas. Cada péptido aislado es inducido a fragmentarse posiblemente por colisión y la segunda etapa de análisis de masas es utilizada para capturar el espectro MS/MS (Cottrell, 2011). El análisis de los espectros MS/MS se realiza vía software, y resulta bastante complejo. Primero se deben convertir los archivos que arroja cada espectrómetro de masas (archivos “.RAW”) a un formato común al que se pueda acceder con todas las herramientas bioinformáticas. Se comparan y se identifican los espectros experimentales contra espectros teóricos que son

generados en motores de búsqueda con la base de datos de proteínas del microorganismo objetivo. Se realiza una validación estadística de los espectros identificados y una cuantificación de los resultados en caso de haber utilizado alguna estrategia de etiquetado cuantitativo. Finalmente se hace la inferencia y la interpretación de las proteínas identificadas (Deutsch *et al.*, 2010; Cottrell, 2011). Dependiendo del enfoque, suele haber variaciones en el flujo de trabajo. Por ejemplo, en la proteómica denominada “top-down” y peptidómica se omite el paso de digestión con tripsina, ya que en el primer enfoque, la proteína completa es introducida en el espectrómetro de masas (Catherman *et al.*, 2014) y en el segundo, se trabaja con péptidos endógenos (Fricker *et al.*, 2006).

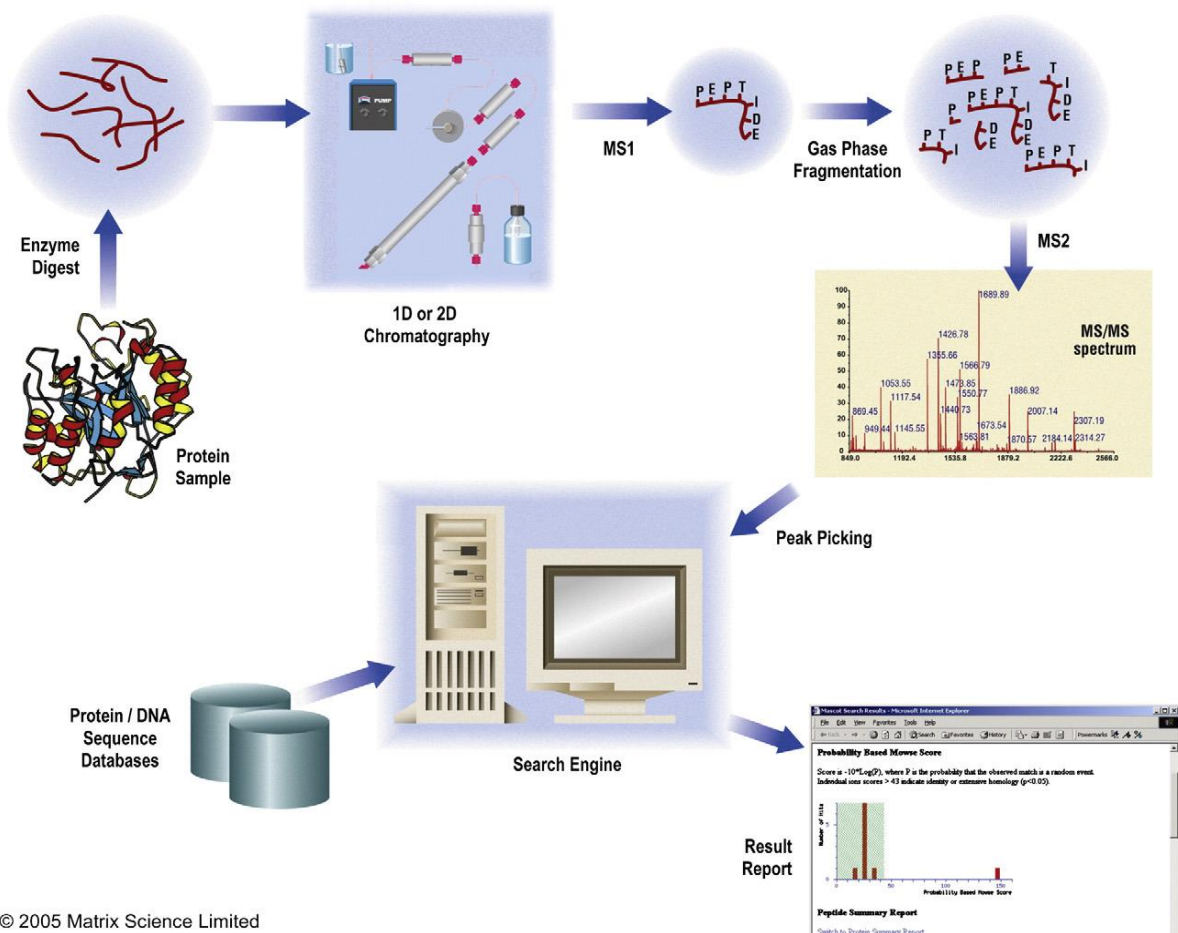


Figura 3. Flujo de trabajo para la identificación de proteínas con datos MS/MS, tomada de Cottrell, (2011).

2.8.1. Separación de proteínas en geles SDS-PAGE (1D y 2D)

La electroforesis de proteínas es un procedimiento comúnmente utilizado en estudios de proteínas (Kurien *et al.*, 2019). Los métodos basados en geles de electroforesis empleados

en proteómica incluyen geles de poliacrilamida de una dimensión (SDS-PAGE), geles de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-PAGE) y geles de electroforesis diferencial (DGE ó DIGE) todos acoplados a espectrometría de masas (Freson, 2019). Los geles SDS-PAGE son útiles para separar proteínas con base en su tamaño. Son utilizados para monitorear procesos de purificación de proteínas, revisar el grado de pureza de muestras y estimar el peso molecular de proteínas desconocidas (Brunelle y Green, 2014). Cuando son acoplados a cromatografía líquida y espectrometría de masas, la estrategia se denomina “GeLC-MS/MS” (Senzel *et al.*, 2009). La electroforesis bidimensional, también conocida como método Iso-Dalton es una de las herramientas más utilizadas en proteómica, ya que permite la separación de proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular. Además, es relativamente fácil de usar, presenta alta reproducibilidad y alta resolución de proteínas, es decir, dependiendo del tamaño de corte del gel y del gradiente de pH, puede separar hasta 5,000 proteínas y cuantificar “spots” <1 ng de proteína y adicionalmente, permite la aplicación de análisis por espectrometría de masas (Lilley *et al.*, 2002). No obstante, la electroforesis bidimensional cuenta con algunas limitaciones, por ejemplo, las proteínas hidrofóbicas difícilmente entran en el gel y generalmente no son resueltas durante el desarrollo de la técnica, su aplicación en proteínas integrales de membrana también es limitada. Además, proteínas de muy alto o muy bajo peso molecular no pueden ser resueltas, lo mismo sucede con proteínas muy ácidas (Walker, 2009). Las proteínas separadas por 1D y 2D-PAGE, son visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie, tinción plata o por métodos de fluorescencia (López, 2007). Una vez seleccionadas las bandas o puntos de los geles, éstos son cortados y retirados para su posterior reducción, alquilación y remoción del colorante de tinción, digestión con tripsina, extracción de los péptidos y análisis por espectrometría de masas (Shevchenko *et al.*, 2007). Por otro lado, DIGE es una técnica basada en la convencional 2D-PAGE (Lilley y Friedman, 2006). Permite comparar muestras que son marcadas con diferentes colorantes fluorescentes (cianina-2, cianina-3 o cianina-5) y analizadas simultáneamente en el mismo gel (Lilley *et al.*, 2002). DIGE comparado con la electroforesis bidimensional común, tiene mayor sensibilidad y precisión al utilizar menor cantidad de geles para un análisis, lo cual significa que da solución a los problemas de reproducibilidad asociados al uso y comparación de varios geles en la electroforesis 2D-PAGE; sin embargo, presenta las mismas limitaciones (Freson, 2019).

A pesar de que la electroforesis bidimensional es una poderosa herramienta que permite la identificación de modificaciones postraduccionales, el análisis libre de gel resulta más ventajoso porque permite una identificación más amplia de proteínas, incluyendo las que no entran en geles o las que se encuentran en muy bajas cantidades (Callegari y Navarrete, 2012).

2.8.2. Digestión triptica

La digestión de proteínas en gel es muy importante para la posterior identificación basada en espectrometría de masas (Shevchenko *et al.*, 2007). La tripsina es la proteasa más utilizada en proteómica (Laskay *et al.*, 2013). A pesar de que está demostrado que la digestión con múltiples proteasas mejora la cobertura de la secuencia y permite una robusta y precisa identificación y cuantificación de proteínas (Swaney *et al.*, 2010; Giansanti *et al.*, 2016), la tripsina es considerada como la enzima estándar en la digestión de proteínas debido a que es altamente eficiente y específica, además de que su costo es relativamente razonable y genera péptidos muy cortos comprendidos entre 0.5- 3 kDa (Tsiatsiani y Heck, 2015). La tripsina es una serina proteasa que corta la secuencia de aminoácidos en el extremo terminal de arginina (R) o lisina (K) (Huynh *et al.*, 2009). Estos péptidos al tener R o K en el extremo terminal, quedan cargados positivamente facilitando su ionización y los hace susceptibles de fragmentación inducida por colisión (CID) (Giansanti *et al.*, 2016), que es el método de fragmentación de péptidos tripticos más empleado en espectrometría de masas en tándem (Tsiatsiani y Heck, 2015). Sin embargo, generar péptidos muy cortos (con menos de 6 aminoácidos) imposibilita su identificación lo que significa que se cubre solo una porción del proteoma (Swaney *et al.*, 2010). Además, la presencia de aminoácidos con carga negativa (ácido aspártico, ácido glutámico), serina y treonina cerca de R o K evita la ruptura en estos sitios y se generan péptidos de mayor tamaño (Giansanti *et al.*, 2016).

2.8.3. Espectrometría de masas

La proteómica basada en espectrometría de masas es el enfoque más potente para la identificación de proteínas y la determinación de su expresión en muestras obtenidas bajo diferentes condiciones (Szabo y Janaky, 2015). La espectrometría de masas es ampliamente utilizada en proteómica para conocer la secuencia de aminoácidos de una proteína (estructura primaria) y la formación de complejos proteína-ligando, incluyendo modificaciones postraduccionales, uniones enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo. Los espectrómetros de masas ionizan las moléculas y las separan de acuerdo con su proporción

masa/carga (m/z) y la información de rendimientos respecto al peso molecular de cada ion, esta información es utilizada para conocer la estructura de las moléculas (Mishra, 2010).

Todos los espectrómetros de masas llevan a cabo tres distintas funciones:

1. Ionización para generar péptidos cargados
2. Análisis de iones para separarlos de acuerdo con su m/z .
3. Detección de iones que requiere la recolección de iones de diferentes masas secuencialmente o en paralelo. Esto provoca una corriente eléctrica cuyo flujo marca la llegada de iones sucesivos y cuya magnitud marca su abundancia. La señal eléctrica analógica es digitalizada y procesada por una computadora.

El resultado es obtenido como un espectro de masas sin procesar, en el que la relación m/z se encuentra en el eje de las "x" y su intensidad en el eje "y" (Lisacek, 2018). Los dos métodos más utilizados para la ionización de biomoléculas en análisis por espectrometría de masas son la ionización por electrospray (Electrospray Ionization - ESI) y por desorción láser asistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI) (Nadler *et al.*, 2017); ambos métodos de ionización están basados en la protonación (adición de un ion H^+) o desprotonación (eliminación de un ion H^+) (Walker, 2009).

ESI. Se considera como un proceso suave porque se transmite un mínimo de energía para ionizar la muestra (El-Aneed *et al.*, 2009). El método consiste en aplicar un campo eléctrico a una solución de analito que fluye a través de un capilar y en la punta del capilar, el delgado filamento de líquido se rompe en diminutas gotas que contienen múltiples iones de la muestra (Nadler *et al.*, 2017). Existen dos teorías para la formación de iones (Figura 4), la teoría de evaporación de iones sostiene que las gotas que contienen múltiples iones de la muestra se encogen por evaporación del solvente hasta que la fuerza del campo en su superficie es lo suficientemente grande como para que los iones solvatados puedan ser expulsados de la gota (Wilm, 2011). La teoría de residuo cargado sostiene que una gota muy cargada se contrae por evaporación del solvente hasta que la fuerza del campo en el lugar con la curvatura de superficie más alta es tan grande que se forma un cono de Taylor. Desde la punta del cono de Taylor, se emiten otras gotitas más pequeñas altamente cargadas. Este proceso puede repetirse hasta que se formen gotitas que contengan solo una molécula de analito. Esta molécula se libera como ion por evaporación y descomposición del disolvente (Wilm, 2011).

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

MALDI. En este método, la muestra de proteínas es adsorbida en una matriz generalmente ácida (Figura 5); después, volúmenes en el orden de microlitros, se depositan sobre una placa MALDI y se secan por evaporación lenta formando cristales (El-Aneed *et al.*, 2009). La placa se coloca en una cámara al vacío del espectrómetro y es irradiada con pulsos de luz UV (Nadler *et al.*, 2017). El resultado de este proceso es una rápida desorción y ionización de la muestra (El-Aneed *et al.*, 2009). Los iones de la muestra (con carga positiva) son extraídos utilizando un campo electrostático y empleados para el análisis de masas (Karas y Hillenkamp, 1988; Krüger *et al.*, 2001). El hecho de que las proteínas se ionicen como especies simples cargadas resulta en que los espectros de masas MALDI sean sencillos de interpretar, pero la desventaja es que se necesitan analizadores de masas más precisos con respecto a la proporción m/z . Adicionalmente, las secuencias de moléculas cargadas individualmente son en muchos casos más difíciles de analizar (Patel, 2015).

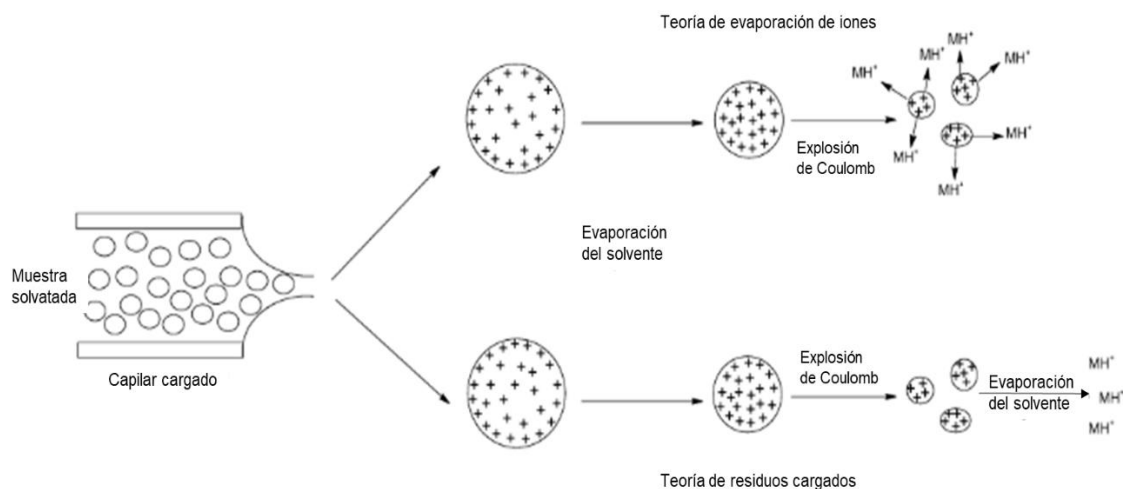


Figura 4. Proceso de ionización ESI, tomada de El-Aneed *et al.* (2009).

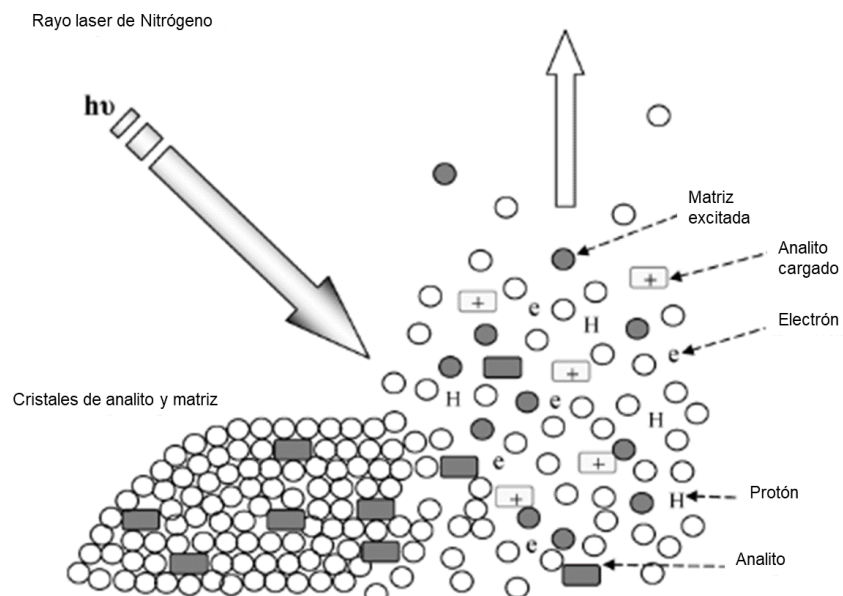


Figura 5. Proceso de ionización MALDI tomada de El-Aneed *et al.* (2009).

Inicialmente, la identificación de proteínas fue realizada con el mapeo de huella peptídica por ser el más simple y directo basándose en un espectro de masas (MS); sin embargo, actualmente este método es reemplazado por la espectrometría de masas (MS/MS) ya que es un método más confiable y robusto (Szabo y Janaky, 2015), con mayor sensibilidad, poder de resolución y precisión de masa, mecanismos alternativos de fragmentación y nuevas estrategias de adquisición de datos que han aumentado el rendimiento, la calidad y la profundidad de los datos proteómicos (Lisacek, 2018). La espectrometría de masas (MS/MS) es el resultado de realizar dos o más pasos de separación de iones usualmente acoplado a dos o más analizadores (El-Aneed *et al.*, 2009). En este sistema de análisis, se obtiene el primer espectro MS y se seleccionan iones precursores, que son fragmentados para posteriormente analizar los iones resultantes y obtener el espectro MS/MS (Lisacek, 2018). Las técnicas de fragmentación de péptidos más utilizadas son:

- Disociación inducida por colisión (CID). Es la técnica de fragmentación más utilizada en MS/MS. Se desarrolla en fase gaseosa, donde los iones precursores colisionan entre sí o con el gas de colisión (helio, nitrógeno, o argón), lo que genera fragmentos de menor tamaño (Wells y McLuckey, 2005).
- Disociación por captura de electrones (ECD). Esta técnica emplea un filamento de tungsteno que forma un haz de electrones de baja energía. Los electrones son capturados por los iones precursores, lo cual reduce el estado de carga y genera su posterior fragmentación (Sleno y Volmer, 2004).

- Disociación por transferencia de electrones (ETD). Esta técnica emplea un método de disociación similar al ECD. Está basada en la transferencia de electrones de radicales aniónicos de antraceno o fluoranteno a iones precursores con carga múltiple (Hart-Smith, 2014).

Se han desarrollado diversos métodos para medir la relación m/z de los iones en fase gaseosa. Los métodos más comunes involucran: dispersión basada en el impulso iónico o energía cinética (instrumentos del sector magnético y eléctrico); separación en el tiempo basada en la velocidad de los iones (tiempo de vuelo); transmisión a través de un campo electrodinámico (filtro de masa cuadrupolo); y movimiento periódico en un campo magnético o electrodinámico (trampas de iones) (Glish y Burinsky, 2008). Los cuatro analizadores más comunes son tiempo de vuelo (Time-Of-Flight - TOF), cuadrupolo, trampa de iones y resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance - FTICR) (Aebersold y Mann, 2003; Zhang *et al.*, 2014). Las técnicas de análisis de iones que se separan en el espacio son conocidas como técnicas de “haz” porque los iones atraviesan el analizador como un haz continuo o pulsado en analizadores tipo TOF y cuadrupolo. Esto implica que las dos etapas de medición m/z deben realizarse en analizadores separados físicamente. Por el contrario, los espectrómetros que tienen analizadores de captura de tipo trampa de iones, FTICR y orbitrap, caracterizan los iones basándose en la frecuencia de su movimiento en un espacio definido. Por lo tanto, las dos etapas de análisis m/z pueden realizarse en el mismo analizador, pero en diferente periodo de tiempo, lo cual mejora la eficiencia experimental porque los iones no tienen que cambiar de un analizador a otro (Glish y Burinsky, 2008). Para obtener características de rendimiento deseables, los espectrómetros son modificados para tener más de un analizador de masas y se les conoce como espectrómetros híbridos (Glish y Burinsky, 2008; El-Aneed *et al.*, 2009). En la Figura 6 se describen algunas de las configuraciones más comunes en equipos con un solo analizador o híbridos según Aebersold y Mann (2003).

- a) Espectrómetros reflectores TOF. Los iones se aceleran con alta energía cinética y se separan a lo largo de un tubo de vuelo como resultado de sus velocidades. Los iones giran en un reflector, que compensa las ligeras diferencias en la energía cinética, y luego inciden en un detector que amplifica y cuenta los iones que llegan.
- b) Espectrómetros híbridos TOF-TOF. Incorporan una celda de colisión en medio de los dos analizadores. Iones (m/z) son seleccionados en el primer analizador TOF,

se fragmentan en la celda de colisión, y las masas de los fragmentos se separan en el segundo analizador TOF.

- c) Espectrómetros de triple cuadrupolo (Q3). Actúan mediante campos eléctricos que varían en el tiempo entre cuatro varillas, lo que permite una trayectoria estable para iones con m/z deseado en particular. Los iones con m/z particular son seleccionados en el primer analizador (Q1), se fragmentan en una celda de colisión (q2) y los fragmentos se separan en Q3. En la trampa de iones lineal, los iones se capturan en una sección cuádruple, representada por el punto rojo en Q3 (Figura 6c). Luego se excitan a través de un campo eléctrico resonante y los fragmentos se escanean, creando el espectro de masas en tándem.
- d) Espectrómetro cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF). Combina la parte frontal de un analizador de triple cuadrupolo con un analizador TOF reflector para medir la masa de los iones.
- e) Espectrómetro con trampa de iones (tridimensional). Captura los iones como en el caso de la trampa de iones lineal. Fragmenta los iones de una determinada m/z y después escanea los fragmentos para generar el espectro de masas en tándem.
- f) Espectrómetro con analizador de resonancia ciclométrica por transformada de Fourier (FTICR). Atrapa los iones con la ayuda de fuertes campos magnéticos. Es configurado con una trampa de iones lineal para un aislamiento, fragmentación y detección de fragmentos eficientes en el analizador FTICR.

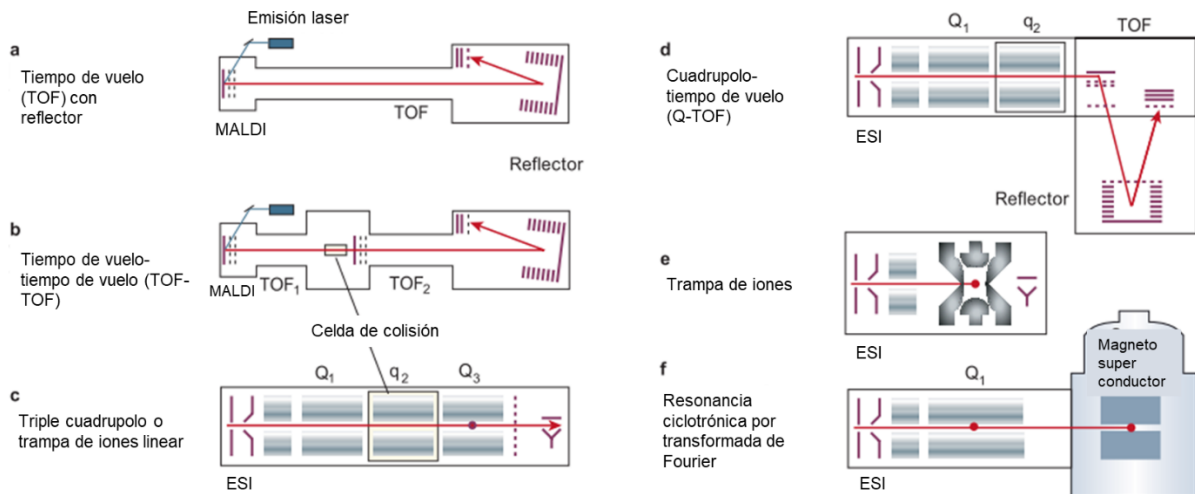


Figura 6. Configuraciones comunes de fuente de iones y analizadores en espectrómetros de masas (imagen modificada de Aebersold y Mann (2003)).

2.8.4. Análisis bioinformático

El resultado final del análisis por espectrometría MS/MS es un archivo cuyo formato dependerá del instrumento empleado para el análisis (Cottrell, 2011). Generalmente, espectrómetro de masas viene acompañado de un software que permite hacer todo el procesamiento de datos para la identificación de las proteínas (Martens, 2011). No obstante, cuando se requiere hacer el análisis con software libre, el primer paso para el procesamiento de los datos “brutos” consiste en transformar el archivo de salida del software del vendedor a un formato abierto al que se puede acceder con todas las herramientas bioinformáticas para continuar el procesamiento (Deutsch *et al.*, 2010). Una vez que cuenta con los archivos en formato abierto, éstos son empleados para la identificación de péptidos utilizando algoritmos especializados. El software utilizado para la identificación se puede dividir en tres categorías en función de su enfoque general del problema: algoritmos de búsqueda de bases de datos, algoritmos de novo y algoritmos basados en etiquetas (Martens, 2011). El método de identificación de péptidos basado en la utilización de bases de datos es ampliamente utilizado (Sadygov *et al.*, 2004). Su fundamento consiste en utilizar una base de datos de secuencias de proteínas, realizar una digestión proteolítica virtual para obtener péptidos, que luego son fragmentados virtualmente para obtener un espectro MS/MS teórico para cada uno de los péptidos. El algoritmo central compara y puntúa la similitud entre estos espectros teóricos y los espectros experimentales (Matthiesen, 2007). Con este procedimiento se producen muchos péptidos candidatos (clasificados) por espectro, donde la tarea crítica es distinguir las coincidencias correctas de las coincidencias incorrectas (Martens, 2011). Los principales motores de búsqueda utilizados para la identificación de péptidos actualmente son Mascot, SEQUEST, X!Tandem, OMMSA y MyriMatch (Martens, 2011). Las bases de datos empleadas en los motores de búsqueda son obtenidas de dos repositorios principales para bases de datos de secuencias, uno alojado en el Centro Nacional de Información Biotecnológica de EUA ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) y el otro alojado en el Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/>). (Cottrell, 2011). Swiss-Prot es una de las bases de datos de proteínas comúnmente utilizada. Esta curada manualmente, no es redundante y cubre modificaciones postraduccionales, estructuras de dominio, citas, funciones de proteínas y otros enlaces a bibliotecas de conocimiento (Blueggel *et al.*, 2004). La base de conocimientos sobre proteínas (UniProtKB) (<https://www.uniprot.org/>), es otro repositorio de bases de datos comúnmente utilizado (Matthiesen, 2007). Consiste en una colección de bases de datos que permite a los investigadores obtener información

secuencial y funcional disponible de las proteínas. Es el recurso central que combina UniProtKB/Swiss-Prot y UniProtKB/TrEMBL.(Bateman *et al.*, 2017). Una vez que los péptidos son identificados, el siguiente paso es inferir las proteínas a partir de los péptidos (Martens, 2011). Para un conjunto dado de péptidos, se pueden inferir muchos conjuntos de proteínas diferentes. Existen tres métodos diferentes para hacer la asignación de péptidos a las proteínas (Martens y Hermjakob, 2007):

1. Conjunto explicativo mínimo de proteínas Consiste en ensamblar el conjunto más pequeño de proteínas que explique todos los péptidos observados. Si se definen varios conjuntos mínimos distintos, cada uno compuesto por un número idéntico de proteínas diferentes, la cobertura de las secuencias de proteínas por los péptidos coincidentes es utilizada como un parámetro de diferenciación en estos casos.
2. Conjunto explicativo máximo. Establece que cualquier proteína que contenga uno o más de los péptidos identificados debe mencionarse en la lista final de proteínas observadas.
3. El tercer método consiste en incluir otro parámetro en el proceso de decisión: el nivel de anotación que se puede encontrar para una proteína, lo cual está asociado con la evidencia de la existencia de la proteína.

Como se observa, el flujo de trabajo empleado para la identificación de proteínas a partir de espectros MS/MS resulta sumamente complejo (Deutsch *et al.*, 2010). Para agilizar el proceso de identificación de proteínas, se han desarrollado conjuntos de herramientas que tienen como objetivo proporcionar un entorno único para realizar todos o la mayoría de los pasos en el flujo de trabajo. Estos incluyen OpenMS Proteomics Pipeline, MaxQuant y el más antiguo y completo, Trans-Proteomic Pipeline (Keller y Shteynberg, 2007).

El resultado final del procesamiento de espectros MS/MS es una lista de proteínas y en orden para entender e interpretar la nueva información, es conveniente clasificar y filtrar la lista. El primer paso en el análisis funcional de una lista de proteínas es conectar cada nombre de proteína a un identificador único (Schmidt *et al.*, 2014). “Protein Identifier Cross-Reference” (PICR) (Wein *et al.*, 2012) y “Cross-Reference Navigation Server” (CRONOS) (Waegle *et al.*, 2009) son ejemplo de herramientas bioinformáticas para identificación de proteínas por referencia cruzada. Sin embargo, estas herramientas están conectadas a UniProtKB que también usa identificadores de proteína como entrada (Schmidt *et al.*, 2014). Una vez que se tiene la lista de proteínas con sus respectivos identificadores, es necesario realizar el análisis funcional basado en ontología genética (<http://geneontology.org/>)

(Ashburner *et al.*, 2000). El análisis funcional lo podemos dividir en dos formas. La primera forma denominada “análisis de enriquecimiento” muestra como diferentes términos de ontología (vías metabólicas, procesos biológicos, etc.) están representados en la lista de proteínas. La segunda forma de análisis evalúa la funcionalidad de cada una de las proteínas de la lista y su relación entre sí reflejando así su importancia funcional para el fenotipo (Bessarabova *et al.*, 2012). Para mejorar y enriquecer el análisis funcional, es conveniente asociar los identificadores de las proteínas a otras bases de datos que permitan obtener más información de éstas (Ashburner *et al.*, 2000). La enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa y Goto, 2000), SignalP y SecretomeP, asociadas a la unidad bioinformática de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU Health Tech, <http://www.cbs.dtu.dk/>) han sido previamente utilizadas (Shah *et al.*, 2009; Cortázar *et al.*, 2014; Volke-Sepulveda *et al.*, 2016).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Desde hace más de 20 años, en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido (PP4) de la Universidad Autónoma Metropolitana se ha comparado la producción de enzimas por CMS y CML. Inicialmente, todas las comparaciones se realizaron a nivel individual.

En 1993, se demostró que no existe represión catabólica durante la producción de pectinasas por *A. niger* CH4 en CMS (Solís-Pereira *et al.*, 1993). Estudios posteriores con este mismo hongo demostraron mayor estabilidad a pH y temperatura y mayor afinidad por el sustrato en pectinasas obtenidas en CMS (Acuña-Argüelles *et al.*, 1995), así como ausencia de inhibición del crecimiento debido a la elevada concentración de sustrato (Solís-Pereira *et al.*, 1996). En 1998 se demostró que el CMS es más adecuado para el crecimiento de *A. niger* 10 comparado con CML y cultivo superficial (CS), especialmente en condiciones de elevada concentración de sustrato (Favela-Torres *et al.*, 1998). Estudios posteriores desarrollados en diferentes laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana reportaron resultados similares de mayor productividad enzimática y baja o nula represión catabólica en CMS comparado con CML (Romero-Gómez *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2001). En 2016, se decidió tratar de explicar las diferencias encontradas previamente entre CMS y CML con un enfoque global.

Para tal fin, se estudió el secretoma de *A. niger* 10 (Carrillo-Sancen *et al.*, 2016) y *A. brasiliensis* (Volke-Sepulveda *et al.*, 2016) en CMS. Para garantizar reproducibilidad, las muestras fueron tomadas en el mismo estado fisiológico. Se observó que la presencia de glucosa tiene efecto en la abundancia y presencia de varias isoformas de amilasa producidas por *A. niger* 10 y que la alta concentración de glucosa favorece el catabolismo de *A. brasiliensis*, mientras que algunas proteínas relacionadas con el estrés y las que participan en la proteólisis están bajo reguladas, respectivamente. En el estudio más reciente, se comparó el secretoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML. En este trabajo se demostró que la elevada concentración de glucosa en el medio provoca que el 74% de proteínas reguladas en CML sean bajo reguladas, mientras que en CMS las proteínas son sobre reguladas. Además, este estudio demostró que CMS mejora los parámetros cinéticos asociados al crecimiento de *A. brasiliensis* comparado con CML, previene la represión catabólica, aumenta el nivel de ramificación de las hifas y el metabolismo oxidativo, así como la concentración y diversidad de proteínas secretadas y favorece la secreción de proteínas típicamente intracelulares que de forma extracelular podrían estar involucradas en la adhesión de hongos (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

4. JUSTIFICACIÓN

En diferentes trabajos, *Aspergillus* spp. ha demostrado ser buen productor de enzimas alcanzando mayores rendimientos por procesos en CMS que por CML. Los estudios realizados dan seguimiento a una enzima en específico y a partir de ello se han demostrado las diferencias entre ambos sistemas de cultivo en cuanto a fisiología y producción enzimática. Sin embargo, no son del todo claros los mecanismos que emplea *Aspergillus* en cada sistema de cultivo. En la mayoría de los casos y, partiendo del estudio de solo una o pocas enzimas, los autores asumen que todas las diferencias observadas entre CMS y CML se atribuyen a características inherentes a cada sistema de cultivo. Estudios recientes han reportado que *A. brasiliensis* tiene la capacidad de producir y secretar gran variedad de enzimas. *Aspergillus brasiliensis* es un microorganismo con importancia a nivel industrial, pero que ha sido poco utilizado para producción de enzimas. Lo cual lo hace candidato para el estudio de inulinasa e invertasa que son enzimas con múltiples aplicaciones en la industria alimentaria. Por otro lado, el uso de la proteómica resulta significativo porque permite hacer un análisis global de la expresión de proteínas asociadas con el estado fisiológico y metabólico de *Aspergillus*. Por lo tanto, analizar el efecto del sistema de cultivo y la concentración de sacarosa sobre la producción de inulinasa e invertasa y el proteoma de *A. brasiliensis* brindará información relevante que permita establecer diferencias entre CMS y CML a nivel individual dando seguimiento a la inulinasa e invertasa, pero también a nivel global, para entender cuáles son los cambios en el proteoma de *A. brasiliensis* y cuáles son los cambios a nivel metabólico dependiendo de las condiciones de cultivo. Con este doble enfoque (individual y global) es posible tener un mejor entendimiento de por qué cultivar microorganismos en CMS resulta más ventajoso en cuanto a la producción de enzimas que en CML.

5. HIPÓTESIS

La composición del proteoma de *A. brasiliensis* ATCC 9642 y la actividad de las enzimas involucradas en la hidrólisis de sacarosa dependen del sistema de cultivo y de la concentración de sacarosa en el medio.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto del sistema de cultivo (CML y CMS) y la concentración de sacarosa sobre la producción de inulinasa e invertasa y la composición del proteoma de *A. brasiliensis*.

6.2. Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del sistema de cultivo y la concentración de sacarosa sobre el crecimiento microbiano y la producción de inulinasa e invertasa.
2. Identificar el secretoma de *A. brasiliensis* obtenido en CMS y CML con concentraciones crecientes de sacarosa.
3. Realizar el análisis funcional de las proteínas que conforman el secretoma de *A. brasiliensis*.
4. Identificar el proteoma intracelular de *A. brasiliensis* obtenido con cada sistema de cultivo y concentración de sacarosa estudiados.
5. Realizar el análisis funcional de las proteínas que conforman el proteoma intracelular de *A. brasiliensis*.
6. Identificar y discutir las diferencias en el proteoma de *A. brasiliensis* asociadas con el sistema de cultivo y la concentración de sacarosa.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se desarrolló en 3 etapas (Figura 7). La primera etapa consistió en caracterizar cultivos de *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 9642) en CMS y CML, evaluando diferentes concentraciones de sacarosa (fuente de carbono inductora de invertasa), lo cual permitió establecer diferencias entre los sistemas de cultivo con base en las actividades invertasa e inulinasa tomadas como enzimas modelo, por su capacidad para hidrolizar sacarosa. Una vez caracterizados los cultivos de *A. brasiliensis*, se establecieron las condiciones y tiempo de cultivo (cuando se alcanza la tasa máxima de producción de CO₂) para obtener los secretomas y proteomas intracelulares de *A. brasiliensis*. En la segunda etapa, se realizaron los cultivos para la obtención de los secretomas. La proteína extracelular al final de los cultivos fue cuantificada y separada mediante geles SDS-PAGE. La muestra proteica a partir de los geles fue sometida a LC-MS/MS. La biomasa obtenida en los cultivos para la obtención del secretoma fue liofilizada para ser utilizada en la tercera etapa, que consistió extraer la proteína intracelular de la biomasa liofilizada. Posteriormente, la proteína intracelular fue separada en geles SDS-PAGE que fueron procesados para su análisis por LC-MS/MS. Las proteínas identificadas en los respectivos secretomas y proteomas intracelulares fueron conjuntadas dependiendo del sistema de cultivo obteniendo así un proteoma total para CMS y otro para CML, ambos obtenidos con diferentes concentraciones de sacarosa. Estos proteomas fueron analizados con la finalidad de establecer diferencias entre CMS y CML con un enfoque global y entender cómo es que el hongo adapta su metabolismo ante los cambios en las condiciones de cultivo.

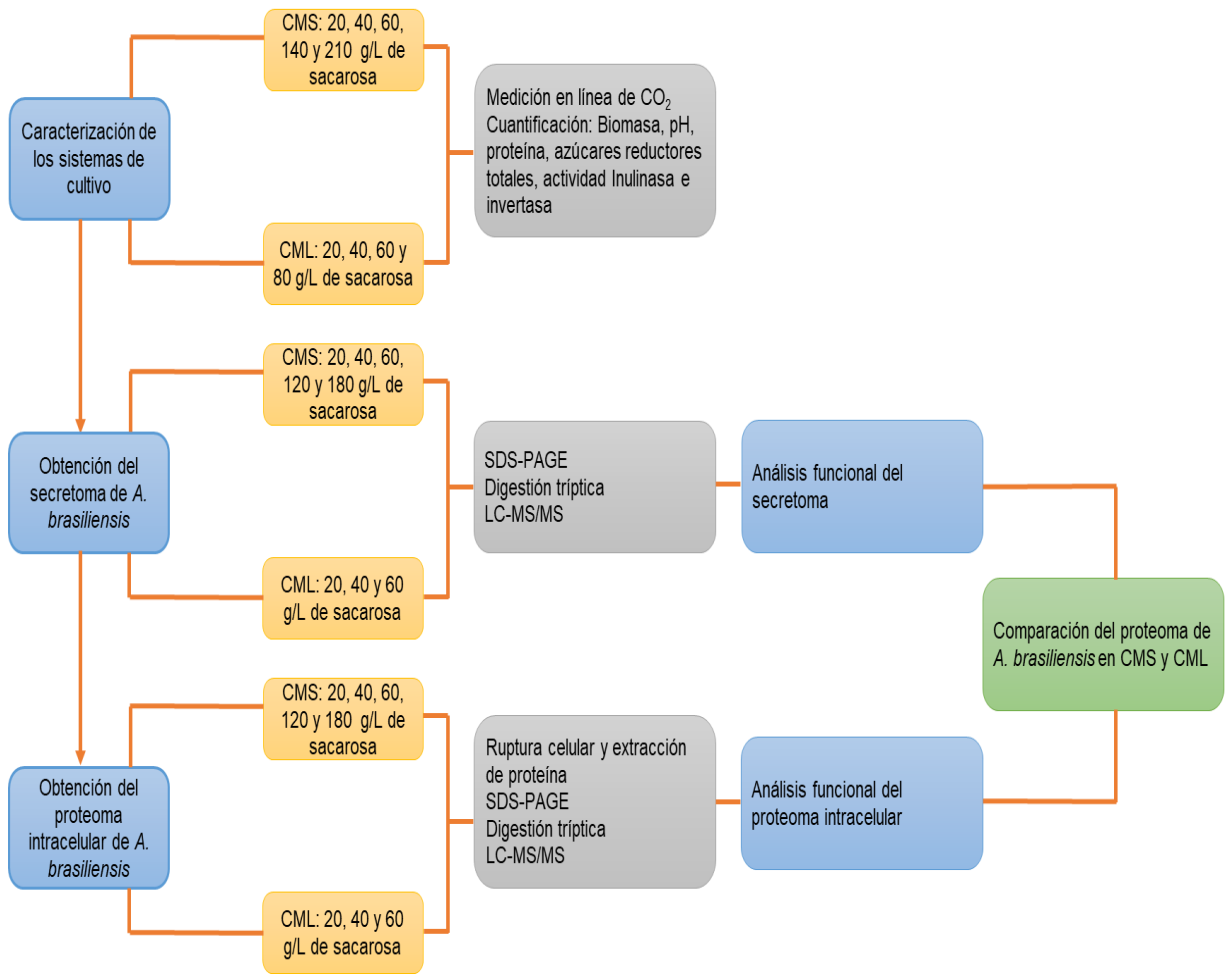


Figura 7. Diagrama de la estrategia experimental general.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa *A. brasiliensis* ATCC 9642. Esta cepa pertenece a la colección de cepas de la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido de la UAM Iztapalapa. Se encuentra conservada bajo dos métodos: esporas en tubos crioprotectores con glicerol al 20% (v/v) y biomasa liofilizada en ampolletas de vidrio.

8.1.1. Producción de preinóculo

La cepa fue activada en tubos de ensayo inclinados con 10 mL de Agar Papa Dextrosa (PDA). Dos perlas impregnadas de esporas fueron tomadas de los tubos crioprotectores. Éstas fueron colocadas en un tubo de ensayo con medio de cultivo (por triplicado) y fueron homogeneizadas para distribuir las esporas sobre la superficie del medio. Los tubos fueron incubados durante 7 días a 30 °C.

8.1.2. Propagación del inóculo

Las esporas de dos tubos de preinóculo fueron suspendidas en 5 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v). De esta suspensión se tomaron alícuotas de 1 mL para inocular tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA. Los matraces fueron incubados a 30 °C durante 7 días. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las esporas de los tres matraces fueron suspendidas en 30 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v). La suspensión de esporas obtenida fue empleada como inóculo para los CML y CMS.

8.2. Medio de cultivo

El medio empleado para CML y CMS fue el reportado por Hill y Kafer (2001), empleando sacarosa como fuente de carbono y manteniendo una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 8.58. La composición del medio basal fue (g/L): sacarosa, 20; NaNO₃, 6; KCl, 0.52; KH₂PO₄, 0.815; K₂HPO₄, 1.045; MgSO₄·7H₂O, 0.52; FeSO₄·7H₂O, 0.005; EDTA, 0.05; ZnSO₄·7H₂O, 0.022; H₃BO₃, 0.011; MnCl₂·4H₂O, 0.005; CoCl₂·6H₂O, 0.001; CuSO₄·5H₂O, 0.001; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.001. Al modificar la cantidad de sacarosa, el resto de los nutrientes fue modificada también en la misma proporción con respecto al medio basal.

8.3. Cultivo en medio líquido (CML)

Los CML fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo (Hill y Kafer, 2001). Los matraces con el medio de cultivo se esterizaron a 94 °C

durante 15 minutos. Después de la esterilización, cada matraz se inoculó con 1×10^6 esporas/mL de medio. Una vez inoculados, los matraces se incubaron a 30°C , con agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). Se evaluaron cuatro concentraciones de sacarosa inicial (20, 40, 60 y 80 g/L) por duplicado en los CML destinados a la caracterización del crecimiento de *A. brasiliensis* y la producción de inulinasa e invertasa. El tiempo de incubación de estos cultivos fue diferente, dependiendo de la concentración de sacarosa inicial y se finalizó hasta que la producción de CO_2 (medido en línea) fue constante y cercana a cero (Anexo 2). En los CML realizados para la obtención del proteoma (secretoma y proteoma intracelular) se evaluaron tres concentraciones de sacarosa inicial (20, 40 y 60 g/L) con al menos tres replicas por cada condición. El tiempo de incubación de estos cultivos fue diferente dependiendo la concentración de sacarosa inicial y fue finalizado cuando los cultivos alcanzaron la tasa máxima de producción de CO_2 (TMPC) (Anexo 2).

8.4. Cultivo en medio sólido (CMS)

Los CMS se realizaron en columnas de vidrio de 2.3 cm de diámetro. Como soporte inerte, se utilizó perlita (AGROLita, México), la cual se tamizó y la fracción retenida en tamices No. 16 y 20 (tamaño de partícula 0.84-1.70 mm) fue lavada y secada a 60°C durante 24 horas. La composición del medio basal fue la misma que en CML. Se evaluaron cinco concentraciones de sacarosa inicial (20, 40, 60, 140 y 210 g/L) por duplicado en los CMS destinados a la caracterización del crecimiento de *A. brasiliensis* y la producción de inulinasa e invertasa. El tiempo de incubación de estos cultivos fue variable según la concentración de sacarosa y se determinó de la misma forma que en CML (Anexo 2). En los CMS realizados para la obtención del proteoma se evaluaron cinco concentraciones de sacarosa inicial (20, 40, 60, 120 y 180 g/L) con al menos cuatro replicas por cada condición. El tiempo de incubación de estos cultivos fue finalizado cuando los cultivos alcanzaron la TMPC (Anexo 2). La perlita y el medio de cultivo se esterilizaron por separado durante 15 minutos a 121 y 94°C , respectivamente. La perlita seca (8.2 g) se humedeció con 15 mL de medio inoculado con 1×10^7 esporas/mL y se empacó (50 cm^3) en las columnas de vidrio alcanzando un contenido de humedad inicial del 60% para cultivos con 20, 40 y 60 g/L de sacarosa. Para cultivos con 120, 140, 180 y 210 g/L de sacarosa, la humedad inicial fue del 58%, 56%, 56% y 52%, respectivamente. Las columnas empacadas se incubaron a 30°C .

8.5. Medición en línea de la producción de CO₂

Los cultivos destinados a la caracterización del crecimiento de *A. brasiliensis* y la producción de inulinasa e invertasa en CMS y CML y los destinados a la obtención del proteoma se conectaron a un sistema de respirometría (Figura 8). Todos los CMS y CML fueron aireados con un flujo de aire estéril de 20 mL/min y el contenido de CO₂ en el flujo a la salida de las unidades experimentales fue cuantificado en línea. El crecimiento de *A. brasiliensis* en CMS y CML fue estimado de forma indirecta a través de la medición en línea de la producción de CO₂. Los datos recuperados fueron utilizados para estimar el tiempo de fase *Lag*, la tasa específica de producción de CO₂ (μCO_2), la TMPC y la producción final de CO₂ (Volke-Sepulveda *et al.*, 2016).

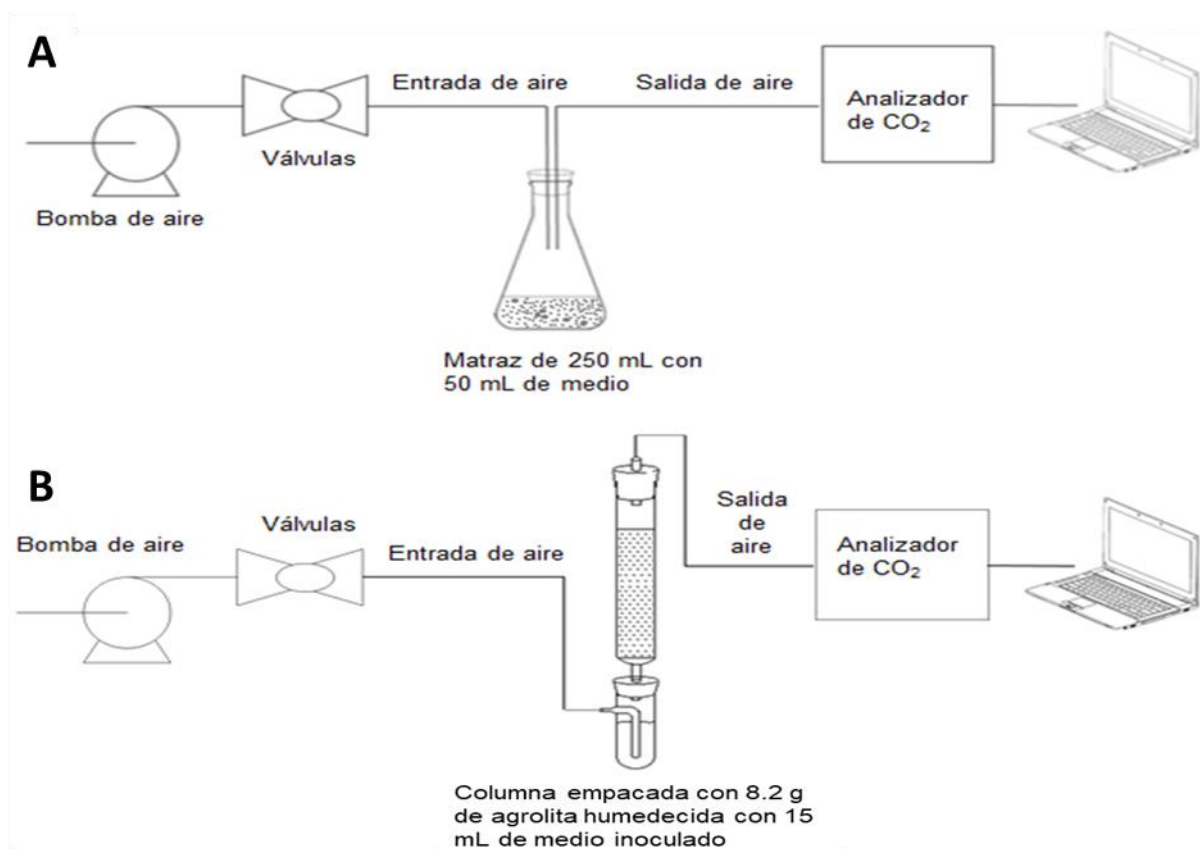


Figura 8. Esquema de medición del sistema de respirometría. a) CML y b) CMS.

8.6. Recuperación de proteína extracelular

8.6.1. Cultivo en medio líquido

Para obtener la proteína extracelular en CML, se agregaron 20 μL de coctel inhibidor de proteasas (P8215, Sigma-Aldrich) a cada matraz e inmediatamente fueron refrigerados a 4

°C. Después de 30 minutos, el contenido de cada matraz fue filtrado al vacío (papel filtro Whatman No. 41). En el caso de muestras destinadas al análisis proteómico, la biomasa recuperada fue liofilizada y almacenada hasta la extracción de proteína intracelular. Los extractos proteicos obtenidos fueron almacenados a -20 °C hasta su uso en la cuantificación de actividad enzimática y de la concentración de proteína.

8.6.2. Cultivo en medio sólido

La proteína extracelular en CMS fue recuperada por percolación de la siguiente manera: se adicionaron 60 mL de Tris-HCl 20 mM (pH 7.2) conteniendo 20 µL de coctel inhibidor de proteasas a cada columna en dos pasos secuenciales, primero usando 35 mL y después 25 mL de buffer de extracción. Los extractos obtenidos en cada paso fueron mezclados y almacenados a -20 °C hasta ser utilizados en la cuantificación de actividad enzimática, y concentración de proteína. En el caso de muestras destinadas al análisis proteómico, la biomasa recuperada junto con el soporte fue liofilizada y almacenada hasta la extracción de proteína intracelular.

8.7. Concentración y diálisis de proteína extracelular

Los extractos proteicos obtenidos en CMS y CML fueron descongelados a 4 °C e inmediatamente centrifugados a 7,000 rpm, 4 °C durante 15 minutos con la finalidad de eliminar restos insolubles en las muestras. A continuación, fracciones de cada muestra de 15 mL fueron centrifugadas en tubos Amicon (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, 10 kDa MWCO) en pasos secuenciales a 7,000 rpm, 4 °C durante 15 minutos. Las fracciones de cada muestra que fueron retenidas en cada paso de centrifugación fueron mezcladas en un tubo Amicon y dializadas en tres ocasiones con 10 mL de buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7.2) a las mismas condiciones de centrifugación. El volumen de extracto proteico concentrado y dializado recuperado por muestra fue cercano a 2 mL. Se cuantificó la concentración de proteína en el extracto proteico concentrado (sección 8.14.3). Se prepararon fracciones con 50 µg de proteína extracelular, las cuales fueron liofilizadas y utilizadas para la separación de proteínas en geles SDS-PAGE (sección 8.9.1).

8.8. Ruptura celular y procesamiento de proteína intracelular

8.8.1. Extracción de proteína intracelular en CML

La extracción de proteína intracelular se realizó siguiendo la metodología de Nandakumar y Marten (2002). Se utilizaron 0.3 gramos de biomasa liofilizada por muestra. Las muestras

fueron molidas en mortero utilizando nitrógeno líquido. El material molido fue suspendido en 5 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 200mM conteniendo EDTA 20mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y Ditiotreitól (DTT) 10 mM). Las muestras se dejaron 30 minutos a -20 °C con agitación en Vórtex de 1 minuto al inicio, a la mitad y al final de la incubación. Se centrifugó a 7,000 g, 4 °C durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para precipitar la proteína, se adicionaron 0.8 gramos de ácido tricloroacético (TCA). Las muestras se dejaron 30 minutos a -20 °C con agitación en Vórtex de 1 minuto al inicio, a la mitad y al final de la incubación. Se centrifugó a 7,000 g, 4 °C por 20 minutos y se recuperó el precipitado. Para eliminar restos de TCA, el precipitado fue lavado en dos ocasiones con 5 mL de acetona fría (-20 °C) con 2-mercaptoetanol al 1%. En cada paso de lavado se centrifugó a 7,000 g, 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y la proteína intracelular precipitada fue solubilizada con 1.4 mL de buffer Tris-HCl 20 mM (pH 8). Se uso jeringa de 0.5 mL y se succionó en repetidas ocasiones (10 veces) y posteriormente se dieron 15 minutos de sonicación. La proteína fue dializada (Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit, 10 kDa NMWL) y fue concentrada 4.6 veces hasta obtener un volumen final de 0.3 mL. Finalmente, la proteína intracelular fue cuantificada por el método de BCA y repartida en viales con 50 µg para su posterior separación electroforética.

8.8.2. Extracción de proteína intracelular en CMS

El procesamiento para la obtención de proteína intracelular en CMS se realizó siguiendo la misma metodología que en CML. La diferencia fue que se utilizaron 3 g de biomasa y soporte liofilizados. Por lo tanto, las muestras fueron suspendidas con mayor volumen de buffer de extracción (15 mL) y precipitadas con 2.4 gramos de TCA. El resto de la metodología se mantuvo igual que en CML (sección 8.8.1).

8.9. Separación de proteína por SDS-PAGE

8.9.1. Proteína extracelular (secretoma)

Se procesaron viales con 50 µg de proteína extracelular liofilizada (CMS y CML) con el kit de limpieza "ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit" (1632130, Bio-Rad). Las muestras de proteína fueron solubilizadas en 40 µL de buffer de Laemmli (2x Laemmli Sample Buffer 1610737, Bio-Rad) con β-mercaptoetanol al 5%. Se uso una jeringa de 0.5 mL y se succionó en repetidas ocasiones (10 veces). Posteriormente los viales se agitaron en vórtex durante 1 min, entonces fueron calentados durante 5 minutos a 95 °C en un agitador "Termomixer comfort" (Eppendorf) y centrifugados a 10,000 rpm por 5 minutos. Las muestras de proteína

ya desnaturalizada fueron pipeteadas en geles SDS-PAGE al 12% (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad). Para tener una referencia del peso molecular, en un carril de cada gel, se adicionaron 5 µL de marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards 1610373, Bio-Rad). Cada electroforesis corrió a 300 V en una cámara Mini-PROTEAN® (Tetra Cell, 2-Gel System, Bio-Rad) y una fuente de poder PowerPac™ Universal (Bio-Rad) de 500 V hasta que el frente de corrida alcanzó 3 cm de distancia. Los geles fueron lavados en tres ocasiones de 5 minutos con agua destilada y posteriormente, las proteínas se fijaron durante 30 minutos con 50 mL de solución fijadora (10% ácido acético; 45% etanol; 45% agua destilada). Transcurrido el tiempo de fijación, se realizaron dos lavados de 15 minutos con 50 mL de agua destilada, inmediatamente después, los geles fueron teñidos durante 2 horas con 50 mL de colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (1610436, Bio-Rad). Para quitar el exceso de colorante posterior a la tinción, se realizaron tres lavados de 30 minutos con 50 mL de agua destilada en agitación suave. Los geles se digitalizaron en un fotodocumentador “GelDoc EZ” de Bio-Rad con el software ImageLab. Cada carril de los geles fue fraccionado en tres secciones de 1 cm de longitud (Anexo 3). Cada fracción fue depositada en microtubos y almacenadas a 4 °C hasta su digestión con tripsina.

8.9.2. Proteína intracelular (proteoma intracelular)

La separación de proteína intracelular (CMS y CML) se realizó en geles SDS-PAGE al 12%. Debido a la metodología de extracción, el volumen de muestra con 50 µg de proteína intracelular fue diferente. Este volumen fue llevado hasta 30 µL con buffer de Laemmli. Entonces la proteína intracelular fue separada siguiendo el mismo procedimiento que con la proteína extracelular (sección 8.9.1).

8.9.3. Zimogramas de actividad inulinasa e invertasa

Se realizaron zimogramas en geles de poliacrilamida al 8% siguiendo el sistema discontinuo y semi-nativo reportado por Laemmli (1970). Una cantidad de proteína equivalente a 0.25 U de inulinasa o invertasa fue cargada por carril del gel. La electroforesis corrió a 4 °C y 100 V durante 3 horas. El peso molecular aparente de la inulinasa y la invertasa fue estimado a través de su movilidad electroforética (Rf), el cual fue comparado con el Rf del marcador de pesos moleculares “Precision Plus Protein” de Bio-Rad. Los geles fueron procesados siguiendo la metodología de Rehm *et al.* (1998). Los restos de dodecilsulfato de sodio (SDS) fueron removidos lavando los geles durante 15 minutos con una solución de acetato de sodio 50 mM (pH 5.6) que contenía Triton X-100 al 0.5 % (v/v). Los geles

fueron incubados con su sustrato correspondiente (inulina al 1 % o sacarosa 1M) solubilizado en acetato de sodio 50 mM (pH 5.6) a 50 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, los geles se lavaron repetidamente con agua destilada se sumergieron en iodoacetamida 0.1 M durante 5 minutos. Los AR fueron teñidos con una solución de cloruro de 2,3,5-trifenilterazoleo (TTC) al 0.1% (w/v) en hidróxido de sodio 1 N hasta que bandas de color rojo fueron observadas (5 minutos en oscuridad). La solución de TTC fue cambiada al 0.1% (w/v) en hidróxido de sodio 0.5 N y los geles fueron calentados a 95 °C por 1.5 minutos. La reacción de tinción fue parada adicionando ácido acético al 7.5% (v/v).

8.10. Digestión trípica

La digestión trípica se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Irapuato. El protocolo desarrollado para la digestión se basó en la metodología descrita por Shevchenko *et al.* (2007). Para esto, se tomaron piezas de gel de 1 cm (Anexo 3). Cada pieza de gel se seccionó en pedacitos de aproximadamente 1 mm por lado (geles con proteína extracelular). En el caso de los geles con proteína intracelular, cada fragmento de 1 cm fue seccionado en dos partes, de las cuales se tomó una para fraccionarla en trocitos de 1 mm de lado. Los trocitos de gel fueron lavados en dos ocasiones con 200 µL de agua destilada, manteniendo agitación suave durante 15 minutos. Para desteñir las piezas de gel, se adicionaron 50 µL de acetonitrilo (ACN) 100%/bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 100 mM (1:1 v/v), con agitación durante 15 minutos. A continuación, se adicionaron 50 µL de ACN al 100% y se agitó hasta que los trocitos de gel estuvieron deshidratados (15 minutos) en este momento, se retiró el ACN y se secó al vacío (Centrivap, Labconco). Las piezas de gel fueron rehidratadas con 50 µL de DTT 10 mM en NH_4HCO_3 100 mM, se incubaron a 56 °C con agitación durante 45 minutos. El exceso de líquido fue removido y se agregaron 100 µL de ACN al 50% en NH_4HCO_3 100 mM (1:1 v/v) y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se removió toda la solución y las proteínas fueron alquiladas adicionando 50 µL de iodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 100 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se cambió la solución por ACN al 50% en NH_4HCO_3 100 mM (1:1 v/v) y se incubó con agitación durante 15 minutos. Finalmente, el líquido fue removido y las piezas de gel se deshidrataron con 50 µL de ACN 100%. Después de 15 minutos, éstas fueron secadas al vacío. Las piezas de gel fueron rehidratadas con 10 µL de solución de tripsina

grado secuenciación (Promega) con concentración de 10 ng/μL en NH₄HCO₃ 50 mM. Se incubaron a 4 °C durante 1 hora. A continuación, se agregaron 20 μL de NH₄HCO₃ 50 mM y se incubó toda la noche a 37 °C. Para recuperar los péptidos, se retiró el sobrenadante de la digestión, el cual se colocó en tubos de 0.6 mL. Para maximizar la extracción de los péptidos, las piezas de gel se lavaron dos veces con 50 μL de ACN 50% con ácido fórmico 5% y posteriormente con 50 μL de ACN 100% con ácido fórmico 5% (2:1 v/v). Entre cada paso de lavado, las muestras se incubaron con agitación por 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado y depositado en los tubos de 0.6 mL. Las muestras de péptidos fueron secadas al vacío y almacenadas a -20 °C hasta su análisis por LC-MS/MS. En CML se procesaron y analizaron 4, 4 y 3 réplicas biológicas de proteína extracelular (cada carril de gel corresponde a una réplica biológica) para las condiciones de 20, 40 y 60 g/L, respectivamente. En CMS se procesaron 2, 4, 4, 4 y 4 réplicas biológicas de proteína extracelular para las condiciones de 20, 40, 60, 120 y 60 g/L, respectivamente. El proteoma intracelular de CML y CMS se procesó y analizó por duplicado en cada una de las condiciones.

8.11. LC-MS/MS

8.11.1. Proteína extracelular (secretoma)

Los péptidos obtenidos de la digestión trípica fueron solubilizados con 16 μL de solución de ACN 3% en ácido fórmico al 0.1%. Para la separación de los péptidos se utilizó un sistema de cromatografía líquida de nano-flujo (nanoAcquity UPLC[®], Waters[®]) acoplado a un espectrómetro de masas de tipo trampa de iones lineal (LTQ Velos, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) y equipado con una fuente de iones nanoelectrospray (nano-ESI). Se emplearon dos solventes para la separación de los péptidos con un método de gradiente. Solvente A: ácido fórmico al 0.1% y solvente B: ACN al 100% en ácido fórmico al 0.1%. Los péptidos (8 μL de muestra) fueron pasados a través de una pre-columna (Symmetry[®] C18, 5 μm, 180 μm x 20 mm, Waters) usando un flujo de solvente A de 10 μL/min durante 1 minuto. Posteriormente, el flujo se cambió a una columna capilar de UPLC de 100 μm de diámetro interno y 1.7 μm de tamaño de partícula (ACQUITY UPLC M-Class Peptide BEH C18 Column, 130Å, 1.7 μm, 100 μm X 100 mm, 1/pk, Waters) con temperatura de la columna controlada a 35 °C. Los péptidos fueron separados con un método de gradiente con flujo de 0.4 μL/min. El gradiente fue programado para que la solución B pase de 3 a 40% en 60 minutos, seguido de 2 minutos para llegar al 85%. Se mantiene constante durante 10 minutos. Después, en 2 minutos desciende al 3% y se mantiene así durante 26

minutos. Los péptidos se eluyeron en la fuente de iones del espectrómetro de masas a través de una punta estándar revestida de sílice (NewObjective, Woburn, MA). El espectrómetro de masas fue operado en modo de adquisición dependiente de datos para alternar automáticamente entre el escaneo completo (400-1600 m/z) y los siguientes escaneos (Top 5 MS/MS) en la trampa de iones lineal con exclusión dinámica habilitada. La CID fue realizada usando helio como gas de colisión, con energía de colisión del 35% y tiempo de activación de 10 ms. La adquisición de datos fue realizada con “Xcalibur 2.0.7 software” (Thermo Fisher Scientific).

8.11.2. Proteína intracelular (proteoma intracelular)

Los péptidos obtenidos de la digestión triptica fueron solubilizados con 12 μL de solución de ACN 3% en ácido fórmico al 0.1%. Para la separación e identificación de los péptidos se utilizaron los mismos instrumentos que con el secretoma. Los péptidos (8 μL de muestra) fueron pasados 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 solvente A durante 1 minuto. Con la finalidad de tener una mejor separación que en las muestras del secretoma, el flujo se cambió a una columna capilar de UPLC de 75 μm de diámetro interno y 1.8 μm de tamaño de partícula (ACQUITY UPLC M-Class HSS T3 Column, 100Å, 1.8 μm , 75 μm X 150 mm, 1/pk, Waters) con temperatura de la columna controlada a 35 °C. Los péptidos fueron separados con un método de gradiente con flujo de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. El gradiente fue programado para que la solución B pase de 3 a 40% en 60 minutos, seguido de 5 minutos para llegar al 85%. Se mantiene constante durante 5 minutos. Después, en 5 minutos desciende al 3% y se mantiene así durante 25 minutos. Los péptidos se eluyeron en la fuente de iones del espectrómetro de masas y el proceso continuó siguiendo la metodología desarrollada en las muestras del secretoma.

8.12. Análisis bioinformático

Los archivos (.RAW) con los espectros de masas fueron convertidos a formato abierto (.mzXML) con el programa MSConvertGUI v3.0.19113-cee25be0b de ProteoWizard (Kessner *et al.*, 2008). Se descargó el proteoma de *Aspergillus brasiliensis* (12982 secuencias, 08/09/2019) a partir de UniProtKB. Algunos autores recomiendan usar los proteomas depositados en UniProtKB, ya que es una base de datos ligada a múltiples fuentes de información funcional y favorece la anotación de proteínas (Carvalho *et al.*, 2016). Posteriormente, se construyó una base de datos de secuencias “objetivo-señuelo” (Target-Decoy) invirtiendo las 12,982 secuencias del proteoma y se concatenaron con el

proteoma original. Todos los espectros MS/MS fueron comparados contra la base de datos “objetivo-señuelo” con el motor de búsqueda Comet 2018.01rev.4 (Eng *et al.*, 2015). Los parámetros usados para los espectros fueron: se permitió la pérdida de 2 sitios de corte, tolerancia de péptidos de 50 ppm, tolerancia de iones de fragmentos de 0.8 Da, modificación fija para carboxi-amidometilación de cisteína (+57 Da) y modificaciones variables de oxidación de metionina (+16 Da) y desamidación de asparagina o glutamina (+0.98 Da). Se determinó una significancia estadística para todas las proteínas de todas las muestras con una tasa de detección falsa (False Discovery Rate, FDR) de 1% usando el programa Trans-Proteomic Pipeline (TPP, v5.2.0 Flammagenitus) (Keller *et al.*, 2005). Como parte inicial del análisis funcional, a cada proteína identificada se le asignaron identificadores únicos que ligaran a las proteínas y genes a las bases de datos de UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>), EsembleFungi (proyecto a cargo de EMBL: European Bioinformatics Institute (EBI) y el Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI)) (<https://www.ensembl.org/index.html>), la base de datos del genoma de *Aspergillus* (AspGD) (<http://www.aspergillusgenome.org/>) y KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>).

Las proteínas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML presentan nombre (“Protein name”) o son no caracterizadas (“Uncharacterized”), de acuerdo con su función según la base de datos UniProtKB. Para reclasificar a las proteínas no caracterizadas se realizó un BLASTp contra una base de datos personalizada construida con 107 proteomas de hongos filamentosos del orden Eurotiales descargados de UniProtKB. Después del BLASTp, se seleccionaron aquellas proteínas con mejores resultados, basados en un conjunto de parámetros optimizados (“length”: longitud del alineamiento, “qlen”: longitud de la proteína “query”, “nident”: número de aminoácidos idénticos, “mismatches”: número de aminoácidos no idénticos, “pident”: porcentaje de identidad y “evaluate”). A partir de estos resultados, a cada proteína no caracterizada se le asignó un nuevo nombre (según la función de los ortólogos en otras especies) elegido por consenso y predominancia en proteínas de otros hongos filamentosos.

Para confirmar la presencia de proteínas secretadas y predecir la vía de secreción, los identificadores se mapearon contra todas las proteínas de *A. niger* reportadas por Vivek-Ananth *et al.* (2018). La localización subcelular y la vía de secreción fue sustentada en la identificación de péptido señal, dominios transmembrana, señal de retención en retículo endoplásmico y anclajes GPI (glicosilfosfatidilinositol) usando herramientas como SignalP 4.1, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), TMHMM

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), big-PI
(https://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html), PredGPI
(<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/predgpi/>). WoLF PSORT 0.2 (<https://wolfpsort.hgc.jp/>),
Protcomp 9 (<http://www.softberry.com/>), FunSecKB2
(<http://proteomics.yosu.edu/secretomes/fungi2/index.php>) y TargetP 1.1
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/index.php>). La siguiente parte del análisis funcional consistió en la identificación de las vías metabólicas asociadas a las proteínas identificadas (KEGG), seguido de una clasificación de las enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos (CAZy) (<http://bcbl.unl.edu/dbCAN2/blast.php>) y la anotación funcional basada en Ontología genética (GO) (<http://geneontology.org/>).

8.13. Clasificación y regulación de proteínas identificadas en el proteoma

Las proteínas identificadas en el proteoma de CMS y CML fueron clasificadas como únicas, abundantes no reguladas y reguladas. Se consideraron proteínas únicas todas las que fueron identificadas solo en una concentración de sacarosa en cualquiera de los dos sistemas de cultivo. Debido al número de proteínas (en CMS mucho mayor que en CML) y la baja abundancia de las proteínas dentro de cada proteoma, fueron consideradas para los resultados y discusión únicamente las proteínas por encima del percentil 50 y 25 del total de proteínas identificadas en CMS y CML, respectivamente. La abundancia y la regulación de las proteínas se estimó con base en la cuenta espectral ponderada (CEP) por mL de medio. La CEP se calculó siguiendo la metodología reportada por Volke-Sepúlveda *et al.* (2016) y Salgado-Bautista *et al.* (2020):

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

Donde: SpC corresponde al número de espectros de masa por mL de extracto proteico (para la proteína *i*) y L corresponde a la longitud (número de aminoácidos) de la proteína *i*. Para conocer el nivel de regulación de cada proteína, se graficaron los valores normalizados de la CEP obtenidos con cada concentración de sacarosa estudiada contra los valores normalizados de la concentración de sacarosa (Anexo 4). La normalización fue realizada de acuerdo con el máximo valor de la CEP y la máxima concentración de sacarosa, respectivamente. Para el ajuste de los datos se utilizó el modelo de regresión por mínimos cuadrados. Las proteínas con $R^2 > 0.75$ fueron consideradas reguladas. Todas las proteínas con pendiente positiva se definieron como sobre-reguladas, mientras que las proteínas con

pendiente negativa fueron definidas como bajo-reguladas. Las proteínas abundantes reguladas encontradas por encima del percentil 90 y 75 del total de proteínas identificadas, fueron consideradas para la discusión de resultados en CMS y CML, respectivamente. Las proteínas de CMS y CML con $R^2 < 0.75$, pero incluidas por encima del percentil 90 del total de proteínas identificadas fueron consideradas como abundantes no reguladas e incluidas en la discusión de resultados.

8.14. Métodos analíticos

8.14.1. Cuantificación de azúcares

La concentración de azúcares totales en el medio al inicio y al final de los CMS y CML fue determinada mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) utilizando sacarosa como estándar (2.5 g/L).

Se pipeteó 1 mL de muestra (con la dilución necesaria para que la absorbancia medida estuviera dentro de la curva) en tubos de ensayo perfectamente limpios. Los tubos se dejaron reposar en baño de hielo durante 15 minutos. Se adicionaron 2 mL de reactivo fenol-sulfúrico (1 mg/mL) por las paredes de cada tubo. Los tubos fueron agitados manualmente en baño de hielo y se incubaron en baño maría a 92 °C durante 8 minutos. Al final, los tubos se enfriaron al abrigo de la luz y se midió la absorbancia a 480 nm empleando un blanco con 1 mL de agua destilada que fue procesado de la misma manera que las muestras.

8.14.2. Determinación de actividad inulinasa e invertasa

Los ensayos de actividad enzimática fueron realizados con extractos crudos (proteína extraída de CMS y CML y almacenada a -20 °C) midiendo la concentración de azúcares reductores (AR) liberados debido a la actividad enzimática. La mezcla de reacción consistió en adicionar 0.1 mL de extracto proteico en un tubo de ensayo y 0.9 mL de sustrato, sacarosa 0.1 M (Aranda *et al.*, 2006), o inulina al 1% (Abd El Aty *et al.*, 2014), solubilizado en buffer acetato (0.1 M pH 5). La mezcla de reacción fue incubada a 50 °C durante 15 minutos y la reacción fue detenida adicionando 1.5 mL de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS). Los AR liberados fueron cuantificados por el método de Miller *et al.* (1960). La unidad de actividad inulinasa o invertasa (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de AR por minuto, bajo las condiciones del ensayo.

8.14.3. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína en los extractos crudos de CMS y CML fue determinada utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA protein assay kit 23227, Thermo Fisher Scientific) utilizando albumina de suero bovino como estándar. Para esto, la proteína extracelular fue diafiltrada (Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit, 10 kDa NMWL), y el retenido fue disuelto en buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7.2). El contenido de proteína en las muestras concentradas también fue determinado por BCA. En ambos casos se siguieron las indicaciones establecidas en el protocolo del proveedor.

8.14.4. Cuantificación de biomasa

La biomasa recuperada en CML por filtración (Whatman No. 41) fue lavada con 100 mL de agua destilada y cuantificada por gravimetría (60 °C, 24 horas).

8.14.5. Cuantificación de pH

Los valores de pH en CML fueron medidos con potenciómetro (PHS-3BW, BANTE Instruments).

8.14.6. Cuantificación de humedad

El contenido de humedad en CMS fue determinado con una termobalanza (MB45, OHAUS). Se colocó 1 g de materia húmeda que fue llevada a peso constante a 130 °C.

8.15. Análisis estadístico

Las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas usando análisis de varianza de dos factores (ANOVA). La comparación entre medias fue realizada con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Los análisis fueron realizados con el software SPSS statistics, versión PASW22 (IBM SPSS-IBM Corp).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el proteoma de *A. brasiliensis* en dos diferentes sistemas de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa. Para ello, primero se evaluó un amplio rango de concentraciones. El crecimiento de *A. brasiliensis* fue cuantificado de forma indirecta a través de la medición en línea de la producción de CO₂. Se determinaron parámetros asociados con la producción de CO₂, así como las actividades inulinasa e invertasa por ser enzimas asociadas al crecimiento de *A. brasiliensis* e inducidas por la presencia de sacarosa en el medio. Con base en la información obtenida, se definieron la concentración inicial de sacarosa y el tiempo de muestreo para los cultivos destinados al análisis del proteoma: primero fue obtenido e identificado el secretoma y posteriormente se identificó el proteoma intracelular obtenido a partir de la biomasa producida en los CMS y CML. El secretoma y el proteoma intracelular obtenidos en cada sistema de cultivo fueron unidos para hacer el análisis bioinformático como el proteoma completo para CMS y CML, respectivamente.

9.1. Cinéticas de crecimiento de *A. brasiliensis* en CMS y CML

El crecimiento y la producción de enzimas por hongos filamentosos están influenciados por diferentes factores, incluyendo el sistema de cultivo, el pH y temperatura, el tipo y concentración de nutrientes; así como, la fuente de carbono (Alves *et al.*, 2013). Todos estos factores cambian con el tiempo en cultivos en lote, por lo tanto, es importante caracterizar los cultivos cinéticamente; tal caracterización permite establecer criterios de muestreo para la producción de enzimas asociadas al crecimiento, biomasa y metabolitos (Volke-Sepulveda *et al.*, 2016).

Debido a que las hifas de los hongos crecen unidas sobre y dentro del soporte sólido, estimar la biomasa en CMS es una tarea difícil e imprecisa. La medición de la producción de CO₂ es un enfoque útil para estimar de forma indirecta el crecimiento de hongos ya que la producción de CO₂ es proporcional al crecimiento desde el inicio hasta el final de la fase de crecimiento exponencial (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). Por lo tanto, el crecimiento de *A. brasiliensis* en CMS y CML fue evaluado indirectamente a través de la medición en línea de la producción de CO₂ (Figura 9). La medición en línea permitió calcular parámetros cinéticos para determinar el efecto de la concentración de sacarosa y del sistema de cultivo sobre el crecimiento del hongo. El tiempo de fase Lag, estimado a partir de la gráfica del logaritmo natural de la producción de CO₂ en función del tiempo fue de 1.5 a 1.7 veces mayor en CML que en CMS (Figura 9A), y resultó independiente de la concentración de

sacarosa en CMS, mientras que aumentó con la concentración de sacarosa en CML. En especies del género *Aspergillus*, tiempos de fase *Lag* cortos (<24 horas) ocurren a 25-30 °C y $a_w > 0.94$ (Astoreca *et al.*, 2007). Para *A. niger* se reportaron tiempos de fase *Lag* mayores en CML que en CMS durante la producción de invertasa (Balasubramaniam *et al.*, 2001).

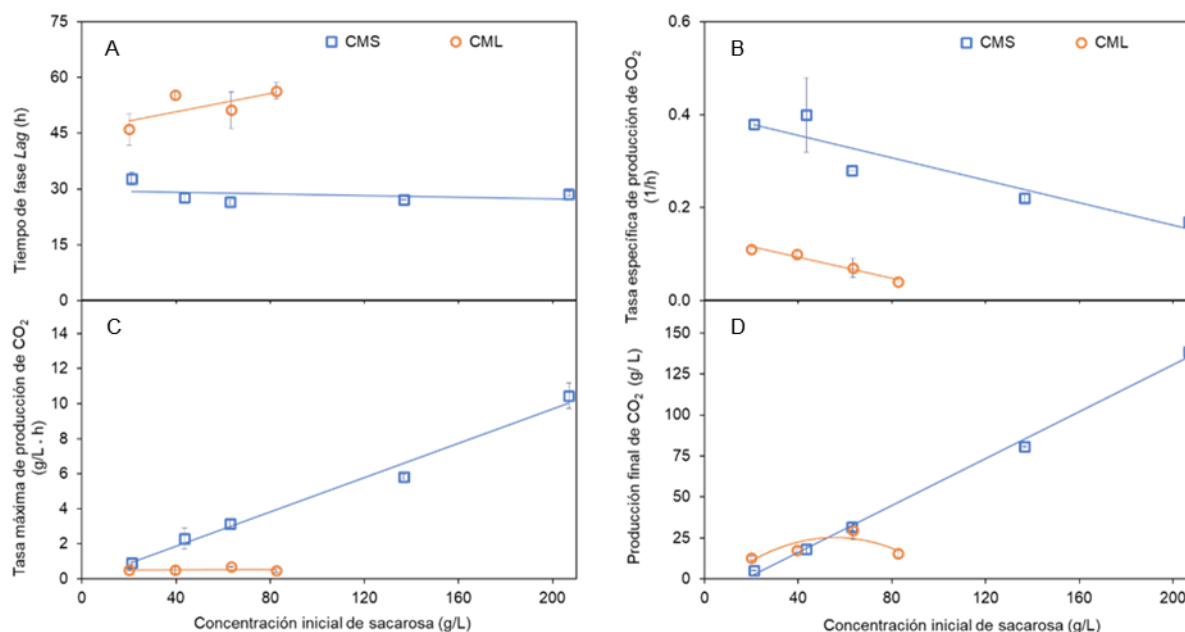


Figura 9. Parámetros cinéticos estimados a partir de la producción de CO₂ por *A. brasiliensis* en CMS y CML. A) tiempo de fase *Lag*, B) tasa específica de producción de CO₂ (μCO_2), C) tasa máxima de producción de CO₂ y D) producción final de CO₂.

La μCO_2 resultó de 3.6 a 10 veces mayor en CMS comparada con la obtenida en CML para todas las concentraciones de sacarosa evaluadas (20 a 210 g/L y 20 a 80 g/L en CMS y CML, respectivamente). La μCO_2 fue 4 veces mayor en CMS que en CML cuando la concentración inicial de sacarosa en ambos tipos de cultivo fue de 60 g/L (Figura 9B). Se registró una reducción del 40% en la μCO_2 debido al incremento en la concentración inicial de sacarosa debido a inhibición por sustrato. Se estimó la constante de inhibición (K_i) de acuerdo con la ecuación de Andrews para inhibición por sustrato en cultivos en lote (Andrews, 1968). La K_i obtenida en CMS (118 ± 3 g/L) fue 3 veces mayor que la obtenida en CML (39 ± 1 g/L), lo cual significa que la inhibición por sustrato en CMS fue 3 veces menor que en CML. La TMPC en CMS es hasta 20 veces mayor que en CML (Figura. 9C). En CMS, la TMPC aumentó hasta 12 veces debido al incremento en la concentración inicial

de sacarosa, mientras que en CML fue casi independiente de la concentración de sacarosa. Además, el tiempo de cultivo en el que se alcanza la TMPC (Anexo 2) dependió de la concentración de sacarosa y fue, al menos, 50% menor en CMS que en CML. Estos resultados muestran que el crecimiento de *A. brasiliensis*, estimado a partir de la medición en línea de la producción de CO₂, cambia dependiendo del sistema de cultivo y corroboran que la inhibición por sustrato es menor en CMS que en CML. Por ejemplo, *Paecilomyces fumoroseus* produce 61% más biomasa en menos tiempo (70 horas vs 100 h) en CMS comparado con CML, usando glucosa (20 g/L) como fuente de carbono en ambos sistemas de cultivo (Asaff *et al.*, 2006). Del mismo modo, datos del crecimiento de *A. niger* en CMS y CML, utilizando sacarosa (100 g/L) como fuente de carbono, mostró 67% más biomasa y mayor velocidad de crecimiento en CMS que en CML (Romero-Gómez *et al.*, 2000). El mejor crecimiento de *A. brasiliensis* en CMS puede estar relacionado con una mayor transferencia de oxígeno a las células y baja inhibición por sustrato. En CMS, las hifas fúngicas crecen unidas sobre y dentro del soporte sólido que está cubierto por una fina capa de líquido, y las células microbianas están en estrecho contacto con el oxígeno gaseoso que fluye en el espacio entre partículas del reactor (Thibault *et al.*, 2000). Por tanto, los espacios entre partículas facilitan la transferencia de oxígeno a las células (Oostra *et al.*, 2001) y reducen la inhibición por sustrato (Viniestra-González *et al.*, 2003).

La producción final de CO₂ en CMS aumentó hasta 26.5 veces desde la concentración inicial de sacarosa de 20 a 210 g/L (Figura 9D). El efecto de la elevada concentración de sustrato sobre la producción de CO₂ por *A. brasiliensis* bajo condiciones de CMS se reportó previamente (Volke-Sepulveda *et al.*, 2016). Por otro lado, incrementar la concentración de sacarosa en CML afecta negativamente la producción final de CO₂, ya que el valor más alto en CML (29.52 ± 5.42 g/L) se obtuvo en el medio con 60 g/L de sacarosa (Figura 9D) y este valor es 4.7 veces menor que el máximo alcanzado en CMS.

El consumo de sacarosa y la producción de proteína por *A. brasiliensis* son dependientes del sistema de cultivo y de la concentración inicial de sacarosa en el medio (Tabla 5). En CMS *A. brasiliensis* consumió más del 99% del sustrato en todas las concentraciones de sacarosa evaluadas. Mientras que en CML *A. brasiliensis* consumió el 98% del sustrato, únicamente cuando la concentración inicial de sacarosa en el medio fue de 20 a 60 g/L y el 81% del sustrato fue consumido después de 110 horas de cultivo en medios con 80 g/L de sacarosa inicial. La velocidad de consumo de sacarosa, calculada desde el final de la fase *Lag* hasta el final del cultivo, también fue sensible a cambios en la concentración de

sacarosa (Tabla 5). Ésta fue hasta 5.8 veces mayor en CMS que en CML cuando comparamos la misma concentración de sacarosa inicial (60 g/L).

Tabla 5. Consumo de sacarosa y producción de proteína por *A. brasiliensis* cultivado en CMS y CML con diferente concentración inicial de sacarosa*.

Cultivo	Sacarosa inicial (g/L)	Tiempo de cultivo (h)	Consumo de sacarosa (%)	Velocidad de consumo de sacarosa (g/L h)	Proteína extracelular (g/L)
CML20	20.03 ^a ± 1.04	84.60 ^e ± 1.84	99.03 ^b ± 0.10	0.54 ^a ± 0.12	0.03 ^a ± 0.02
CML40	39.57 ^b ± 0.62	84.73 ^e ± 0.42	98.81 ^b ± 0.12	1.34 ^a ± 0.05	0.08 ^a ± 0.01
CML60	63.38 ^c ± 2.92	109.57 ^f ± 0.05	98.19 ^b ± 0.28	1.07 ^a ± 0.04	0.15 ^a ± 0.03
CML80	82.56 ^d ± 4.46	109.70 ^f ± 0.05	81.58 ^a ± 3.68	1.27 ^a ± 0.18	0.16 ^{ab} ± 0.04
CMS20	21.14 ^a ± 0.21	36.96 ^a ± 0.05	99.18 ^b ± 0.09	7.17 ^b ± 3.70	0.39 ^b ± 0.04
CMS40	43.53 ^b ± 1.83	42.97 ^b ± 0.05	99.43 ^b ± 0.05	2.89 ^{ab} ± 0.38	0.94 ^c ± 0.04
CMS60	62.93 ^c ± 0.53	48.83 ^c ± 0.05	99.39 ^b ± 0.03	2.80 ^{ab} ± 0.11	1.24 ^d ± 0.08
CMS140	136.78 ^e ± 1.69	59.97 ^d ± 0.05	99.48 ^b ± 0.03	4.14 ^{ab} ± 0.05	1.03 ^{cd} ± 0.05
CMS210	206.82 ^f ± 0.86	61.57 ^d ± 0.05	99.60 ^b ± 0.08	6.25 ^b ± 0.10	1.18 ^{cd} ± 0.10

* Letras diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones de sacarosa ($p < 0.05$, prueba de Tukey). El análisis de varianza (ANOVA) fue realizado considerando los datos de ambos sistemas de cultivo.

La concentración de proteína extracelular fue hasta 7.3 veces mayor en CMS que en CML con la mayor concentración de sacarosa evaluada en cada sistema de cultivo (Tabla 5). También, resultó 8.2 veces mayor en CMS que en CML cuando comparamos la misma concentración de sacarosa inicial (60 g/L). La elevada producción de proteína extracelular obtenida en CMS puede correlacionarse con el elevado nivel de ramificación de *A. brasiliensis* en condiciones de CMS (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Por otro lado, con base en los resultados de consumo de sacarosa y producción de CO₂ al final de los cultivos, se calculó el rendimiento molar de CO₂/sacarosa ($Y_{CO_2/S}$) para cada sistema de cultivo (Figura 10). El $Y_{CO_2/S}$ depende fuertemente del tipo de cultivo y la concentración inicial de sacarosa, mientras que en CMS el $Y_{CO_2/S}$ incrementa cerca de 3 veces a medida que la concentración de sacarosa aumenta de 20 a 210 g/L; en CML disminuye alrededor de 1.5 veces a medida que la concentración de sacarosa aumenta de 20 a 80 g/L. En CMS, el máximo valor de $Y_{CO_2/S}$ (0.66 ± 0.10) se obtuvo con 210 g/L de sacarosa, lo cual es muy cercano al máximo rendimiento teórico (0.66 Cmol/Cmol) estimado cuando biomasa, CO₂ y agua son los únicos productos metabólicos finales. Un incremento en $Y_{CO_2/S}$ debido al incremento en la concentración de glucosa se observó durante un CMS de *Mucor bacilliformis* (Lareo *et al.*, 2006). El incremento en el $Y_{CO_2/S}$ en CMS puede ser explicado por el hecho de que la elevada concentración de glucosa favorece las actividades catabólicas y mejora el flujo de carbono

a través de la vía de las pentosas fosfato (Volke-Sepulveda *et al.*, 2016). Se sabe que los cambios en el metabolismo de la fuente de carbono están sujetos a diferentes niveles de regulación, por ejemplo, regulación transcripcional y de metabolitos durante el crecimiento normal y en respuesta al estrés oxidativo (Stincone *et al.*, 2015). En CML, el valor más alto de $Y_{CO_2/S}$ (0.49 ± 0.08) se obtuvo con 20 g/L y su disminución no puede ser explicada a través del $Y_{X/S}$ ya que la producción de biomasa también disminuye a medida que la concentración de sacarosa incrementa en el medio, similar a lo observado durante la producción de invertasa por *A. niger* (Robledo-Olivo *et al.*, 2009).

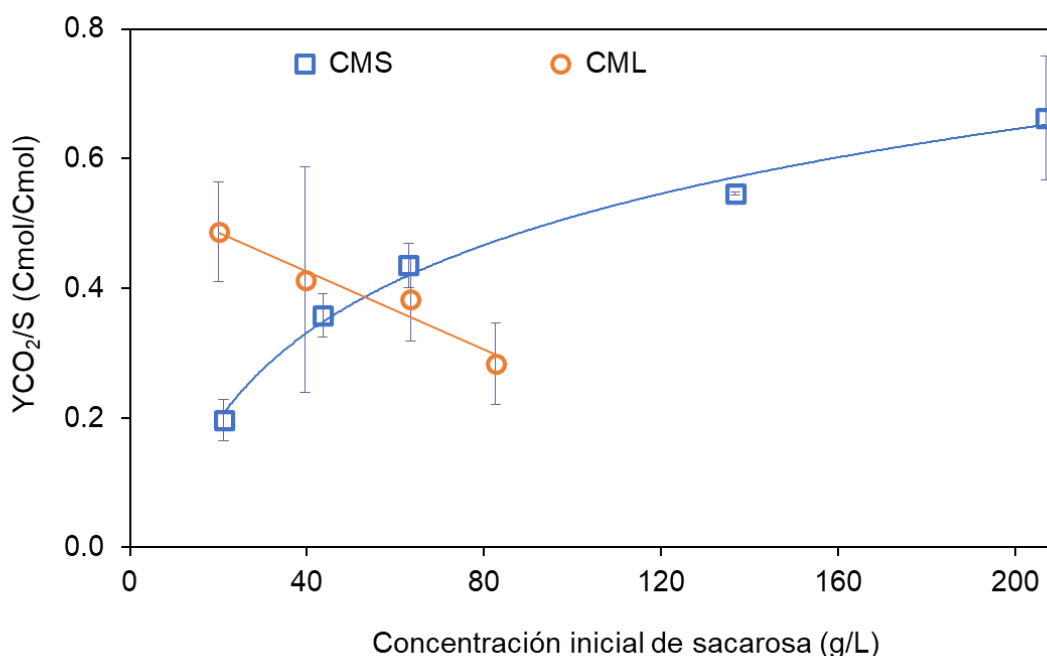


Figura 10. Rendimiento molar de producción de CO_2 y consumo de sacarosa ($Y_{CO_2/S}$) en función de la concentración inicial de sacarosa.

Con base en los resultados anteriores, la reducción en $Y_{CO_2/S}$ y $Y_{X/S}$ en CML a medida que la concentración de sacarosa aumenta de 20 a 80 g/L puede estar relacionada con la producción de metabolitos extracelulares, como ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido oxálico) y polioles (glicerol y eritritol) (Steiger *et al.*, 2019). Adicionalmente, el $Y_{CO_2/S}$ de *A. brasiliensis* obtenido en CML es similar al reportado para *Yarrowia lipolytica* en CML donde los rendimientos $Y_{X/S}$ y $Y_{CO_2/S}$ (C-mol) fueron 0.67 y 0.30, respectivamente, sin acumulación de metabolitos (Timoumi *et al.*, 2017).

9.2. Producción de inulinasa e invertasa en CMS y CML

La producción de inulinasa e invertasa en CMS y CML fue evaluada con diferente concentración inicial de sacarosa. La actividad enzimática en ambos sistemas de cultivo fue determinada al final de los cultivos (Tabla 5), cuyo tiempo de muestreo fue establecido basado en el análisis en línea de la producción de CO₂. La actividad enzimática fue 7 veces (invertasa) y 5 veces (inulinasa) mayor en CMS que en CML, respectivamente. La producción de estas dos enzimas fue fuertemente dependiente de la concentración de sacarosa y del sistema de cultivo (Figura 11). En CMS la producción de inulinasa e invertasa incrementó 1.78 y 3.76 veces, respectivamente, cuando la concentración de sacarosa aumentó de 20 a 210 g/L, alcanzando la máxima actividad (5.88 ± 0.78 U/mL para inulinasa y 41.69 ± 3.60 U/mL para invertasa) en el medio con 210 g/L. Por el contrario, en CML la concentración de sacarosa no tuvo efecto significativo en la producción de inulinasa, obteniendo la máxima actividad de 1.13 ± 0.02 U/mL. Similar a lo observado en CMS, la producción de invertasa aumentó 1.5 veces con el aumento de la concentración de sacarosa, obteniendo la máxima actividad (5.84 ± 0.12 U/mL) con 60 g/L. La producción de enzimas en CMS indicó que bajo las condiciones estudiadas no hay represión catabólica, ya que la producción de ambas enzimas aumenta al intensificar la concentración de sacarosa de 20 a 210 g/L. En este estudio, la a_w inicial en CMS disminuyó de 0.99 a 0.96 con el aumento en la concentración de nutrientes (sacarosa, 20-210 g/L), sin perjudicar la producción de inulinasa o invertasa.

Los resultados anteriores muestran que los cambios en la humedad inicial y valores de a_w debido al incremento en los componentes del medio de cultivo no afectan el crecimiento fúngico o la producción de enzimas. Un contenido de humedad similar (58.5-64.3%) fue usado para la producción de amilasa por *A. niger* (Carrillo-Sancen *et al.*, 2016). Es bien aceptado que los niveles de humedad en procesos en CMS varían entre 20 y 80 %, y específicamente para hongos filamentosos la humedad debe estar entre el 20 y 70% (Krishna, 2005). La humedad debe mantenerse durante todo el proceso de cultivo, ya que niveles muy bajos pueden obstaculizar el crecimiento de hongos al reducir la difusión de nutrientes, mientras que niveles muy altos pueden limitar el intercambio de gases y promover el crecimiento bacteriano. Ajustando el valor de actividad de agua de 0.99 a 0.96 se registró un incremento en la actividad invertasa (de 1.65 a 8.10 U/mL en CMS de *A. niger* con 100 g/L de sacarosa (Montiel-González *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los valores de a_w bajos (0.94) activan la señalización para la activación del gen de la glucoamilasa en *A. oryzae*, lo que produce un aumento de la actividad enzimática (Ishida *et al.*, 2000).

La actividad inulinasa de *A. brasiliensis*, expresada como unidades por gramo de soporte seco (6.48 U/gss) fue 1.5 veces mayor que la reportada por *A. terreus* usando hojas de achicoria como sustrato sólido. Sin embargo, bajo condiciones optimizadas, *A. terreus* produjo 21.05 U/gss (Abd El Aty *et al.*, 2014). La actividad inulinasa producida por *A. flavus* var. *flavus* en CMS aumentó de 3.48 a 8.57 U/gss después de la optimización del medio (Das *et al.*, 2019), y la optimización de algunos parámetros del proceso permitió a Trivedi *et al.* (2012) alcanzar títulos de inulinasa tan altos como 257.20 U/gss cultivando *A. tubingensis* en CMS con salvado de trigo y licor de maíz fermentado como sustratos. Aunque la producción de inulasas es comúnmente reprimida por la presencia de glucosa en el medio (Garuba y Onilude, 2020), los resultados de la actividad inulinasa e invertasa obtenidos en CML muestran que no hubo represión catabólica en las condiciones probadas (Figura 11). El bajo nivel de inulinasa registrado en CML puede atribuirse al hecho de que la inulina (el mejor inductor de inulinasa) no está presente en el medio de cultivo (Al-Dabbagh y Mahmood, 2015).

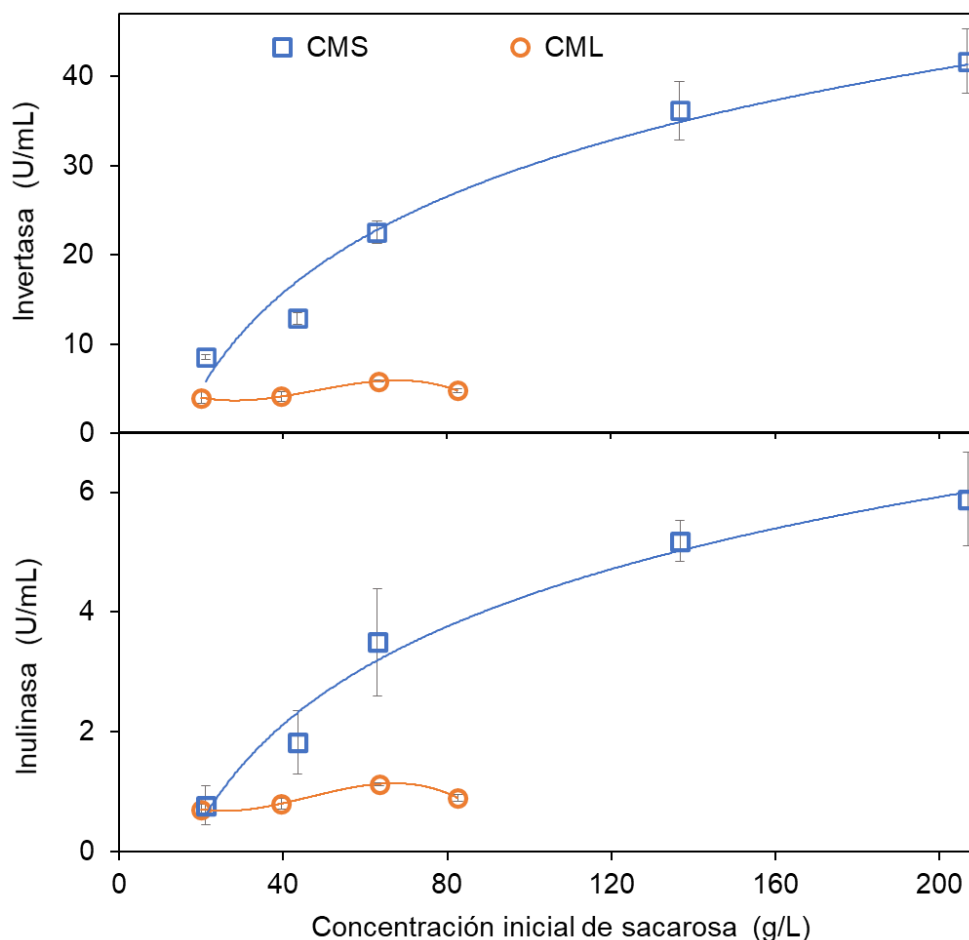


Figura 11. Producción de invertasa e inulinasa por *A. brasiliensis* cultivado en condiciones de CMS y CML con diferente concentración inicial de sacarosa.

Valores de I/S superiores a 0.01 indican mayor producción de inulinasa que de invertasa (Das et al., 2019). Los valores I/S (0.07 y 0.19) obtenidos en ambos tipos de cultivo (CMS y CML, respectivamente) mostraron el predominio de la inulinasa, independientemente de la concentración inicial de sacarosa (Tabla 6). Los resultados de I/S obtenidos con *A. brasiliensis* coinciden con los reportados para diferentes microorganismos en diferentes condiciones de cultivo, donde la inulinasa es siempre la enzima predominante (Tabla 3). La magnitud de esta relación depende de la actividad catalítica de ambas enzimas, es decir, cuanto mayor es el tamaño molecular del sustrato, menor es la eficiencia catalítica (Rouwenhorst et al., 1988). Los valores I/S mayores a 1 descritos en la Tabla 3 fueron obtenidos usando medios complejos con mezclas de diferentes fuentes de nitrógeno (Jing et al., 2003; Abd Allah AbdAl-Aziz et al., 2012; Dinarvand et al., 2013; Singh y Chauhan, 2017; Singh et al., 2018). Está reportado que las fuentes de nitrógeno orgánico (peptona y extracto de levadura) son mejores que las fuentes inorgánicas para la producción de inulinasa por *A. niger* (Germec et al., 2020).

Tabla 6. Relación I/S estimada a partir de los resultados de actividad invertasa e inulinasa obtenidos en CMS y CML de *A. brasiliensis* con diferente concentración inicial de sacarosa *.

Concentración inicial de sacarosa (g/L)	I/S	
	CMS	CML
20	0.07 ^a ± 0.04	0.18 ^b ± 0.01
40	0.14 ^{ab} ± 0.02	0.19 ^b ± 0.00
60	0.16 ^b ± 0.04	0.19 ^b ± 0.00
80	ND	0.19 ^b ± 0.00
140	0.14 ^{ab} ± 0.00	ND
210	0.14 ^{ab} ± 0.01	ND

* Letras diferentes indican diferencias significativas entre concentraciones de sacarosa ($p < 0.05$, prueba de Tukey). El análisis de varianza (ANOVA) fue realizado considerando ambos tipos de cultivo.

ND: no determinado.

Aunque la relación I/S es usada como parámetro para determinar la predominancia de cada actividad enzimática, deben hacerse estudios adicionales para caracterizar las enzimas involucradas. La electroforesis en condiciones nativas es útil para separar e identificar inulinasas extracelulares (Jing et al., 2003). Por lo tanto, se realizaron zimogramas en condiciones semi-nativas de extractos enzimáticos diafiltrados producidos en ambos sistemas de cultivo con la misma concentración inicial de sacarosa (60 g/L). *A. brasiliensis* produce una banda de inulinasa y dos bandas de invertasa en condiciones CMS y CML (Figura 12). El Rf de las inulinasas fue similar en los extractos de CMS y CML, mientras que

resultó más bajo para las dos invertasas obtenidas en CML, comparado con las invertasas producidas en CMS. Las diferencias en el Rf de las bandas de invertasa observadas en CMS y CML pueden indicar de modificaciones postraduccionales diferenciales dependiendo del sistema de cultivo. Aunque no hay estudios comparativos relacionados al efecto del sistema de cultivo en la glicosilación de proteínas, las vías de *N*-glicosilación y *O*-glicosilación son altamente conservadas en hongos (Deshpande *et al.*, 2008). De hecho, esta reportado que la glicosilación de proteínas en *A. oryzae* depende de las condiciones y tipo de cultivo (Wang *et al.*, 2010). El análisis zimográfico mostró que *A. brasiliensis* produce al menos dos enzimas involucradas en la hidrólisis de inulina y sacarosa. Sin embargo, se han reportado tres enzimas modificadoras de inulina en *A. niger* (Yuan *et al.*, 2006), y los genes homólogos para las tres enzimas están presentes en el genoma de *A. brasiliensis*. Estas enzimas no se separaron en el zimograma debido a que sus pesos moleculares son similares (55-68 kDa). También, una banda de elevado peso molecular (>250 kDa) con actividad invertasa se observó en ambos sistemas de cultivo, sugiriendo que la invertasa, pero no la inulinasa, puede formar estados oligoméricos activos. Estudios adicionales con extractos proteicos purificados deberían realizarse para caracterizar de forma separada cada una de las actividades enzimáticas.

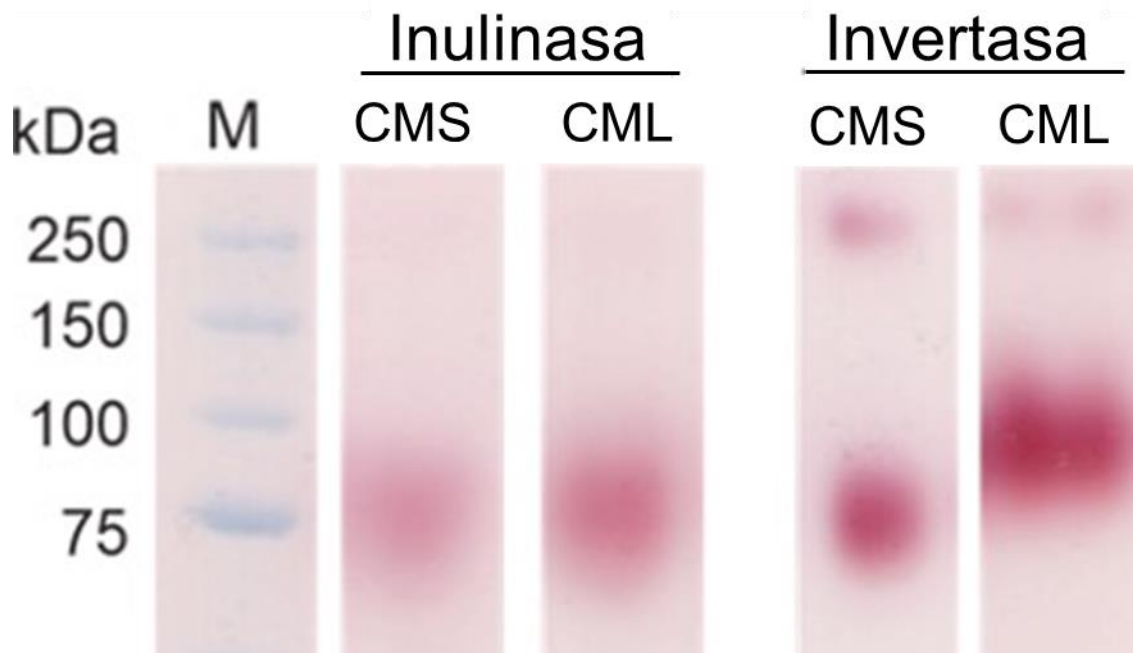


Figura 12. Análisis zimográfico de actividad inulinasa e invertasa obtenida de cultivos de *A. brasiliensis* en CMS y CML. Línea M: marcador de pesos moleculares. En todos los casos 0.25 U de actividad enzimática fueron cargadas por línea.

9.3. Proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML

Una vez caracterizado el crecimiento de *A. brasiliensis* en cada uno de los sistemas de cultivo, se definieron la concentración inicial de sacarosa y el tiempo de muestreo para los cultivos destinados al análisis del proteoma. Todas las muestras fueron tomadas en el tiempo en el que se alcanza la TMPC. Este criterio es útil para garantizar la reproducibilidad en el muestreo al tomar las muestras en un estado fisiológico definido (Volke-Sepulveda *et al.*, 2016). A continuación, se presentan los resultados obtenidos del análisis y comparación del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML y en las siguientes secciones se describe el proteoma de forma individual en CMS y CML, respectivamente.

9.4. Comparación del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML

Con la finalidad de conocer el efecto que tiene la concentración de sacarosa en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML, así como el papel que tienen las proteínas durante el crecimiento de este hongo bajo las diferentes condiciones de cultivo evaluadas, se analizó y discutió todo el proteoma obtenido (proteínas únicas, abundantes no reguladas y reguladas). Lo anterior, con base en la abundancia relativa de todas las proteínas clasificadas según el metabolismo principal en el que están involucradas (Figura 14).

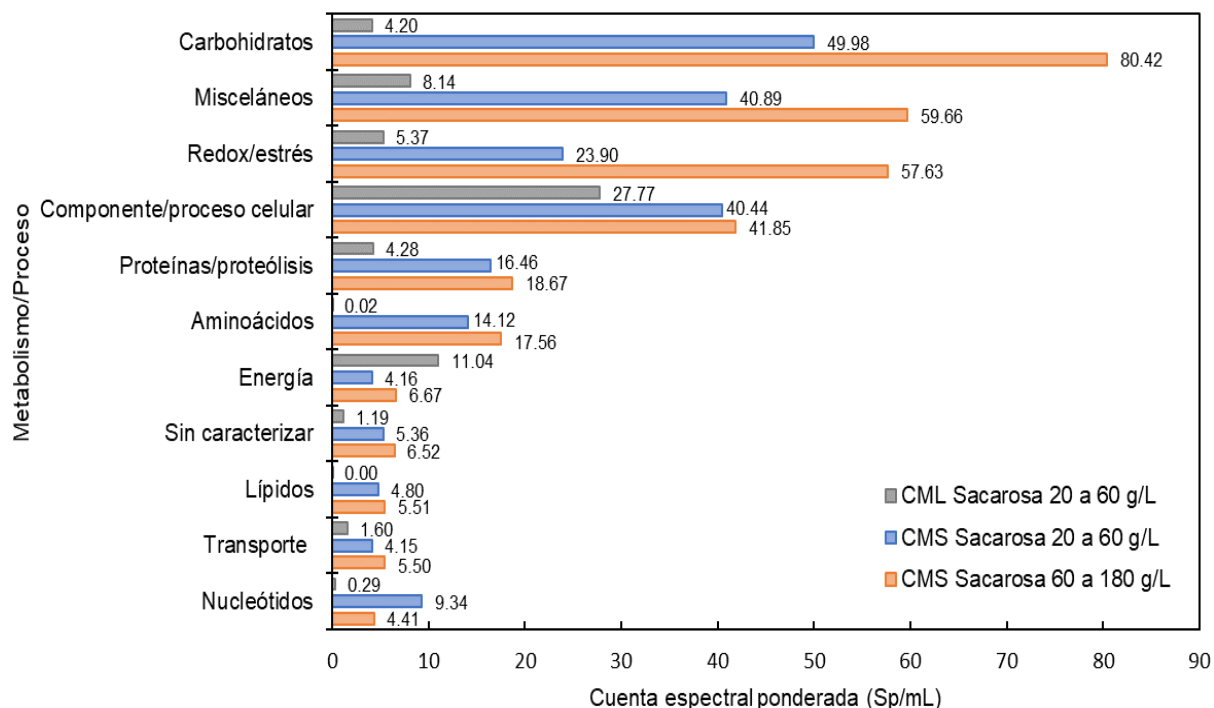


Figura 13. Clasificación del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML basada en la cuenta espectral ponderada de las proteínas únicas, abundantes no reguladas y abundantes reguladas según el metabolismo o proceso biológico en que participan.

El proteoma en CMS es 3.3 (de 20 a 60 g/L) y 4.8 (de 60 a 180 g/L) veces más abundante que en CML. En CMS se encontraron proteínas involucradas en un mayor número de procesos que en CML, en donde no se encontraron proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos. Además, la CEP de las proteínas sin caracterizar, asociadas al transporte, del metabolismo de nucleótidos y aminoácidos es tan baja que podemos considerarla despreciable en CML. El metabolismo de carbohidratos es el más abundante en CMS (49.98 y 80.42 Sp/mL con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L, respectivamente). La suma de la CEP de todas las proteínas involucradas en este metabolismo es casi 12 y 19 veces más abundante que en CML donde ocupa el sexto lugar en términos de abundancia. El grupo de proteínas clasificadas como misceláneas son el segundo grupo más abundante en CMS (40.89 y 59.66 Sp/mL con concentraciones de sacarosa de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L, respectivamente). Este grupo de proteínas en CML ocupa el tercer lugar en términos de abundancia. En el proteoma obtenido en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa, el tercer grupo de proteínas más abundante es el clasificado como componente/proceso celular (40.44Sp/mL), mientras que con 60 a 180 g/L de sacarosa, el tercer grupo de proteínas más abundante es el clasificado como redox/estrés (57.63 Sp/mL). En menor medida se encuentran los metabolismos proteínas/proteólisis y el de aminoácidos. A continuación, se discuten y comparan los metabolismos más abundantes encontrados en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con los encontrados en el proteoma en CML.

9.4.1. Proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos

Este es el grupo de proteínas más abundante en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS, mientras que en CML ocupa el sexto lugar (Figura 14). En CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa, 42 pertenecen a este grupo (13 únicas, 12 abundantes no reguladas y 17 abundantes reguladas) y, con 60 a 180 g/L de sacarosa 52 proteínas (21 únicas, 18 abundantes no reguladas y 13 abundantes reguladas) participan en el metabolismo de carbohidratos. En CML, solo 35 proteínas son del metabolismo de carbohidratos (16 son únicas, 11 son abundantes no reguladas y 8 son abundantes reguladas). En ambos tipos de cultivo se encontraron proteínas extracelulares que participan en la degradación de carbohidratos complejos. Los resultados del nivel de regulación basados en la CEP permitieron inferir el grado de represión catabólica en CMS y CML. Aunque está reportado que en CMS hay menor o nula represión catabólica comparado con CML (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006), los resultados obtenidos en este trabajo demuestran el bajo efecto represor

de la glucosa o fructosa en CML. Por ejemplo, en CML la exo-inulinasa se encuentra presente de forma abundante, mientras que una isoforma de la endo-inulinasa está sobre-regulada. Ambas enzimas participan en el metabolismo de la inulina y de la sacarosa (Guerrero-Urrutia *et al.*, 2021). El hecho de que la endo-inulinasa se sobre-regula bajo condiciones de CML demuestra que *A. brasiliensis* es resistente a la represión catabólica aun cuando la concentración de sacarosa es tan alta como 60 g/L. Está 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 CML por la presencia de glucosa (≥ 20 g/L), sacarosa (≥ 40 g/L) y glucosa/fructosa (≥ 10 g/L) en el medio, respectivamente. Aunque la glucosa es considerada como un represor de los genes que codifican para enzimas degradadoras de polisacáridos (Adnan *et al.*, 2018), en el proteoma de *A. brasiliensis* se encontraron enzimas como la endo-1,4-beta-xilanasas, la 1,4-beta-D-arabinoxilano arabinofuranohidrolasa axhA y la endoglucanasa A en abundancia, mientras que la arabinan endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa se encontró sobre-regulada en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML (Tabla A13). Por lo tanto, la alta abundancia de estas enzimas demuestra el bajo efecto represor de la glucosa y la poca o nula represión catabólica, lo cual es algo novedoso ya la glucosa (10 g/L) tiene efecto represor durante la síntesis de enzimas (Viniestra-González y Favela-Torres, 2006). En CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa también fueron abundantes y sobre-reguladas las enzimas degradadoras de carbohidratos complejos. Sin embargo, con 60 a 180 g/L de sacarosa, la beta-xilanasas, la 1,4-beta-D-arabinoxilano arabinofuranohidrolasa axhA y la endoglucanasa A fueron bajo-reguladas. La invertasa, que es la encargada de la hidrólisis de sacarosa, se encontró bajo-regulada en el proteoma con 20 a 60 g/L de sacarosa y con 60 a 180 g/L no está presente. Aunque la invertasa es bajo regulada en CMS, el resultado no se ve reflejado en términos de actividad enzimática (Figura 15) ya que fueron sobre-reguladas la endo-inulinasa (con 60 a 180 g/L de sacarosa) y la exo-inulinasa (con 20 a 60 g/L de sacarosa) en este sistema de cultivo. Además, la exo-inulinasa actúa en conjunto con la invertasa para hidrolizar a la sacarosa (Guerrero-Urrutia *et al.*, 2021). Es probable que las enzimas sufran modificaciones postraduccionales dependiendo del sistema de cultivo, lo cual podría modificar los parámetros cinéticos de las enzimas y verse reflejado en la actividad enzimática obtenida con cada sistema de cultivo, lo que abre la puerta a futuros estudios comparativos. La represión catabólica en hongos filamentosos como *A. oryzae* y *A. nidulans* ha sido estudiada a través de los factores de transcripción CreA y CreB, demostrando que estos mecanismos de regulación son dependientes del tipo de cultivo (Tamayo *et al.*, 2008;

Ichinose *et al.*, 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos permiten inferir que la expresión de los genes de las enzimas degradadoras de carbohidratos en *A. brasiliensis* no necesariamente están regulados por represión catabólica mediada por estos factores de transcripción. De este modo todas estas enzimas pueden ser candidatas para estudiar mecanismos de regulación alternos a la represión catabólica mediada por CreA.

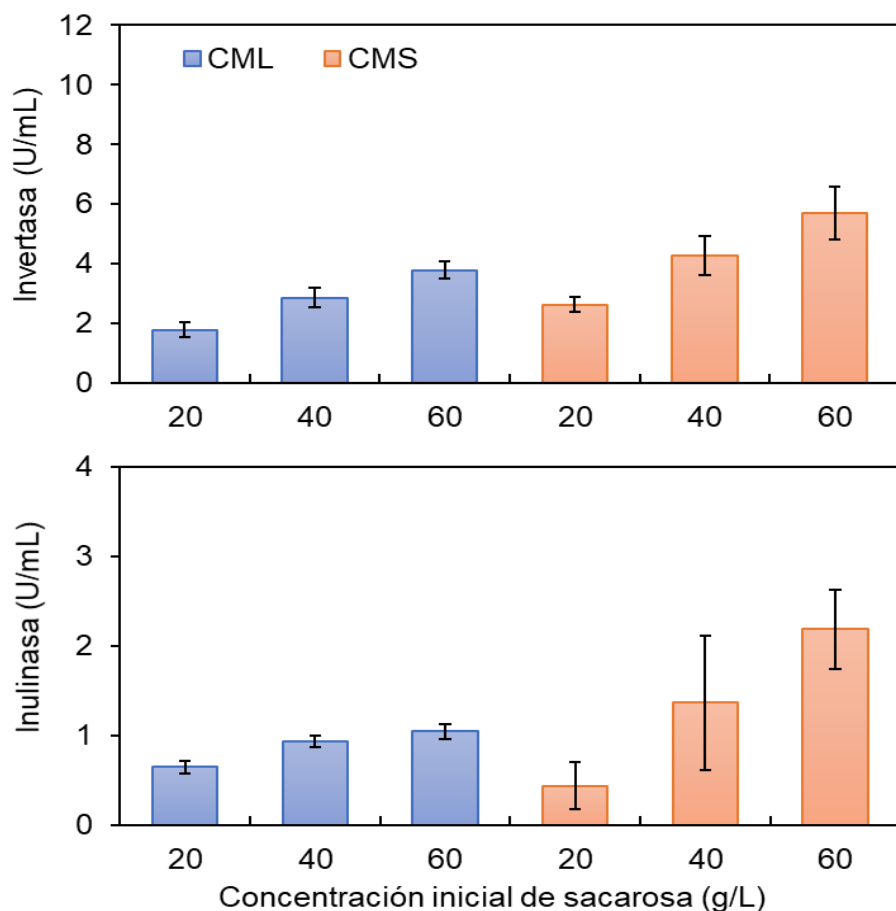


Figura 14. Producción de invertasa e inulinasa por *A. brasiliensis* cultivado en condiciones de CMS y CML con diferente concentración inicial de sacarosa. Las actividades enzimáticas fueron cuantificadas en el tiempo en el que se alcanza la tasa máxima de producción de CO₂.

Tanto el sistema de cultivo como la concentración de sacarosa tienen influencia sobre la abundancia de las proteínas, ya que en CMS las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos son casi 12 (proteoma obtenido con 20 a 60 g/L) y 19 veces (proteoma obtenido con 60 a 180 g/L) más abundantes que en CML. Esto puede atribuirse, en parte, a la morfología fúngica ya que en CMS hay mayor nivel de ramificación de las hifas que en CML (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Además, el CMS favorece la interacción entre el micelio y el sustrato, lo que mejora el crecimiento apical sobre las partículas sólidas asemejando el hábitat natural de los hongos y, en consecuencia, favorece una mayor

secreción, concentración y diversidad de proteínas (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). En el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa se identificaron 15 enzimas involucradas en el metabolismo central de la glucosa (Tablas A5, A7 y A9). De forma única y con 60 g/L de sacarosa se encontró una proteína del ciclo de Krebs (subunidad alfa de piruvato deshidrogenasa, 0.2 Sp/mL). De forma abundante y no reguladas se encontraron dos isoformas de malato deshidrogenasa (3.2 y 2.8 Sp/mL), glucosa-6-fosfato isomerasa (1.9 Sp/mL) y la transaldolasa (4.3 Sp/mL) del ciclo de Krebs, glucólisis y fase no oxidativa de la vía de las pentosas, respectivamente. La isocitrato deshidrogenasa (0.2 Sp/mL) y la ATP citrato liasa (0.3 Sp/mL) son enzimas del ciclo de Krebs que se encontraron sobre-reguladas, la transcetolasa (0.2 Sp/mL) y la ribosa/galactosa isomerasa (0.2 Sp/mL) son enzimas de la vía de las pentosas que se encontraron sobre-reguladas, mientras que la enolasa (1.5 Sp/mL) y la triosa fosfato isomerasa (3.8 Sp/mL) son las enzimas sobre-reguladas de la glucólisis.

En el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa se identificaron 14 proteínas del metabolismo central de la glucosa (Tablas A6, A8 y A10) que difieren en abundancia y regulación con las proteínas obtenidas con 20 a 60 g/L de sacarosa. La triosa fosfato isomerasa (0.5 Sp/mL), quinta enzima de la glucólisis fue producida de forma única con 180 g/L de sacarosa. De forma abundante y no regulada se encontraron la piruvato quinasa (0.2 Sp/mL), la hexoquinasa (0.2 Sp/mL) y la triosa fosfato isomerasa (2.3 Sp/mL), todas enzimas de la glucólisis. Del ciclo de Krebs se encontraron de forma abundante la isocitrato deshidrogenasa (0.2 Sp/mL), la ATP citrato liasa (0.3 Sp/mL) y dos isoformas de malato deshidrogenasa (1.3 y 3.7 Sp/mL), mientras que de la vía de las pentosas fosfato se encontraron de forma abundante no regulada la ribosa/galactosa isomerasa (0.2 Sp/mL) y la transcetolasa (0.3 Sp/mL). Las enzimas reguladas presentes en el proteoma de *A. brasiliensis* con 60 a 180 g/L de sacarosa son la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (0.2 Sp/mL, sobre-regulada) y la enolasa (1.4 Sp/mL bajo-regulada), ambas enzimas de la glucólisis. De la vía de las pentosas fosfato, se encontraron sobre-reguladas la ribosa 5-fosfato isomerasa (1.5 Sp/mL) y la transaldolasa (12.6 Sp/mL).

En CML se identificaron 10 enzimas del metabolismo central de la glucosa (Tablas A11, A12 y A13). De forma única y con baja concentración de sacarosa (20 g/L) se encontraron proteínas del ciclo de Krebs (dos isoformas de isocitrato deshidrogenasa, 7.31×10^{-3} y 4.97×10^{-3} Sp/mL, respectivamente) y de la vía de las pentosas fosfato (6-fosfogluconato deshidrogenasa y transaldolasa 6.27×10^{-3} y 1.63×10^{-2} Sp/mL, respectivamente).

Solamente fue abundante la piruvato carboxiltransferasa (0.4 Sp/mL) que participa en la transformación del piruvato en oxalacetato dando inicio del ciclo de Krebs. Por otro lado, la fosfoglicerato mutasa (0.01 Sp/mL) y la enolasa (0.6 Sp/mL) fueron sobre-reguladas mientras que la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (0.1 Sp/mL) y la fosfoglicerato quinasa (0.1 Sp/mL) fueron bajo-reguladas. La suma de la CEP de las enzimas del metabolismo central de la glucosa en CMS corresponde al 37 y 31% de la CEP total del grupo de metabolismo de carbohidratos con 20 a 60 g/L y 60 a 180 g/L de sacarosa, respectivamente. Este porcentaje es similar al observado en CML (30%).

Este análisis demuestra la presencia de las proteínas de las vías glucolítica, de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML. Aunque no se identificaron todas las proteínas de estas vías metabólicas, no necesariamente significa que las vías estén inactivas si no que los niveles de expresión disminuyen a medida que la concentración de la fuente de carbono se va agotando en el medio (Maeda *et al.*, 2004). Aunque hay enzimas de la glucólisis bajo-reguladas en CML, no son enzimas clave en la regulación de esta vía y, aunque su regulación, puede estar asociada con represión catabólica (implicada en la disminución de la expresión de genes de estas rutas) debida al incremento de la concentración de sacarosa, también podría estar asociada con la activación de otros genes involucrados en la degradación de polisacáridos (Maeda *et al.*, 2004).

9.4.2. Proteínas clasificadas como misceláneas

Este es el segundo grupo de proteínas más abundante del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS, mientras que en CML ocupa el tercer lugar (Figura 14). En CMS con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L, 32 proteínas pertenecen a este grupo (15 únicas (Tabla A5), 7 abundantes no reguladas (Tabla A7) y 10 abundantes reguladas (Tabla A9)). Con 60 a 180 g/L de sacarosa, 43 proteínas (26 únicas (Tabla A6), 14 abundantes no reguladas (Tabla A8) y 3 abundantes reguladas (Tabla A10)) pertenecen al grupo llamado misceláneas; mientras que en CML, 30 proteínas son misceláneas (11 son únicas (Tabla A11), 13 son abundantes no reguladas (Tabla A12) y seis son abundantes reguladas (Tabla A13)). La mayoría de las proteínas en CMS y CML clasificadas en esta categoría están involucradas en múltiples metabolismos y, por lo tanto, resulta difícil categorizarlas. No obstante, el análisis del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML demostró que, bajo las condiciones de cultivo evaluadas, se producen proteínas asociadas al metabolismo secundario, involucradas en la degradación de hidrocarburos (proteína que contiene el dominio EHN,

las enzimas 4-nitrofenil fosfatasa, lactonizante 3-carboxi-cis, cis-muconato, entre otras), biosíntesis de antibióticos (proteína con dominio ABM) y patogenicidad (proteína de unión a inmunoglobulina E, proteína que contiene dominio Cupin_2, proteína que contiene dominio AlcB, entre otras), habiendo mayor variedad de éstas en CMS (Tabla 7). *Aspergillus brasiliensis* sintetiza proteínas asociadas con el metabolismo de hidrocarburos independientemente del sistema de cultivo o la concentración de sacarosa empleada. En CMS con 60 y 120 g/L de sacarosa, se producen dos isoformas de la proteína que contiene el dominio EHN involucrada en el metabolismo de epóxidos (Tabla 7). En este mismo sistema de cultivo (con 180 g/L de sacarosa) se produce la 4-nitrofenil fosfatasa, involucrada en la biodegradación de lindano. Además, con 60 g/L de sacarosa se produce una proteína que contiene el dominio dienelactona hidrolasa (DLH). Proteínas con dominio DLH catalizan la hidrólisis de dienelactona a maleilacetato, que desempeña un papel clave en la degradación microbiana de compuestos cloroaromáticos a través de la vía del clorocatecol (Park *et al.*, 2010). En *Fusarium pseudograminearum*, la dienelactona hidrolasa se ha encontrado involucrada en la virulencia en cereales huésped (Gardiner *et al.*, 2012). Por otro lado, la enzima lactonizante 3-carboxi-cis, cis-muconato es producida en CML por *A. brasiliensis* de forma extracelular con concentración de sacarosa de 40 g/L (Tabla 7). Ésta es una enzima de la rama principal del protocatecuato de la vía β -cetoadipato que participa en el metabolismo de compuestos aromáticos derivados de lignina (Kajander *et al.*, 2002). La vía β -cetoadipato es utilizada para la mineralización de contaminantes tóxicos tales como nitrofenoles, organofosfatos e hidrocarburos (Wells y Ragauskas, 2012). Aunque la degradación de hidrocarburos aromáticos clorados ha sido muy estudiada en bacterias (Gallart-ayala *et al.*, 2014), *Fusarium flocciferum*, *Graphium sp.* y *A. fumigatus* han sido citados por su potencial de degradar fenol a través de la vía β -cetoadipato (Yemendzhiev *et al.*, 2009). Además, se sabe que *A. brasiliensis* es un hongo con capacidad para degradar altas concentraciones de hexadecano en CMS y CML (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003). Aunque no parece haber relación de la presencia de la proteína que contiene el dominio EHN y las enzimas 4-nitrofenil fosfatasa, lactonizante 3-carboxi-cis, cis-muconato y la dienelactona hidrolasa en el proteoma de *A. brasiliensis* debido a la concentración de sacarosa, es posible que los genes que codifican para estas proteínas se expresen de forma constitutiva independientemente de las condiciones de cultivo. Basados en la presencia de estas proteínas degradadoras de hidrocarburos, puede enfatizarse la idea de que *A. brasiliensis* tiene una elevada capacidad y futura aplicación con fines de biorremediación.

Tabla 7. Proteínas “misceláneas” involucradas en el metabolismo de hidrocarburos, biosíntesis de antibióticos y patogenicidad en CMS y CML

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Sacarosa g/L	Función ^c	Loc ^d	CEP ^e ×10 ⁻³ (Sp/mL)	Reg ^f
Proteínas únicas en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa							
Proteína que contiene dominio DLH	OJJ69906	-	60	Degradación de hidrocarburos	Extra /Intra	179.0	NR
Proteína de unión a inmunoglobulina E (IgE)	OJJ74863	ANI 1 810014	60	Patogénesis	Extra	42.9	NR
Proteína que contiene dominio cupin_2	OJJ67868	ANI 1 192174	40	Regula patogenicidad	Extra	41.7	NR
Proteína que contiene dominio VOC	OJJ72168	ANI 1 166144	60	Resistencia a antibióticos	Extra	15.1	NR
Proteína que contiene dominio AlcB	OJJ68494	ANI 1 1290034	20	Factor de virulencia	Intra	13.9	NR
Proteínas abundantes no reguladas en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa							
Proteína que contiene dominio ABM	OJJ66778	ANI 1 222114	20, 40, 60	Biosíntesis de antibióticos	Extra /Intra	2720.0	NR
Proteínas abundantes reguladas en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa							
Proteína que contiene dominio Pyr_redox_2	OJJ69362	ANI 1 1516084	20, 40, 60	Síntesis de micotoxinas	Extra /Intra	4490.0	SR
Monooxigenasa de unión a flavina	OJJ73792	-	20, 40, 60	Degradación de hidrocarburos	Intra	547.0	SR
Proteína que contiene dominio CS	OJJ72956	ANI 1 1196064	20, 40, 60	Resistencia patogénica	Intra	247.0	SR
Proteínas únicas en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa							
Proteína que contiene dominio EthD	OJJ66283	ANI 1 8064	60	degradación del etil terc-butil éter	Extra /Intra	607.0	NR
Proteína que contiene dominio EHN	OJJ69918	ANI 1 1072104	60	Metabolismo de epóxidos	Extra /Intra	316.0	NR
4-nitrofenil fosfatasa	OJJ75673	ANI 1 3104024	180	Degradación de lindano	Extra /Intra	315	NR
Proteína que contiene dominio EHN	OJJ72085	ANI 1 312144	60/120	Metabolismo de epóxidos	Extra /Intra	192.0	NR
Proteína que contiene dominio EthD	OJJ75993	ANI 1 1182024	120	degradación del etil terc-butil éter	Extra	136.0	NR
Proteína de unión a inmunoglobulina E (IgE)	OJJ74863	ANI 1 810014	60	Patogénesis	Extra	42.9	NR
Proteína de respuesta a antibióticos similar a CipC	OJJ72464	ANI 1 450064	180	Patogénesis	Intra	20.5	NR
Proteína que contiene dominio N-acetiltransferasa	OJJ74019	ANI 1 180074	60	Resistencia a antibióticos	Intra	18.4	NR
Proteínas abundantes no reguladas en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa							
Proteína que contiene dominio ABM	OJJ66778	ANI 1 222114	60, 120, 180	Biosíntesis de antibióticos	Extra /Intra	3490.0	NR
Monooxigenasa de unión a flavina	OJJ73792	-	60, 120, 180	Degradación de hidrocarburos	Intra	374.0	NR
Proteína que contiene dominio CS	OJJ72956	ANI 1 1196064	60, 180	Resistencia patogénica	Intra	170.0	NR
Proteínas abundantes reguladas en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa							
Proteína que contiene dominio Pyr_redox_2	OJJ69362	ANI 1 1516084	60, 120, 180	Síntesis de micotoxinas	Extra /Intra	4860.0	BR
Proteínas únicas en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa							
Proteína que contiene dominio ABM	OJJ66778	ANI 1 222114	60	Biosíntesis de antibióticos	Extra /Intra	375.0	NR
Enzima lactonizante 3-carboxi-cis, cis-muconato	OJJ74833	ANI 1 2640014	40	Metabolismo de hidrocarburos	Extra	2.2	NR
Proteínas abundantes no reguladas en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa							
Proteína de respuesta a antibióticos similar a CipC	OJJ72464	ANI 1 450064	20,40,60	Patogénesis	Intra	768.0	NR
Proteínas abundantes reguladas en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa							
Proteína pequeña secretada	OJJ75514	ANI 1 1878024	20,40,60	Patogénesis	Extra	20.7	SR

^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Función de las proteínas. ^d Localización de las proteínas: (Extra) extracelular, (Intra) intracelular, (Extra/Intra) extracelular e intracelular. ^e CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo

de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas. ^f Regulación de las proteínas: (NR) no regulada, (SR) sobre-regulada, (BR) bajo-regulada.

Con 40 g/L de sacarosa, *A. brasiliensis* produce de forma intracelular proteínas que participan en la biosíntesis de vitaminas. En CMS produce la proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD (involucrada en la biosíntesis de vitamina C). En CML produce biotina sintasa, que es una enzima intracelular que participa en la ruta de biosíntesis de biotina, vitamina esencial y cofactor de enzimas (Fugate y Jarrett, 2012). Por otro lado, en CMS se produce de forma única la proteína con dominio similar a SnoaL, obtenida con 180 g/L de sacarosa. Dicha proteína participa en la biosíntesis de nogalamisina que impide el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas al interactuar con la topoisomerasa, inhibiendo la replicación de ADN (Sultana *et al.*, 2004). También se producen proteínas involucradas en la patogenicidad (proteína que contiene dominio Cupin_2 (40 g/L), proteína con dominio VOC y proteína de unión a inmunoglobulina E (60 g/L), proteína de respuesta a antibióticos similar a CipC y proteína Cap20 (180 g/L), inmunidad y adhesión (proteína de unión a microtúbulos HOOK3 (60 g/L), también encontrada de forma abundante no regulada con 60 a 180 g/L de sacarosa) y producción de pigmentos como melanina e indigoidina (tirosinasa (20 g/L) y proteína con dominio IdgA (180 g/L), respectivamente). Mientras que en CML se produce una proteína con dominio ABM (60 g/L), que participa en la biosíntesis de antibióticos (She *et al.*, 2010), aunque podría estar implicada en la patogenicidad (Schweizer y Goossens, 2016). La proteína con dominio ABM también es producida en CMS, pero de forma abundante y no regulada con 20 a 60 g/L y 60 a 180 g/L de sacarosa. Además, en CML *A. brasiliensis* produce de forma abundante y no regulada una proteína de respuesta a antibióticos similar a CipC (encontrada de forma única en CMS con 180 g/L de sacarosa) (Tabla 7) cuya función también puede estar relacionada con la patogenicidad como ocurre en *A. fumigatus* en respuesta al incremento en presencia de CO₂ durante un proceso infeccioso (Canela *et al.*, 2017).

La concentración inicial de sacarosa produce cambios en el nivel de regulación de las proteínas clasificadas como misceláneas dependiendo del sistema de cultivo. En CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa, todas las proteínas de esta categoría son sobre-reguladas. La proteína con dominio cianovirina (CVNH) destaca por su posible capacidad antiviral (Xiong *et al.*, 2010) y en menor medida la proteína Ecm33 cuya función en hongos filamentosos es variada: está involucrada en la integridad de la pared celular, conidiación y respuesta multi estrés (Chen *et al.*, 2014). Aunque no se conoce su función con precisión, es importante en

la morfología de la pared celular y la virulencia de *C. albicans* (Monteoliva, 2016). En cuanto a las proteínas que son abundantes y reguladas en CML, *A. brasiliensis* produce la proteína pequeña secretada (sobre-regulada). De esta proteína se sabe que está presente en los hongos de todos los grupos filogenéticos, comprende el 40-60% de todo el secretoma fúngico y participa en la regulación de procesos biológicos además de tener implicación en la patogenicidad al participar en la supresión de la respuesta de defensa del huésped y en la alteración de su fisiología (Feldman *et al.*, 2020). También se encontraron sobre-reguladas la proteína de la familia de incompatibilidad de heterocariontes que desencadena muerte celular y la mucina-7 que confiere resistencia a compuestos con actividad fungicida (Gurgel *et al.*, 2019). De forma intracelular se encontraron bajo-reguladas proteínas que participan en el metabolismo secundario, el cual está acompañado con un cambio en el flujo de energía y carbono desde la producción de biomasa hacia la producción de metabolitos secundarios (Ruiz *et al.*, 2010).

La presencia de proteínas del metabolismo secundario en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML, puede ser debida a que el metabolismo secundario también está asociado con un cambio morfológico o de desarrollo en el organismo productor (Flärdh y Buttner, 2009). La proteína con dominio Pyr_redox_2, bajo-regulada en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa y la proteína que contiene el dominio de policétido sintasa (PKS_ER) bajo-regulada en CML son un claro ejemplo de proteínas que desempeñan un papel importante en el metabolismo secundario de los microorganismos. Las PKS_ER son enzimas modulares que utilizan precursores relativamente simples para producir una variedad de compuestos diferentes que pueden tener actividades farmacológicas interesantes o proporcionar nuevos andamiajes químicos para el desarrollo de nuevos fármacos (Joyce *et al.*, 2011). Otras proteínas bajo-reguladas en CML que fueron clasificadas como misceláneas comprenden la proteína antigénica que contiene el dominio Rick de 17 kDa y la proteína que contiene el dominio de unión a subunidades periféricas (PSBD) que participa en el metabolismo de cofactores y vitaminas.

9.4.3. Proteínas clasificadas como componente/proceso celular

Este es el tercer y cuarto grupo de proteínas más abundante del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L y 60 a 180 g/L de sacarosa, respectivamente, mientras que la suma de la CEP de las proteínas relacionadas con componentes y procesos celulares en CML, indica que es el grupo más abundante dentro del proteoma de *A. brasiliensis* (Figura 14). En CMS con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L, 52 proteínas pertenecen a este

grupo (16 únicas (Tabla A5), 20 abundantes no reguladas (Tabla A7) y 16 abundantes reguladas (Tabla A9)); con 60 a 180 g/L de sacarosa, 82 proteínas (41 únicas (Tabla A6), 30 abundantes no reguladas (Tabla A8) y 11 abundantes reguladas (Tabla A10)) están clasificadas como componente/proceso celular; mientras que en CML, 104 proteínas son de componentes o procesos celulares (44 son únicas (Tabla A11), 26 son abundantes no reguladas (Tabla A12) y 34 son abundantes reguladas (Tabla A13)). La proteína que contiene el dominio SUN es la única proteína extracelular abundante no regulada encontrada en CMS con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L. En *A. brasiliensis*, puede estar involucrada en la biosíntesis de pared celular y formación de septos (Gastebois *et al.*, 2013). Mientras que en CML la proteína de pared celular PhiA es la más abundante no regulada de forma extracelular, en CMS esta proteína se encuentra sobre-regulada con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L y abundante no regulada cuando la concentración de sacarosa es de 60 a 180 g/L. La proteína PhiA es esencial para el desarrollo de estructuras celulares conidiógenas (Kniemeyer, 2011) y al ser abundante en el proteoma de *A. brasiliensis* también pudo actuar como proteína de defensa contra el estrés generado por las condiciones de cultivo (Svanström *et al.*, 2013).

La mayoría de las proteínas intracelulares abundantes no reguladas en CMS son de carácter estructural y forman parte del ribosoma, lo cual puede estar relacionado con la elevada síntesis de proteínas en este sistema de cultivo. La histona H2B y la proteína de resistencia a cobre Crd2 son abundantes independientemente del sistema de cultivo. La histona H2A, la proteína con dominio HABP4_PAIRBP1 y la proteína que contiene el dominio PH son de las proteínas más abundantes intracelulares en CML, mientras que en CMS con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L la proteína con dominio PH se encuentra sobre-regulada. La presencia de histonas en el proteoma de *A. brasiliensis* es un indicador de replicación del ADN o probable reparación del mismo en ambos sistemas de cultivo (Linger y Tyler, 2007). Las histonas también pueden estar relacionadas con la proteína con dominio HABP4_PAIRBP1 que probablemente está asociada al remodelado de la cromatina y regulación de la transcripción (Nery *et al.*, 2004, 2006). Por otro lado, en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa fueron bajo-reguladas dos proteínas extracelulares (proteína con dominio de la familia del factor de transcripción específico de hongos y proteína quinasa activada por mitógeno hog1), ambas implicadas en la transducción de señales. Un número mayor de proteínas son bajo-reguladas en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (proteína que contiene dominio de la región TPR, la proteína de resistencia a cobre Crd2 y dos isoformas de la proteína 14-3-3). La 1,3-beta glucanosil transferasa es la

única proteína extracelular sobre-regulada en CML, cuya actividad enzimática es esencial durante la morfogénesis de hongos y levaduras (Bruneau *et al.*, 2001). Esta proteína también fue sobre-regulada en CMS con 20 a 60 y 60 a 180 g/L de sacarosa y se encuentra tanto extracelular como intracelular. Lo anterior sugiere que el incremento de la concentración de sacarosa incide de forma negativa en las vías de señalización de *A. brasiliensis* en CMS, pero, en los dos sistemas de cultivo promueve la síntesis de pared celular.

Proteínas implicadas en la regulación de procesos biológicos (dos isoformas de disulfuro isomerasa, tropomiosina, subunidad 4 del complejo proteico relacionada con la actina y proteína reguladora SUAPRGA1) son de las proteínas intracelulares sobre-reguladas en CMS. Las proteínas con dominio RRM y Sm y una proteína con dominio YL1_C se encontraron sobre-reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML y tienen estrecha relación en sus funciones. Mientras que la proteína YL1_C participa en la remodelación de la cromatina, que es importante para la expresión de los mecanismos transcripcionales necesarios para la regulación del crecimiento en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y oxígeno (Yao *et al.*, 2015), las proteínas con dominios RRM y Sm participan activamente en el procesos post transcripcionales (Afroz *et al.*, 2015).

La proteína con dominio YL1_C forma parte de la familia de proteínas YL1 involucradas en la regulación de la transcripción (Horikawa *et al.*, 1995). En específico forma parte del complejo del remodelamiento de la cromatina INO80 que está involucrado en diferentes procesos celulares como transcripción, reparación de ADN y replicación (Yao *et al.*, 2015). Las proteínas con dominios RRM y Sm forman parte del espliceosoma, la primera es una ribonucleoproteína encargada del reconocimiento y procesamiento del ARN (Afroz *et al.*, 2015) y la segunda participa en el ensamblaje del espliceosoma (Matera y Wang, 2014).

Aunque se sabe que la regulación del ensamblaje y actividad del espliceosoma está dada por diferentes modificaciones postraduccionales como la fosforilación, ubiquitinación y acetilación (Wahl *et al.*, 2009). De forma interesante, dentro de las proteínas bajo-reguladas en CML, se encontró una isoforma de la proteína con dominio RRM lo cual puede significar que el incremento en la concentración de sacarosa regula alguno de los complejos del espliceosoma de *A. brasiliensis*. El espliceosoma está compuesto por cinco diferentes complejos de ribonucleoproteínas que son los responsables de remover la mayoría de los intrones en el ARN inmaduro (Matera y Wang, 2014). Al haber varios complejos con diferentes ribonucleoproteínas, es probable que éstas sean bajo-reguladas inmediatamente después de cumplir su función, como en el procesamiento de la maduración del extremo 3´

de la telomerasa (Box *et al.*, 2008), donde el espliceosoma se regula negativamente después de hacer el primer paso de corte de intrones (Wahl *et al.*, 2009).

Dentro de las 21 proteínas bajo-reguladas de *A. brasiliensis* en CML, se encontraron dos histonas (H2A y H4, la última sobre-regulada en condiciones de CMS) cuya bajo-regulación probablemente sea empleada como mecanismo de regulación de la transcripción de genes. En hongos del género *Aspergillus* se ha demostrado la presencia altamente conservada de las cinco familias de histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Vries *et al.*, 2017). En el núcleo celular, el ADN (147 pares de bases) se enrolla en un octámero de histonas compuesto de dos dímeros de H2A-H2B y un tetrámero de H3-H4 formando nucleosomas que son unidos por la histona H1 dando lugar a la cromatina (Wolffe y Hayes, 1999). Esta forma de organización de la cromatina permite la compactación de genes y restringe la accesibilidad al daño o a la transcripción del ADN (Celona *et al.*, 2011), lo cual permite la creación de un mecanismo en el que las modificaciones postraduccionales en las histonas y el nivel de compactación de los nucleosomas (heterocromatina y eucromatina) pueden regular la accesibilidad a los genes y de este modo modificar la expresión génica (Stefanelli *et al.*, 2018). En células de mamíferos, la inhibición de la síntesis de ADN y la radiación ionizante induce a la bajo-regulación a nivel del ARNm que codifica para histonas (Su *et al.*, 2004). También se ha comprobado en células de levaduras que la ausencia de la proteína Nhp6a/b conduce a la disminución de la abundancia de histonas y nucleosomas en un 20-30%. La limitación en nucleosomas incrementa el riesgo de daño al ADN, contribuye a un incremento global en la transcripción, sobre todo en la transcripción de genes que no quedaron empaquetados (Celona *et al.*, 2011). Por lo tanto, la disminución en el contenido de histonas en el proteoma de *A. brasiliensis* contribuye a una forma de regulación de la transcripción génica (Mejia, 2011).

Finalmente, una proteína con carácter estructural en el ribosoma (L23eN) y la proteína 14-3-3 fueron bajo-reguladas en CML. Ésta última pertenece a un grupo de proteínas altamente conservadas en eucariontes de las cuales hay variedad de isoformas (dos isoformas abundantes no reguladas en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa y bajo reguladas con 60 a 180 g/L de sacarosa) que pueden interactuar y unirse con otras proteínas (Heusden, 2009). En levaduras, los ortólogos de las proteínas 14-3-3 están involucrados en casi todos los procesos celulares (Heusden y Steensma, 2006). Las proteínas 14-3-3 de *A. nidulans* participan en la morfogénesis de las hifas al prevenir la formación de septos (Kraus *et al.*, 2002). Además, tienen rol durante la esporulación, desarrollo esclerotial y regulan negativamente la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* (Ibarra *et al.*, 2018). En *T. reesei* estas

proteínas tienen rol en la secreción de proteínas (Vasara *et al.*, 2002) mientras que en CMS de *A. brasiliensis* se asume que las proteínas 14-3-3 tienen influencia en la ramificación de las hifas y la secreción vesicular (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Por lo tanto, la bajo-regulación de la proteína 14-3-3 en CML de *A. brasiliensis* sugiere que tiene nula o muy baja función en la ramificación, ya que en CML el nivel de ramificación es 1.4 veces menor que en CMS y es independiente de la concentración de sustrato (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Aún se necesitan más estudios para comprobar la función de las proteínas 14-3-3 en CMS Y CML de *A. brasiliensis*, especialmente con baja concentración de sacarosa que es en la condición donde hay mayor producción de la proteína.

Como resultado del análisis de proteínas reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis*, puede deducirse que en CMS no se presentan condiciones de estrés osmótico asociado al incremento en la concentración de sacarosa. La bajo-regulación de la proteína MAPK hog1 sugiere que se inactiva la transducción de señales implicada en la señalización del estrés (Mollapour *et al.*, 2007). También es posible deducir que los procesos celulares que están activos bajo las condiciones de CML evaluadas son la replicación del ADN y la transcripción, junto con una constante síntesis de pared celular, lo que significa que el metabolismo de *A. brasiliensis* está principalmente dirigido al crecimiento. Adicionalmente, la bajo-regulación de las proteínas con dominio de la familia del factor de transcripción específico de hongos y la proteína que contiene el dominio ATPasa similar a la actina (implicada en la citocinesis) junto con la sobre-regulación de la proteína de ensamblaje del nucleosoma Nap1 que sugiere un alto nivel de compactación del ADN bajo estas condiciones, lo cual restringe la replicación del ADN (Celona *et al.*, 2011). Los elevados valores de producción de CO₂ en CMS (sección 9.1) refuerzan la idea de que en CMS está activo el catabolismo por parte de *A. brasiliensis* (Volke-Sepulveda *et al.*, 2016); mientras que en CML, se encuentran activos los procesos anabólicos asociados a la biosíntesis de biomasa.

9.4.4. Proteínas asociadas al metabolismo redox y al estrés

Las proteínas pertenecientes al metabolismo redox y al estrés son el cuarto grupo de proteínas más abundantes del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML con 20 a 60 g/L de sacarosa, pero el tercer grupo más abundante en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (Figura 14). En CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa, 20 proteínas pertenecen a este grupo (12 únicas (Tabla A5), 4 abundantes no reguladas (Tabla A7) y 4 abundantes reguladas (Tabla A9)). En concentraciones de 60 a 180 g/L, 24 proteínas asociadas al metabolismo redox y al estrés están presentes en el proteoma, (12 únicas (Tabla A6), 6 abundantes no

reguladas (Tabla A8) y 6 abundantes reguladas (Tabla A10)). En CML, 23 proteínas son redox/estrés (18 son únicas (Tabla A11), 2 son abundantes no reguladas (Tabla A12) y 3 son abundantes y reguladas (Tabla A13)). En este grupo se encuentran principalmente proteínas que participan como defensa contra especies reactivas de oxígeno (ERO) cuya abundancia en términos de la CEP (Figura 14) es un indicador de un eficiente sistema antioxidante por parte de *A. brasiliensis* durante la fase temprana de crecimiento en CMS y, en menor medida, en CML (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). La presencia, abundancia y nivel de regulación de algunas proteínas redox/estrés en CMS cambia dependiendo de la concentración de sacarosa. Isoformas de la tiorredoxina y la glutatión s-transferasa que son únicas con 180 g/L de sacarosa, también son abundantes y no reguladas con 20 a 60 g/L de sacarosa. Por otro lado, la dioxigenasa de óxido nítrico, la peroxirredoxina y la Cu/Zn SOD se encontraron sobre-reguladas con 20 a 60 g/L de sacarosa, pero únicamente abundantes con 60 a 180 g/L de sacarosa. El sistema de cultivo también tiene efecto sobre la presencia, abundancia y nivel de regulación de algunas proteínas redox/estrés. En el secretoma de CML, de forma única, se encontraron la tiorredoxina (60 g/L), la glutatión reductasa (60 g/L), la flavodoxina (40 g/L) y la tiorredoxina reductasa (60 g/L), todas sin evidencia de péptido señal. Mientras que la dioxigenasa del metabolismo de la taurina (40g/L) y la superóxido dismutasa [Cu] (40 g/L) sí presentaron evidencia de péptido señal. De forma única intracelular se encontraron dos isoformas de la glutarredoxina (40 y 60 g/L, respectivamente), una isoforma de tiorredoxina (40 g/L) y la glutatión s-transferasa (20 g/L) y en el grupo de proteínas únicas “Extra-Intra”, se encontró una isoforma de la Cu/Zn SOD (60 g/L), la peroxirredoxina (60 g/L) y la catalasa (20 g/L). Una isoforma de la Cu/Zn SOD fue abundante y no regulada, mientras que una isoforma de catalasa junto con la diflavina oxidorreductasa 1 dependiente de NADPH fueron sobre-reguladas; asimismo, una monooxigenasa de unión a flavina fue bajo-regulada.

Los resultados anteriores indican que el sistema antioxidante expresado de *A. brasiliensis* es diferente dependiendo del sistema de cultivo y la concentración de sacarosa: en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa está sobre-regulada la peroxirredoxina y con 60 a 180 g/L de sacarosa la peroxirredoxina y dos isoformas de catalasa están sobre-reguladas, mientras que en CML solo está sobre-regulada una isoforma de la catalasa. La producción de ambas enzimas por *A. niger* para degradar el peróxido de hidrogeno producto de la respiración celular depende de las condiciones de cultivo y la fuente de carbono empleada (Lu *et al.*, 2010). La regulación de las enzimas en el proteoma de *A. brasiliensis* puede estar asociada

con un incremento en la concentración de ERO como resultado del incremento en la concentración de sacarosa (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). La identificación de las principales enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y peroxidasa) es utilizado como marcador de estrés oxidativo (Grintzalis *et al.*, 2014). Los resultados demuestran que el CML resulta un sistema de estrés para *A. brasiliensis* y, por lo tanto, es de esperarse que se encuentre activo su sistema antioxidante (Li *et al.*, 2013). De hecho, se demostró que la concentración de ERO y la expresión de superóxido dismutasa en CML por *A. terreus* es hasta 10 veces mayor que en CMS (Miranda *et al.*, 2013). Estas condiciones de estrés están relacionadas con el metabolismo secundario, donde el estrés oxidativo regula aspectos del desarrollo fúngico tales como el crecimiento, la diferenciación y la síntesis de aflatoxinas por *A. flavus* (Miranda *et al.*, 2013; Grintzalis *et al.*, 2014). Las superóxido dismutasa junto con la catalasa tienen un rol importante en la protección contra el daño oxidativo, están vinculadas ya que debe existir un balance en la producción de peróxido de hidrógeno y su remoción (Lu *et al.*, 2010). Su presencia de forma extracelular está dada por la presencia de péptido señal o por secreción no convencional que ya han sido reportadas en levaduras y hongos del género *Aspergillus* (Li *et al.*, 2013).

9.4.5. Proteínas asociadas con la síntesis de proteínas o proteólisis

Este resultó el quinto grupo más abundante dentro del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML (Figura 14). En CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa, 20 proteínas pertenecen a este grupo (8 únicas (Tabla A5), 5 abundantes no reguladas (Tabla A7) y 7 abundantes reguladas (Tabla A9)) y con 60 a 180 g/L de sacarosa 37 proteínas (29 únicas (Tabla A6), 5 abundantes no reguladas (Tabla A8) y 3 abundantes reguladas (Tabla A10)) están involucradas en la proteólisis o síntesis de proteínas. En CML, 14 proteínas pertenecen a este grupo (3 son únicas (Tabla A11), 4 son abundantes no reguladas (Tabla A12) y 7 son abundantes reguladas (Tabla A13)). En CMS hay presencia de proteínas componentes del proteasoma (subunidad alfa del proteasoma, componente de proteasoma PRE2, proteína con dominio conjugador de ubiquitina E2, poliubiquitina y proteína de la familia de proteínas de dedos de zinc de tipo C3HC4), chaperonas (isoformas de la proteína de choque térmico 70, una proteína de choque térmico 60 y chaperona de retículo endoplásmico BiP), proteínas involucradas en modificaciones (peptidil-prolil isomerasa, proteína con dominio quinasa y peptidil-prolil cis-trans isomerasa) y tres peptidasas (peptidasa A1, peptidasa S53, serina proteasa, carboxipeptidasa y proteína con dominio peptidasa M24). En CML se producen proteínas involucradas en la modificación de proteínas (con el dominio MPN y

con el dominio Paf1), chaperonas (proteína de choque térmico 70, chaperona A), proteínas asociadas al proteasoma (poliubiquitina) y peptidasa S53 junto con peptidasa A1. El plegamiento de proteínas es un proceso crucial para la actividad biológica y está acoplado a una amplia gama de procesos dentro de la célula, que van desde el tráfico de proteínas a orgánulos específicos hasta la regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Dobson, 2004). Por lo tanto, la presencia de proteínas de choque térmico en el proteoma de *A. brasiliensis* en ambos sistemas de cultivo es un resultado esperado, ya que están involucradas en el plegamiento de proteínas. En CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa se sobre-regula una isoforma de la proteína de choque térmico 70; estas proteínas, además de participar en el plegamiento de proteínas también están involucradas en el transporte de proteínas y como activadoras de proteólisis (Cohen *et al.*, 2020).

Por otro lado, hay evidencia de que *A. brasiliensis* mantiene activa la vía de ubiquitinación. En CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa hay varias proteínas asociadas con el proteasoma, entre éstas, la proteína con dominio conjugador de ubiquitina E2 se encontró sobre-regulada. Esta proteína junto con la ubiquitina (sobre-regulada en CML) son intermediarios en el proceso de regulación proteica mediado por la ubiquitina, que marca el destino de las proteínas para su degradación por el proteasoma 26S, para iniciar cascadas de señalización o para ser ingresadas en organelos (Komander, 2009). A pesar de que los cultivos de *A. brasiliensis* fueron balanceados para mantener los niveles de nitrógeno requeridos para la síntesis de proteínas, en el proteoma se identificaron cinco diferentes proteasas, las cuales pudieron ser producidas en respuesta a limitación de la fuente de carbono, nitrógeno o azufre (Katz *et al.*, 2008). En CMS se producen de forma única (60 g/L de sacarosa) una proteína con dominio metalopeptidasa de la familia 24 y la carboxipeptidasa. La peptidasa A1 y peptidasa S53 fueron producidas en ambos sistemas de cultivo y encontradas de forma extracelular. Sin embargo, en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa se sobre-reguló la peptidasa S53 y con 60 a 180 g/L la serina proteasa y la proteasa A1 fueron sobre-reguladas, pero la peptidasa S53 fue bajo-regulada; mientras que en CML solo la peptidasa A1 fue sobre-regulada. Las proteasas fúngicas secretadas hidrolizan proteínas extracelulares en péptidos y aminoácidos que posteriormente son absorbidos por las células (Souza *et al.*, 2015). Éstas también están asociadas con la virulencia de microorganismos patógenos y participan en procesos de adherencia y penetración de tejidos (Monod *et al.*, 2002). La peptidasa S53 resultó abundante en las tres concentraciones de CML (20, 40, 60 g/L), mientras que la peptidasa A1 fue abundante en

las tres condiciones de CMS (20, 40, 60 g/L de sacarosa). La peptidasa S53 pertenece a la familia de la sedolisina (serina-carboxil peptidasas) que incluye proteasas de naturaleza ácida (Oda, 2012). La peptidasa A1 pertenece a la familia de las endopeptidasas aspárticas de pepsina (Reichard *et al.*, 2006) que son secretadas de forma abundante por *A. fumigatus* dependiendo de la composición del medio de cultivo (Regula *et al.*, 2005). Por lo tanto, la presencia y abundancia de las proteasas en el proteoma de *A. brasiliensis* están influenciadas por el sistema de cultivo y la concentración de sacarosa.

9.4.6. Proteínas del metabolismo de aminoácidos

Las proteínas del metabolismo de aminoácidos son el sexto grupo de proteínas más abundantes en CMS y en CML, ocupan el décimo lugar de abundancia en el proteoma de *A. brasiliensis* (Figuras 14). Diecisiete proteínas de CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa corresponden al metabolismo de aminoácidos (3 únicas (Tabla A5), 9 abundantes no reguladas (Tabla A7) y 5 abundantes sobre-reguladas (Tabla A9)) y, con 60 a 180 g/L de sacarosa, se encontraron 28 proteínas en este grupo (15 únicas (Tabla A6), 8 abundantes no reguladas (Tabla A8) y 5 abundantes reguladas (Tabla A10)). En CML solo cinco proteínas pertenecen al metabolismo de aminoácidos, todas fueron únicas y con abundancia menor a 0.02 Sp/mL (Figura 14 y Tabla A11). Las proteínas únicas en CMS también se encontraron en baja abundancia (0.28 y 1.10 Sp/mL con 20 a 60 g/L y 60 a 180 g/L de sacarosa, respectivamente) comparada con el resto de los metabolismos. Sin embargo, son 14 y 55 veces más abundantes que las proteínas del metabolismo de aminoácidos encontradas en CML. En CMS se encontraron dos enzimas involucradas en la biosíntesis de metionina, ambas abundantes y no reguladas (adenilil-sulfato quinasa y metionina sintasa) con 20 a 60 g/L y con 60 a 180 g/L de sacarosa. Los residuos de metionina pueden actuar como antioxidantes catalíticos, protegiendo tanto a la proteína donde se encuentran como a otras macromoléculas del estrés oxidativo (Luo y Levine, 2009). Lo anterior sugiere que la biosíntesis de metionina por *A. brasiliensis* puede estar implicada en algún mecanismo de respuesta a estrés. Con 20 a 60 g/L de sacarosa, se encontraron dos enzimas abundantes y no reguladas relacionadas con la biosíntesis de arginina (aspartato aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa). La presencia de estas enzimas y la sobre-regulación de argininosuccinato liasa en el proteoma de *A. brasiliensis* con 20 a 60 g/L de sacarosa son indicador de elevada demanda de este aminoácido, probablemente porque es intermediario para la síntesis de prolina y glutamato y otros compuestos (Morris, 2006). La argininosuccinato liasa fue bajo-regulada en el proteoma de

A. brasiliensis con 60 a 180 g/L de sacarosa y su regulación puede deberse a que la arginina es un aminoácido muy versátil que puede ser producido por diferentes isoenzimas cuyo nivel de expresión cambia rápidamente dependiendo de diferentes estímulos (Knowledge y Morris, 2007). La fenilalanina, tirosina, triptófano y lisina son aminoácidos cuya biosíntesis se encuentra activa en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa. Bajo estas condiciones son sobre-reguladas la corismato mutasa que participa en la vía del shikimato para la producción de los aminoácidos esenciales fenilalanina, triptofano y tirosina (Khanapur *et al.*, 2017) y la proteína con dominio Iso_dh (homoisocitrato deshidrogenasa), que participa en la tercera reacción de la vía alfa-aminoadipato para la biosíntesis de lisina (Bulfer *et al.*, 2012). No obstante, con 60 a 180 g/L de sacarosa se bajo-regulan ambas enzimas, lo que sugiere que la concentración de sacarosa incide en la biosíntesis de los aminoácidos previamente mencionados.

El resto de las proteínas sobre-reguladas en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa, fueron enzimas involucradas en la biosíntesis de cisteína (cistationina beta sintasa), y en el metabolismo de la tirosina. Dos de las cinco proteínas reguladas en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa fueron sobre-reguladas (la proteína con dominio PABS y la glutamato deshidrogenasa). Las proteínas del metabolismo de aminoácidos sobre-reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS están involucradas en la biosíntesis de la arginina, cisteína, y triptófano que son considerados aminoácidos funcionales ya que además de ser los componentes básicos de proteínas y polipéptidos, regulan vías metabólicas clave que son necesarias para el mantenimiento, el crecimiento, la reproducción y la inmunidad (Wu, 2009). Este análisis proteómico comprueba que la expresión de proteínas asociadas con el metabolismo de aminoácidos de *A. brasiliensis* cambia dependiendo de las condiciones de cultivo (Oda *et al.*, 2006).

9.4.7. Proteínas del metabolismo energético

Las proteínas del metabolismo energético resultaron más de 1.5 veces más abundantes en CML que en CMS y en CMS es uno de los grupos menos abundantes. En CML son el segundo grupo de proteínas más abundantes del proteoma de *A. brasiliensis*. (Figura 14). Doce proteínas del CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa son del metabolismo energético (5 únicas (Tabla A5), 4 abundantes no reguladas (Tabla A7) y 3 abundantes reguladas (Tabla A9)). Todas son proteínas de los complejos de la cadena respiratoria excepto la sulfito reductasa (abundante con 20, 40 y 60 g/L de sacarosa) y la carbonato deshidratasa (única con 20 g/L de sacarosa). Con 60 a 180 g/L de sacarosa, 22 proteínas (15 únicas (Tabla

A6), 6 abundantes no reguladas (Tabla A8) y 1 abundante regulada (Tabla A10)) pertenecen al metabolismo energético. En CML, 29 proteínas pertenecen al metabolismo energético (9 únicas (Tabla A11), 12 abundantes no reguladas (Tabla A12) y 8 abundantes reguladas (Tabla A13)). Todas son proteínas de los complejos de la cadena respiratoria excepto la subunidad G de la ATPasa-V. Ésta junto con la subunidad F de ATPasa de protones de tipo V fueron sobre-reguladas en CML y CMS (con 20 a 60 g/L de sacarosa), respectivamente. La ATPasa vacuolar es responsable de controlar el pH intracelular y extracelular y, en el proteoma de *A. brasiliensis*, podría estar relacionada con la modulación del tráfico vesicular (Pamarthy *et al.*, 2018). Dos proteínas del complejo III de la cadena respiratoria fueron sobre-reguladas en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa: la subunidad del complejo citocromo b-c1 Rieske y la proteína central del complejo ubiquinol-citocromo C reductasa 2; con 60 a 180 g/L de sacarosa, únicamente se sobre-reguló la pirofosfatasa inorgánica involucrada en la fosforilación oxidativa.

Por otro lado, en CML cuatro proteínas pertenecientes al citocromo c oxidasa (complejo IV) son sobre-reguladas y las subunidades b y d de la ATP (complejo V) son bajo-reguladas. Cuando se bajo-regula o se inhibe la expresión de los complejos de la cadena respiratoria se obstaculiza el metabolismo energético de *A. niger* y resulta en un incremento de ERO, lo que provoca daño en la membrana y proteínas y, finalmente, conduce a la muerte celular (Wang *et al.*, 2021). Aunque el conocimiento sobre el ensamblaje de la ATP sintasa es un tanto hipotético porque no es fácil su estudio a nivel bioquímico (Jonckheere y Smeitink, 2012), se sabe que la subunidad d de este complejo es parte de la estructura del tallo estático que conecta las subunidades F1 y F0 e impide que la parte estática F1 gire junto con el rotor (Neupane *et al.*, 2019). Se conoce poco de la regulación de las subunidades de todo el complejo de la ATP sintasa. Sin embargo, en *Arabidopsis thaliana* la bajo-regulación de la subunidad d del complejo perjudica la función de la ATP sintasa y la planta es más sensible a estrés por calor, con bajo crecimiento comparado con plantas donde no es bajo-regulada la subunidad d de la ATP sintasa (Liu *et al.*, 2021). La ATPasa-V es fundamental para una gran cantidad de procesos celulares, incluido el procesamiento y la secreción de proteínas, endocitosis, tráfico de vesículas y la autofagia (Hayek *et al.*, 2019). La actividad de la ATPasa-V es importante en procesos tales como el direccionamiento y la modificación postraduccional de proteínas en el aparato de Golgi (Vasanthakumar y Rubinstein, 2020), además de que participa en el transporte de hidrolasas del aparato de Golgi hacia los lisosomas o vacuolas (Pamarthy *et al.*, 2018). En levaduras forma parte de un complejo con

TORC1, Sch9, Sch9p, Snf1p (ortólogo de AMPK) para controlar el cambio entre catabolismo y anabolismo en respuesta al agotamiento y reposición de glucosa (Hayek *et al.*, 2019). Cambios en el nivel de acidificación de organelos o extracelular pueden ser necesarios para tolerar situaciones de estrés, responder a cambios en la disponibilidad de nutrientes, conservar energía en condiciones de baja concentración de nutrientes o para mantener la homeostasis celular (Vasanthakumar y Rubinstein, 2020). Estos cambios pueden lograrse alterando el nivel de expresión de la ATPasa-V que está sujeta a un sistema de regulación recíproco con la vía glucolítica en el que la presencia de glucosa señala para mantener el ensamblaje y tráfico de la ATPasa-V, mientras que el agotamiento de la fuente de carbono señala su inactivación mediante el desensamblaje del complejo (Hayek *et al.*, 2019). De este modo, la sobre-regulación de la ATPasa-V en el proteoma de *A. brasiliensis* puede estar asociada con varias de las funciones antes mencionadas y, además, puede estar sujeta al sistema de regulación mediado por glucosa en el que probablemente las condiciones favorecen la señalización para un cambio de anabolismo a catabolismo. Esto explicaría la bajo-regulación de las subunidades b y d de la ATP sintasa y la sobre-regulación del complejo IV de la cadena respiratoria que sufre regulación alostérica basada en la elevada (bajo-regulación) o baja (sobre-regulación) relación ATP/ADP (Fontanesi *et al.*, 2006). Además de que la sobre-regulación de la citocromo c oxidasa puede estar asociada con la necesidad de oxidación de NADH (tóxico en exceso) y la reducción del oxígeno molecular a agua durante la respiración celular (Pierron *et al.*, 2012), o a la respuesta a estimulación apoptótica mediante la activación de caspasas (Chandra *et al.*, 2002).

9.5. Descripción del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS

EL proteoma de *A. brasiliensis* en CMS fue analizado de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L de sacarosa (el proteoma en CMS de 20 a 60 g/L de sacarosa se comparó y discutió con el proteoma en CML). En total 1471 proteínas fueron identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS, de las cuales, 212 proteínas fueron extracelulares, 807 proteínas fueron encontradas de forma intracelular, mientras que 452 proteínas fueron encontradas tanto en forma extracelular como intracelular y por lo tanto fueron clasificadas en el grupo denominado “Extra-Intra”. Mientras que en CML el 79% de las proteínas extracelulares presenta evidencia de secreción, en CMS el 62% de las proteínas presenta evidencia de secreción lo cual respalda la idea que se tiene de que en CMS hay presencia en el secretoma de proteínas con funciones “moonlighting” (Salgado-Bautista *et al.*, 2020)

independientemente de que pueda existir lisis o fuga celular (Cohen, Chirico and Lipke, 2020). El 44% (92 proteínas) de las proteínas extracelulares son secretadas con concentración de sacarosa de 120 y 180 g/L, mientras que el 15% (124 proteínas) de las proteínas intracelulares son producidas con concentración de sacarosa de 120 y 180 g/L. El número de proteínas extracelulares únicas en CMS obtenidas con 20 a 60 g/L de sacarosa (Figura 16A) es menor que el observado en CML (Figura 27A) y al igual que en CML, la mayoría de las proteínas se obtiene con la concentración de 60 g/L de sacarosa (39 y 29 proteínas únicas en CML y CMS, respectivamente). Por otro lado, el número de proteínas extracelulares únicas en CMS aumenta con el incremento en la concentración de sacarosa. En total 74 proteínas extracelulares únicas son obtenidas en CMS con concentración elevada de sacarosa (31 proteínas con 120 y 43 con 180 g/L de sacarosa). La distribución de proteínas intracelulares únicas en CMS demuestra que el mayor número de proteínas se obtiene con 180 g/L de sacarosa (143 proteínas). El proteoma intracelular de 20 a 60 g/L de sacarosa en CMS es similar al de CML ya que en ambos sistemas de cultivo es con 20 g/L de sacarosa con la concentración que se obtiene el mayor número de proteínas intracelulares únicas (Figura 16B) y (Figura 27B) con 108 y 178 proteínas en CMS y CML, respectivamente. Estos resultados confirman lo que es muy conocido: que el proteoma es dinámico y cambia dependiendo de las condiciones de cultivo o cambios en la fuente de carbono (Lu *et al.*, 2010). Bajo las mismas condiciones de concentración de sacarosa (20, 40 y 60 g/L), el perfil de proteínas de *A. brasiliensis* en CML es más abundante que en CMS (Figuras 16 y 27). Sin embargo, al incrementar la concentración de la fuente de carbono en CMS se ha observado que el secretoma de *A. brasiliensis* se vuelve más abundante y más complejo que en CML, lo cual puede ser debido a cambios en la morfología del hongo y el nivel de ramificación (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

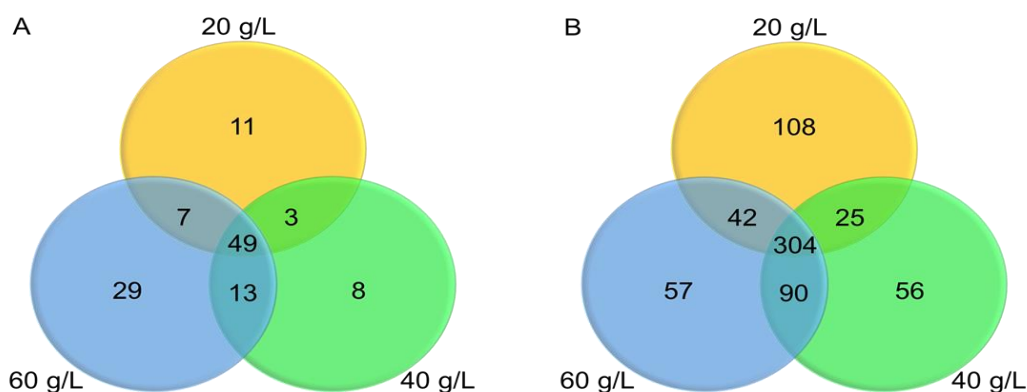


Figura 15. Distribución de proteínas del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS en función de la concentración de sacarosa (20 a 60 g/L). A) proteínas extracelulares, B) proteínas intracelulares.

El número de proteínas “Extra-Intra” en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS fue 10 veces mayor al observado en el proteoma obtenido en CML. La distribución de las proteínas “Extra-Intra” en función de la concentración de sacarosa (20, 40 y 60 g/L de sacarosa) fue diferente según su localización dentro o fuera de la célula (Figura 17 A y B), lo cual sugiere que en CMS muchas de esas proteínas pueden tener función “moonlighting” dependiendo de su ubicación en la célula (Jeffery, 2020). De las 452 proteínas “Extra-Intra”, 347 son enzimas de las cuales 82 cuentan con péptido señal, lo cual respalda su presencia extracelularmente.

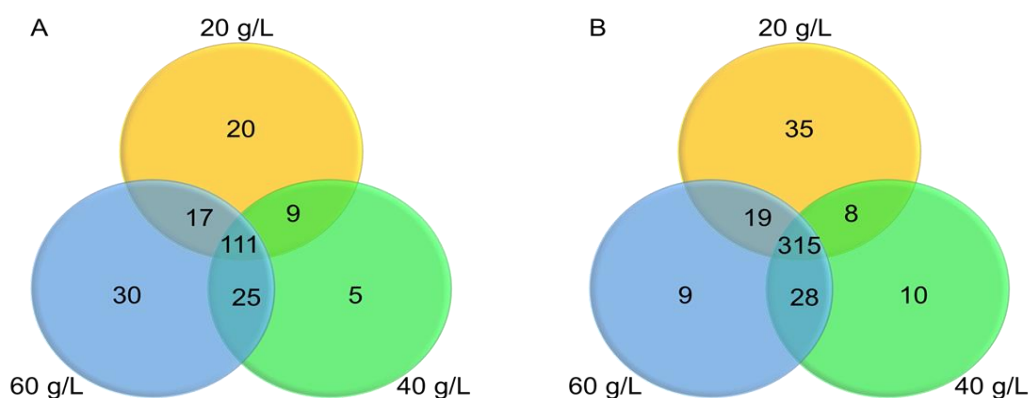


Figura 16. Distribución de proteínas “Extra-Intra” del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS en función de la concentración de sacarosa (20 a 60 g/L). A) distribución extracelular, B) distribución intracelular.

El proteoma de *A. brasiliensis* en CMS difiere del proteoma en CML en cuanto a número de proteínas y distribución según su función o proceso biológico (Figuras 18 y 29). El número de proteínas del proteoma obtenido en CMS con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L es menor que el número de proteínas obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa, no obstante, la distribución de proteínas según el proceso biológico en que participan es similar independientemente de la concentración de sacarosa. Más del 49% del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS está comprendido por proteínas de componentes celulares, metabolismo de carbohidratos y proteínas/proteólisis; mientras que el metabolismo energético y de nucleótidos son los menos representados con un porcentaje menor al 7% (Figura 18).

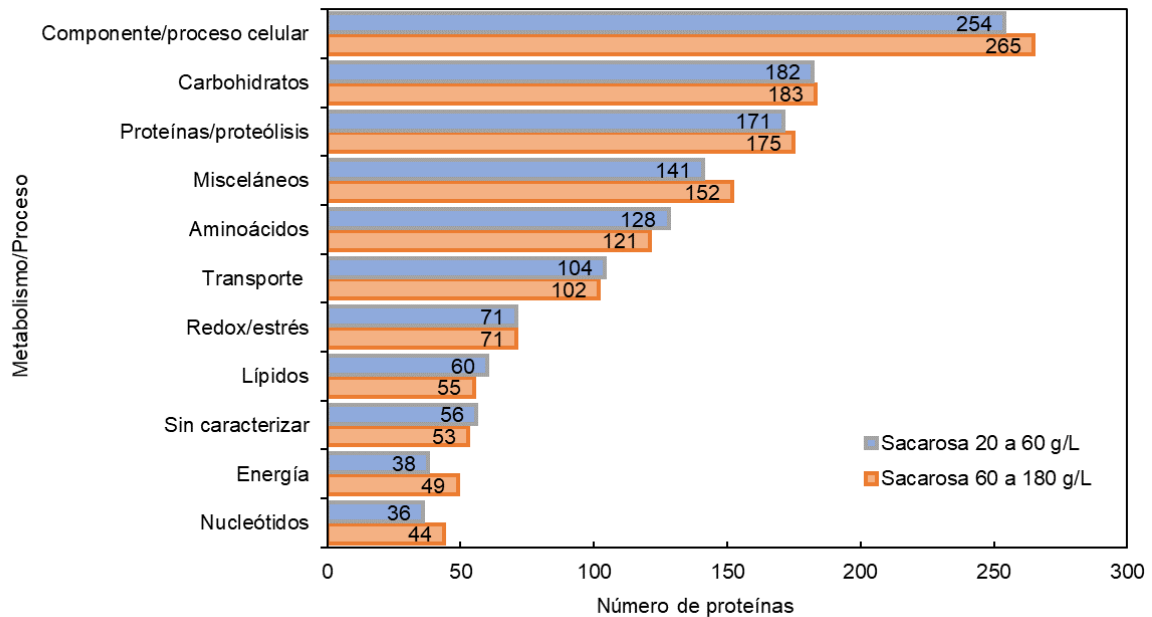


Figura 17. Clasificación del proteoma de *A. brasiliensis* obtenido en CMS con 20 a 180 g/L de sacarosa en función del metabolismo o proceso biológico en que participan las proteínas.

Basados en la CEP, las diez proteínas más abundantes representan el 26 y 27% de toda la CEP del proteoma de *A. brasiliensis* obtenido en CMS con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L, respectivamente (Figura 19). Todas son proteínas que se encuentran tanto extracelular como intracelular (“Extra-Intra”) a excepción de una proteína que contiene un dominio de hidrolasa 4, la cual es extracelular independientemente de la concentración de sacarosa y cuya CEP (8.54 Sp/mL) es 1.5 veces mayor en el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa que con 20 a 60 g/L de sacarosa. De esta proteína no se tiene información acerca del metabolismo en que participa. Ocho de las diez proteínas más abundantes en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS son comunes en el proteoma con concentración de sacarosa de 20 a 180 g/L. Únicamente la proteína con dominio Pyr_redox_2 y una isoforma de la proteína 14-3-3 son propias del proteoma con 20 a 60 g/L de sacarosa mientras que la proteína con dominio Aldo_ket_red y la glucosa oxidasa son propias del proteoma con 60 a 180 g/L de sacarosa. Mientras que en CML las 10 proteínas más abundantes están asociadas principalmente a procesos celulares, metabolismo redox/estrés y metabolismo energético y solo una proteína es sobre-regulada (subunidad de citocromo c oxidasa), en CMS 7 y 5 de las 10 proteínas más abundantes están sobre-reguladas (proteoma obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa y 60 a 180 g/L de sacarosa, respectivamente). El nivel de expresión de las proteínas en el proteoma de *A.*

brasiliensis en CMS cambia dependiendo de la concentración de sacarosa. Con baja concentración de sacarosa (20 a 60 g/L), la proteína Ecm33, la proteína con dominio Hydrolase_4, la exo-inulinasa, la superóxido dismutasa y la isomerasa putativa YbhE son sobre-reguladas. Sin embargo, con elevada concentración de sacarosa (60 a 180g/L) estas proteínas solo son abundantes y no están reguladas. La transaldolasa es la única proteína dentro del top diez proteínas más abundantes que se sobre-regula con elevada concentración de sacarosa (60 a 180 g/L).

Las proteínas del top diez proteínas más abundantes del proteoma en CMS están asociadas a componentes y/o procesos celulares (dos isoformas de la proteína 14-3-3), misceláneas (isomerasa YbhE, proteína Ecm33 y la proteína con el dominio Pyr_redox_2), Redox/estrés (Cu/Zn SOD y peroxirredoxina) y metabolismo de carbohidratos (transaldolasa y exo-inulinasa). Las dos isoformas de la proteína 14-3-3 se encuentran de forma abundante pero no regulada con concentración de 20 a 60 g/L de sacarosa. Sin embargo, una de las dos isoformas es bajo-regulada con concentración de 60 a 180 g/L de sacarosa (8.33 Sp/mL). La proteína 14-3-3 está asociada a diversos procesos celulares y cumple diferentes funciones, desde interacciones proteína-proteína (Heusden, 2009), transducción de señales, apoptosis, adhesión, proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Ibarra *et al.*, 2018) hasta secreción de proteínas (Vasara *et al.*, 2002). Mientras que en CML la proteína 14-3-3 es bajo-regulada, en CMS (con 20 a 60 g/L de sacarosa) es la proteína más abundante del proteoma de *A. brasiliensis* (14.55 Sp/mL) y su elevada abundancia puede estar asociada con la ramificación de las hifas y la secreción vesicular (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

Entre las proteínas clasificadas como misceláneas destaca la proteína con el dominio Pyr_redox_2 (Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa). Ésta es una sulfidril oxidasa cuya función enzimática y participación en el metabolismo depende de su especificidad por el sustrato, que va desde pequeños compuestos de tiol como el ditiotreitól a grupos tiol en proteínas. De forma intracelular ha sido objeto de estudio por su participación en el plegamiento de proteínas mientras que no está clara su función de forma extracelular (Faccio, Nivala and Kruus, 2011). Por su parte, la proteína Ecm33 anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) es conocida por estar involucrada en la integridad de la pared celular, conidiación y respuesta multi estrés de hongos filamentosos (Chen, Zhu, and Ying 2014). En *C. albicans* se encuentra de forma abundante en la pared celular, la membrana, vesículas extracelulares y en el medio extracelular. Aunque no se conoce su función, es

importante en la morfología de la pared celular y la virulencia de este microorganismo (Monteoliva, 2016). También, activa la ruta de señalización del complejo TOR-quinasa 1 (TORC1) lo cual permite una captación eficiente de glucosa y activación de la proliferación celular en *S. cerevisiae* (Umekawa *et al.*, 2017). La proteína Ecm33 es abundante (5.17 Sp/mL) y sobre-regulada en el proteoma de *A. brasiliensis* bajo condiciones de CMS con baja concentración de sacarosa (20 a 60 g/L); pero con elevada concentración de sacarosa (60 a 180 g/L), esta proteína no se encuentra regulada (8.86 Sp/mL). Sin embargo, en CML su abundancia es tan baja (menor a 9.1×10^{-3}) que probablemente participe en la asimilación de la fuente de carbono del medio únicamente en CMS.

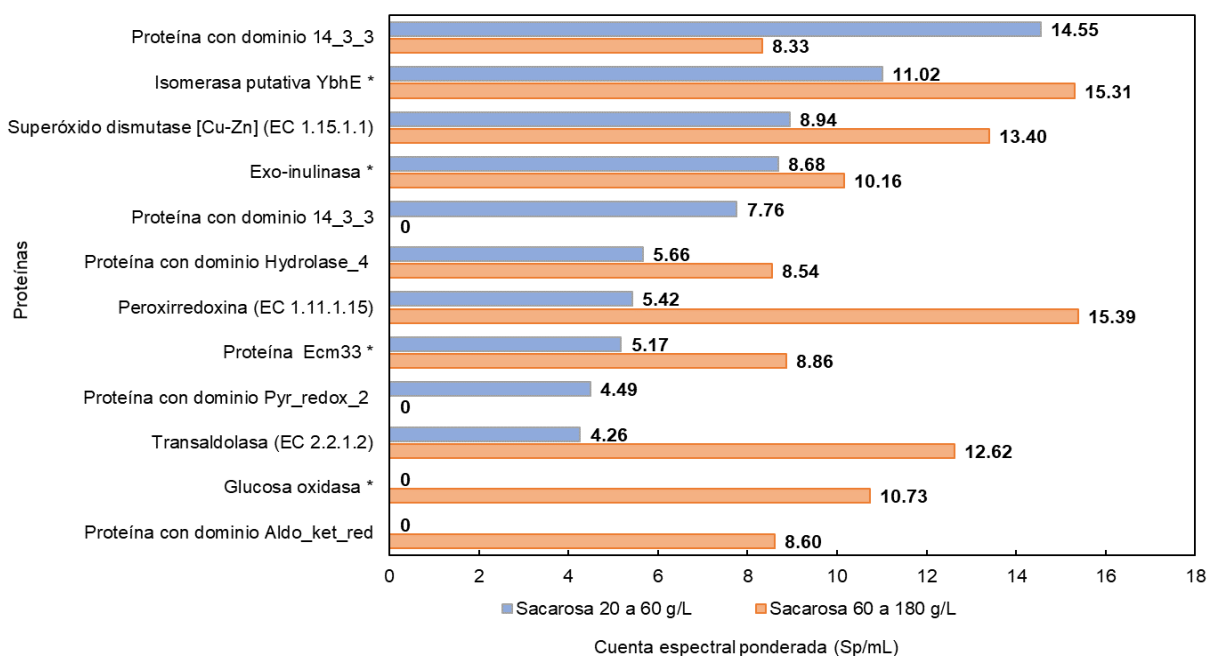


Figura 18. Top 10 proteínas más abundantes del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 180 g/L de sacarosa en función de su CEP.

Tanto en CML como en CMS, la Cu/Zn SOD es una de las diez enzimas más abundantes en el proteoma de *A. brasiliensis*. Aunque es conocida como una enzima antioxidante, también es considerada como factor de virulencia en *A. fumigatus* (Lambou *et al.*, 2010). Esta oxidorreductasa junto con la peroxirredoxina y la transaldolasa han sido reportadas por ser expresadas de forma abundante (Huberts and Klei, 2010) y por tener funciones moonlighting relacionadas con la adhesión en la superficie celular a matrices sólidas, proteínas solubles o células huésped (Amblee and Jeffery, 2015; Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Por lo tanto, es probable que estas enzimas abundantes cumplan más de una función dependiendo de su localización en el proteoma de *A. brasiliensis*. Finalmente, la

exo-inulinasa (8.68 Sp/mL) se encuentra sobre-regulada con concentración baja de sacarosa (20 a 60 g/L), mientras que es abundante no regulada (10.16 Sp/mL) con concentración elevada de sacarosa (60 a 180 g/L). Este es un resultado esperado ya que esta enzima está asociada al metabolismo directo de la sacarosa y sabemos que en CMS se minimiza o nulifica la represión catabólica además de que este sistema de cultivo mejora la producción enzimática (Behera and Ray, 2016).

Para tener una mejor comprensión biológica y bioquímica del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y poder compararlo con el proteoma obtenido en CML, cada grupo de proteínas extracelulares, intracelulares y “Extra-Intra” fue analizado en tres niveles:

1. Proteínas únicas, abundantes no reguladas y abundantes reguladas de acuerdo con su presencia en una o más concentraciones de sacarosa y el valor de su cuenta espectral ponderada (CEP).
2. Enzimas, no enzimas y proteínas sin caracterizar.
3. Función principal o proceso en el que están involucradas: proteínas no caracterizadas, componente/proceso celular, misceláneas, metabolismo de carbohidratos, proteínas/proteólisis, transporte y transporte mediado por vesículas, redox/estrés, energía, aminoácidos, lípidos y nucleótidos.

9.5.1. Proteínas únicas en CMS

El proteoma de *A. brasiliensis* en CMS cambia dependiendo de la concentración de sacarosa. Con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L se identificaron 88 proteínas únicas, mientras que al analizar el proteoma con concentración de sacarosa de 60 a 180 g/L se identificaron 195 proteínas únicas, lo cual demuestra que el incremento en la concentración de sacarosa incide en el aumento en el número de proteínas y variedad de funciones destacando una proteína interesante (proteína con dominio similar a SnoaL) producida con 180 g/L de sacarosa. Dicha proteína participa en la biosíntesis de nogalamisina que impide el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas (Sultana *et al.*, 2004). En las Tablas A5 y A6 (Anexos 5 y 6) están listadas las 88 y 195 proteínas únicas del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS. De las 88 proteínas únicas obtenidas en el proteoma con 20 a 60 g/L de sacarosa, 35 son extracelulares (10 proteínas de 20 g/L, 4 pertenecen a 40 g/L, mientras que 21 proteínas son únicas de 60 g/L de sacarosa) y, 27 son proteínas intracelulares de las cuales, la mayoría se encontraron con 20 g/L de sacarosa (15 proteínas). En el grupo de proteínas denominado “Extra-Intra” se

encontraron 26 proteínas únicas de las cuales 8 se obtienen con 20 g/L, 6 en 40 g/L y 12 en 60 g/L, respectivamente (Figura 20 A).

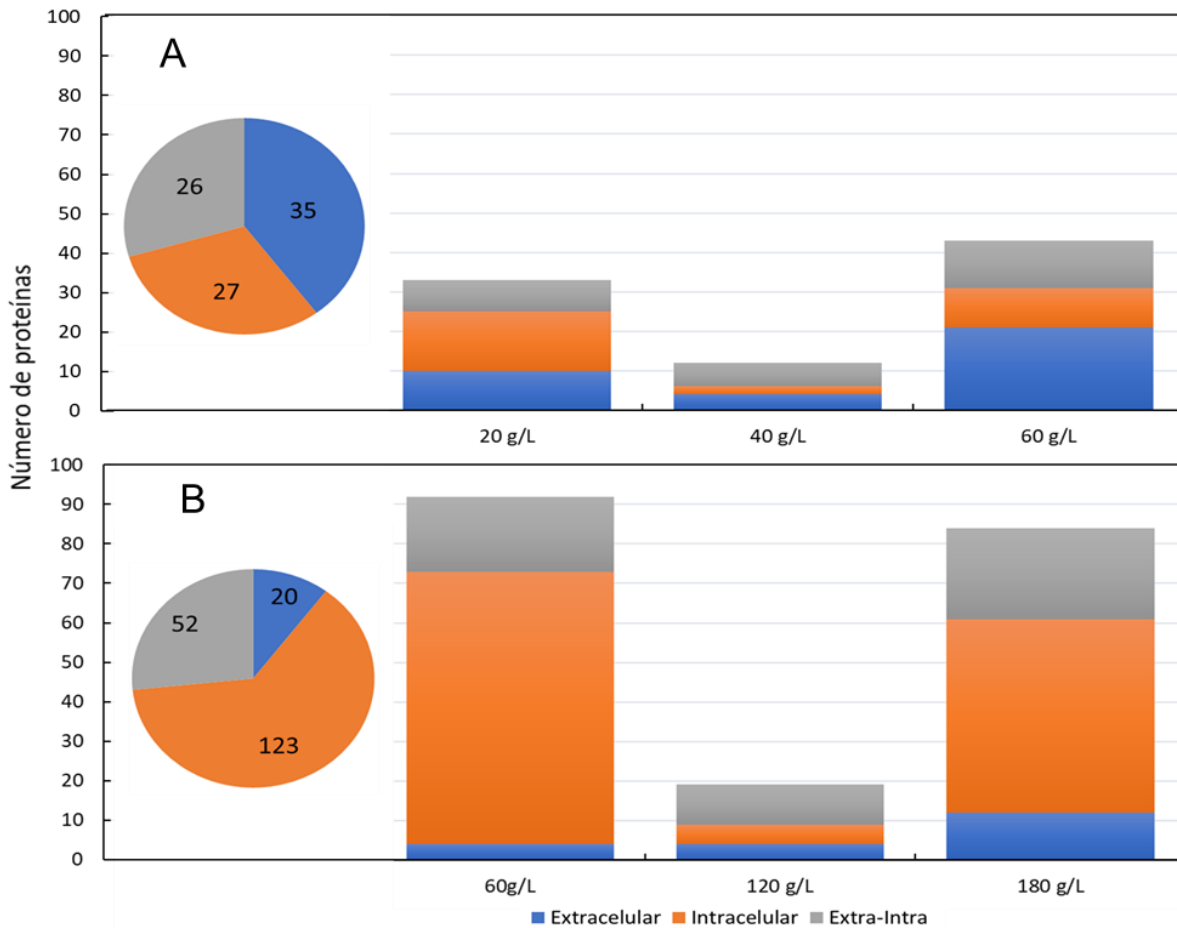


Figura 19. Distribución de proteínas únicas del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS en función de la concentración de sacarosa y ubicación en la célula. A) Proteoma de 20 a 60 g/L de sacarosa, B) Proteoma de 60 a 180 g/L de sacarosa.

En el proteoma obtenido con concentración elevada de sacarosa (60 a 180 g/L) predominan proteínas intracelulares (Figura 20 B) de las cuales, 69 proteínas son obtenidas con 60 g/L, 5 pertenecen a 120 g/L, mientras que 49 proteínas son únicas de 180 g/L de sacarosa.

En CMS hay mayor variedad de proteínas únicas que en CML ya que 57 de las 88 proteínas únicas son propias de CMS, mientras que en CML solo 39 de las 128 proteínas únicas son propias de CML. La mayoría de las proteínas únicas extracelulares en CMS cuentan con secuencia péptido señal (23 proteínas) mientras que ninguna de las 27 proteínas intracelulares presenta evidencia de secreción como se observó en CML. Seis de las

proteínas únicas del grupo “Extra-Intra” también cuentan con péptido señal y dos proteínas más son secretadas por mecanismos no convencionales (proteína con dominio fumaril acetoacetato hidrolasa y nucleósido difosfato quinasa). La fumaril acetoacetato hidrolasa es la última enzima en la vía del catabolismo de la tirosina y fenilalanina. Hidroliza el acetoacetato de fumarilo en fumarato y acetoacetato (Bateman et al. 2001). La presencia de esta enzima en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS puede estar relacionada con la producción de compuestos derivados de la tirosina como hormonas, polioles y pigmentos que funcionan como factores de tolerancia a condiciones ambientales de estrés (Carollo et al., 2010) o como factores de virulencia, tal es el caso de la piomelanina de *A. fumigatus* (Greene et al., 2014). La nucleósido difosfato quinasa, otra enzima encontrada tanto intracelular como de forma extracelular (secretada por mecanismos no convencionales) aparte de ser requerida para la homeostasis de nucleótidos ha sido reportada como enzima encargada de fosforilar la histidina, lo que a su vez es un mecanismo común de regulación de funciones celulares (Attwood and Wieland, 2015). Aunque de forma extracelular se desconoce la función de estas enzimas, ambas podrían estar asociadas a funciones moonlighting en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS.

Aunque en el presente trabajo se minimizó la posibilidad de obtener proteínas típicamente intracelulares en el secretoma, en la clasificación de proteínas únicas se encuentra un número importante de proteínas secretadas que típicamente son intracelulares (27 y 35 proteínas con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L, respectivamente). Mientras que en CML, las proteínas secretadas que comúnmente son intracelulares aumentan con el aumento en la concentración de sacarosa, en CMS con baja concentración de sacarosa no parece haber influencia directa en el número de proteínas secretadas que comúnmente son intracelulares (6 proteínas de 20 g/L, 4 proteínas de 40 g/L y 17 proteínas de 60 g/L). Sin embargo, el número de proteínas extracelulares que son típicamente intracelulares incrementa en función de la concentración de sacarosa (60 a 180 g/L). Las proteínas secretadas con 60 g/L de sacarosa que comúnmente son intracelulares participan en mayor cantidad de metabolismos o procesos celulares que las obtenidas con 20 y 40 g/L de sacarosa, principalmente misceláneas y redox/estrés, donde destacan la proteína con dominio DLH que participa en la degradación de clorocatecol, la proteína que contiene el dominio VOC que confiere resistencia a bleomicina y fosfomicina y oxidorreductasas con funciones asociadas a la respuesta a estrés (proteína con dominio nitroreductasa, proteína con dominio Aha1_N y la superóxido dismutasa). En CMS existe

mayor variedad de proteínas/enzimas que participan en diferentes metabolismos que en CML. La presencia de enzimas antioxidantes en el proteoma en CMS es indicador de una red antioxidante más eficiente que en CML durante las primeras etapas del crecimiento fúngico. La presencia de enzimas antioxidantes también podría estar relacionada con una mayor producción de ROS en este sistema de cultivo (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

Por otro lado, el 41% y el 48% de las proteínas únicas son enzimas (de 20 a 60 g/L de sacarosa y de 60 a 180 g/L de sacarosa, respectivamente). Dieciocho proteínas están implicadas en el metabolismo de carbohidratos, de las cuales, doce, una y cinco (de 20, 40 y 60 g/L, respectivamente) están involucradas en el metabolismo de carbohidratos (clasificación CAZy). En el proteoma con alta concentración de sacarosa, veintitrés proteínas únicas están implicadas en la clasificación CAZy. (10, 2 y 11 proteínas de 60, 120 y 180 g/L de sacarosa, respectivamente). Dentro de las enzimas CAZy obtenidas con baja concentración de sacarosa, ocho están clasificadas como actividades auxiliares (AA) del metabolismo de carbohidratos, tres son carbohidrato esterasas (CE) y siete glicosil hidrolasas (GH) las cuales están implicadas en la degradación de polisacáridos (Figura 21 A). De las enzimas CAZy obtenidas con alta concentración de sacarosa (Figura 21 B), cuatro están clasificadas como AA del metabolismo de carbohidratos, cuatro son CE, once son GH, tres son glicosil transferasas (GT), y solo una es una polisacárido liasa (PL). A diferencia de CML donde la glucosa oxidasa es la enzima CAZy única con mayor abundancia (0.29 Sp/mL) producida con 40 g/L de sacarosa (Figura 32, Tabla A11), en CMS las enzimas CAZy únicas de mayor abundancia fueron la endo-arabinasa (0.85 Sp/mL) producida con 20 g/L de sacarosa (Tabla A5) y la endo-inulinasa (1.53 Sp/mL) producida con 180 g/L de sacarosa (Tabla A6). El perfil de producción de enzimas CAZy en CMS y CML da evidencia de que las enzimas únicas implicadas en el metabolismo de carbohidratos son principalmente asociadas a la degradación de polisacáridos en CMS mientras que en CML están involucradas en el metabolismo de carbohidratos menos complejos (disacáridos y monosacáridos).

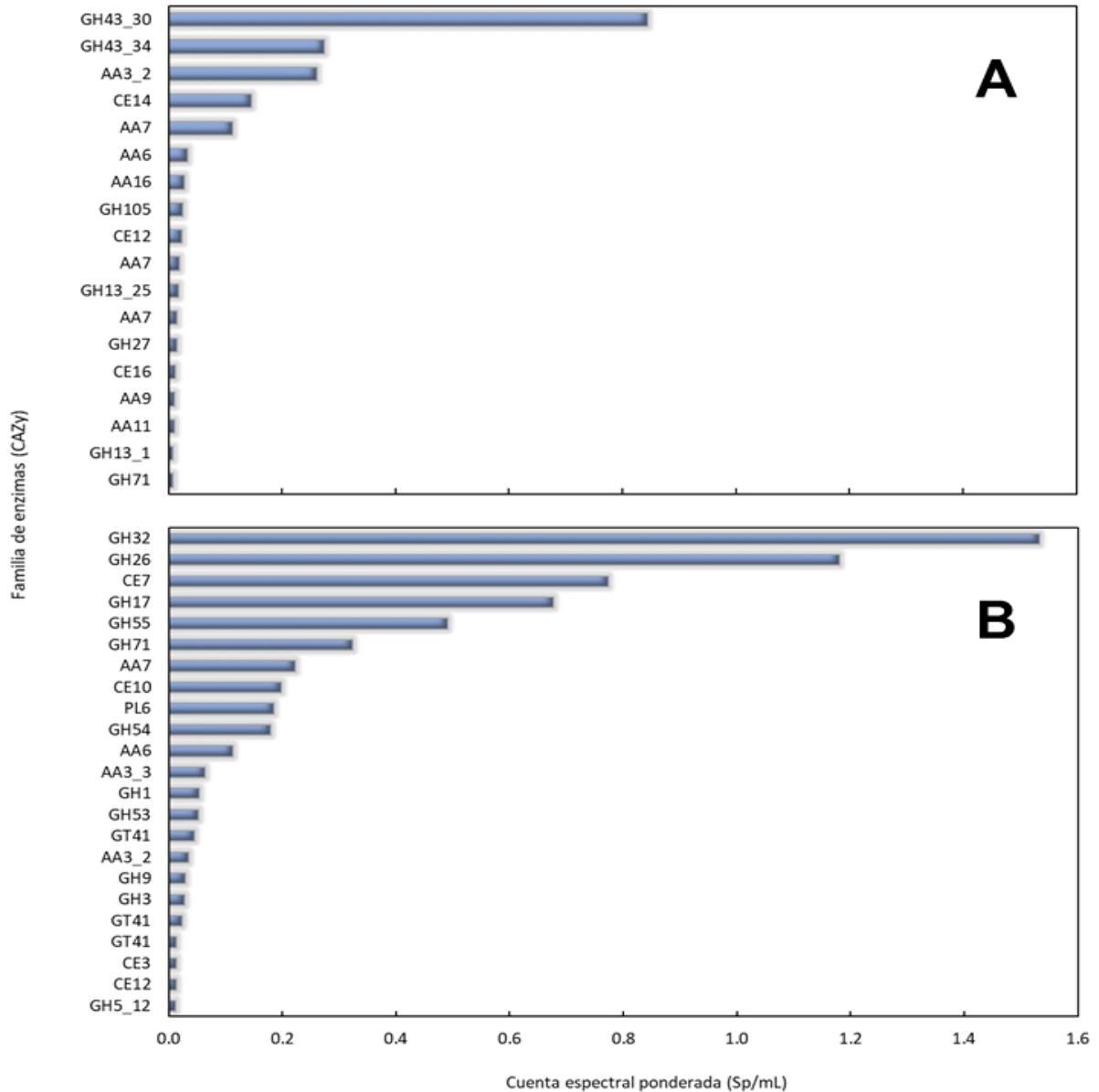


Figura 20. Clasificación CAZy de las enzimas únicas del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS. A) Proteoma de 20 a 60 g/L de sacarosa, B) Proteoma de 60 a 180 g/L de sacarosa.

En CMS, la distribución de las proteínas únicas según la función principal es diferente dependiendo de la concentración de sacarosa (Figura 22A). Con concentración baja de sacarosa (20 a 60 g/L), los metabolismos con mayor número de proteínas son componente/proceso celular, misceláneas y carbohidratos con 16, 15 y 13 proteínas, respectivamente. Mientras que, con concentración alta de sacarosa (60 a 180 g/L) los metabolismos con mayor número de proteínas son componente/proceso celular, proteínas/proteólisis y misceláneas con 41, 29 y 26 proteínas, respectivamente. Por otro

lado, los metabolismos donde hay menor número de proteínas son el de nucleótidos y aminoácidos (1 y 3 proteínas, respectivamente con 20 a 60 g/L de sacarosa) y el de lípidos y transporte (6 y 8 proteínas, respectivamente con 60 a 180 g/L de sacarosa). Las proteínas únicas clasificadas como componente/proceso celular están asociadas a componentes (núcleo, ribosoma, membrana, pared celular) o procesos celulares (transcripción y regulación). Algunas de las proteínas clasificadas como misceláneas están implicadas en varios metabolismos (proteína con dominio WSC, proteína con dominio PKS_ER (policétido sintasa)), mientras que otras participan en la resistencia a antibióticos (proteína que contiene dominio VOC), patogenicidad (proteína con dominio Cupin_2 y proteína de unión a inmunoglobulina E), adhesión (proteína de unión a microtúbulos HOOK3) y síntesis de pigmentos (tirosinasa). Con baja concentración de sacarosa (20 a 60 g/L), todas las proteínas únicas asociadas al metabolismo de carbohidratos (13 proteínas, 15%), son enzimas degradadoras de polisacáridos excepto por la piruvato deshidrogenasa que es la única enzima con participación en las vías metabólicas centrales. Mientras que con alta concentración de sacarosa (60 a 180 g/L), hay mayor variedad de enzimas degradadoras de polisacáridos y mayor número de proteínas del metabolismo de carbohidratos involucradas en las vías metabólicas centrales. La piruvato deshidrogenasa es encargada de la descarboxilación oxidativa del piruvato producido generando acetil-CoA que es incorporada en el ciclo del ácido cítrico o utilizado para la síntesis de ácidos grasos (Milne and Institutes, 2013). La piruvato deshidrogenasa también juega un papel importante en la resistencia a estrés incluyendo especies reactivas de oxígeno (Tram *et al.*, 2021). Por lo tanto, su presencia en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 g/L de sacarosa también puede estar relacionada con la respuesta al estrés oxidativo ya que las especies reactivas de oxígeno incrementan en función de la concentración de sustrato (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Doce proteínas únicas tienen participación en procesos redox y de respuesta a estrés. Entre estas destacan dos isoformas de superóxido dismutasa que también está presente en CML, la flavodoxina, la alcohol deshidrogenasa y la tiorredoxina que son conocidas por tener funciones moonlighting asociadas a la adhesión en la superficie celular (Huberts and Klei, 2010; Amblee and Jeffery, 2015). De forma interesante en CML las proteínas únicas clasificadas como proteínas/proteólisis están involucradas en el plegamiento y modificación de proteínas y son producidas con 20 g/L de sacarosa. Mientras que en CMS las proteínas de la misma clasificación no solo están involucradas en el plegamiento y modificación de proteínas, sino que también están involucradas en el catabolismo de proteínas mediado por el proteasoma (componente PRE2 del proteasoma)

o peptidasas (proteína con dominio peptidasa_M24) que son producidas con 60 g/L de sacarosa.

Basándonos en la abundancia, la distribución de proteínas únicas según el metabolismo o proceso es diferente que si solo nos basamos en el número de proteínas. Este comportamiento es similar a lo que ocurre con el grupo de proteínas únicas en CML. A pesar de que las proteínas clasificadas como componente/proceso celular comprenden un número elevado de proteínas (Figura 22A), la suma de su CEP es menor que la suma de la CEP de otros metabolismos como el de carbohidratos y proteínas/proteólisis que son de los más abundantes junto con el metabolismo de nucleótidos en el grupo de proteínas únicas obtenidas con 20 a 60 g/L de sacarosa (Figura 22B) bajo estas condiciones de concentración de sacarosa, la nucleósido difosfato quinasa (4.25 Sp/mL) es la única enzima del metabolismo de nucleótidos. Es la proteína más abundante del grupo de proteínas únicas (de 20 a 60 g/L de sacarosa) y su CEP es casi 4 veces mayor a la suma de la CEP de las 11 proteínas del metabolismo de nucleótidos obtenidas con 20 a 60 g/L de sacarosa.

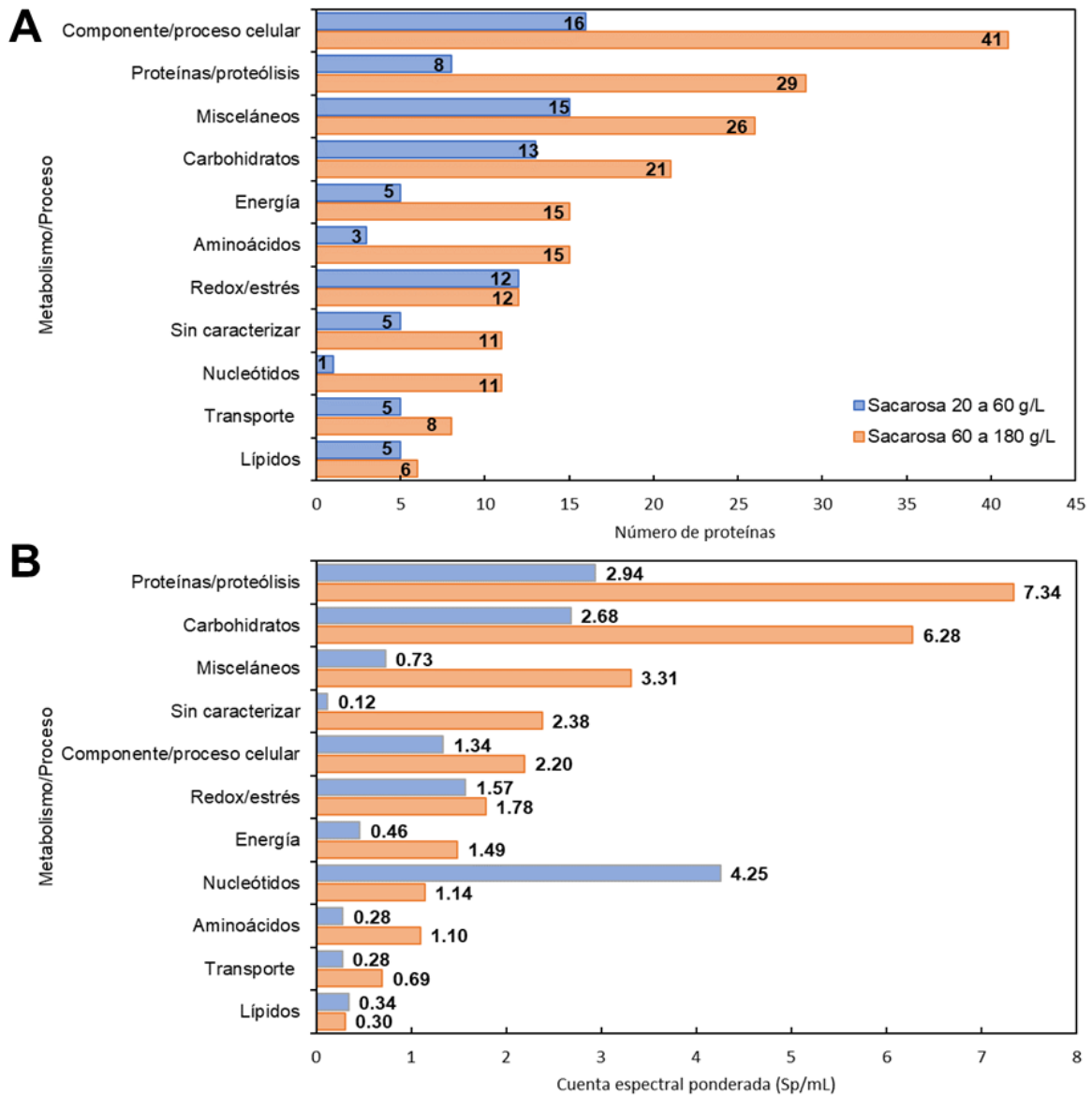


Figura 21. Clasificación de las proteínas únicas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS. A) número de proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan, B) cuenta espectral ponderada de las proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan.

Comparando CMS y CML con la misma concentración de sacarosa (20 a 60 g/L) encontramos que la alta concentración de sacarosa (60 g/L) permite mayor secreción y diversidad de proteínas únicas extracelulares en ambos sistemas de cultivo (Figuras 20 y 31; Tablas A5 y A11). Mientras que, con la concentración más baja de sacarosa evaluada (20 g/L) se obtiene la mayor cantidad de proteínas únicas intracelulares. El comportamiento es similar al comparar CMS (60 a 180 g/L de sacarosa) con CML (20 a 60 g/L de sacarosa);

con la concentración más alta de sacarosa (180 y 60 g/L para CMS y CML, respectivamente) se obtiene mayor secreción y diversidad de proteínas únicas extracelulares y con la concentración más baja de sacarosa (60 y 20 g/L para CMS y CML, respectivamente) se obtiene la mayor cantidad de proteínas únicas intracelulares, resaltando que en CMS con concentración alta de sacarosa hay hasta 4.5 veces más proteínas intracelulares que con concentración baja de sacarosa (Figuras 20 y 31; Tablas A6 y A11).

9.5.2. Proteínas abundantes no reguladas en CMS

Del mismo modo que con las proteínas únicas, el incremento en la concentración de sacarosa incide en el incremento en el número de proteínas abundantes no reguladas y variedad de funciones. De 20 a 60 g/L de sacarosa se identificaron 75 proteínas abundantes no reguladas mientras que de 60 a 180 g/L de sacarosa se identificaron 98 proteínas abundantes no reguladas con gran variedad de funciones. El 5.1% del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS obtenido con baja concentración de sacarosa (75 proteínas) son proteínas abundantes no reguladas (Tabla A7). Todas las proteínas están presentes en cada concentración de sacarosa evaluada (20, 40 y 60 g/L), excepto por la terpenoide sintasa y una isoforma de la proteína con dominio 14-3-3 que de forma extracelular se encontraron con 20 y 60 g/L de sacarosa mientras que de forma intracelular se encontraron con las tres concentraciones de sacarosa evaluadas. Según su ubicación en la célula, 10 proteínas son extracelulares, 42 proteínas son intracelulares y 23 proteínas se encuentran en el grupo denominado "Extra-Intra". Nueve de las diez proteínas extracelulares presentan secuencia péptido señal que respalda su secreción al exterior de la célula y solo una proteína no caracterizada carece de evidencias de secreción. De las 42 proteínas intracelulares, solo una proteína que contiene dominio epimerasa cuenta con evidencias de secreción. Las epimerasas junto con las racemasas son conocidas por catalizar la inversión de la distribución espacial de los átomos de moléculas, lo cual es una forma eficiente para la degradación o síntesis de aminoácidos y azúcares (Tanner, 2002). Enzimas como la UDP-N-Acetil glucosamina 2-epimerasa y la L-ribulosa fosfato 4-epimerasa son ejemplos de epimerasas que utilizan NAD⁺ como cofactor y son utilizadas para la biosíntesis de polisacáridos de la superficie celular y para la interconversión de L- ribulosa 5- fosfato y D-xilulosa 5-fosfato, respectivamente (Tanner, 2002). No obstante, la NAD (P)H-hidrato epimerasa cataliza la epimerización de las formas S y R de NAD(P)HX, una forma dañada de NAD(P)H, pero además existe evidencia bioinformática que sugiere que esta epimerasa tiene una segunda función conectada a la vitamina B6 (Niehaus *et al.*, 218AD). Por lo tanto,

más estudios son requeridos para comprobar la función precisa de la epimerasa de *A. brasiliensis*. La ADP/ATP translocasa (también encontrada con 60 a 180 g/L de sacarosa) y la UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa son otras dos enzimas intracelulares que no cuentan con secuencia péptido señal, pero son enzimas de membrana celular. Estas dos enzimas son indicadoras de que se mantiene activa la síntesis de ATP y de polisacáridos de pared celular en los cultivos en medio sólido de *A. brasiliensis*. La ADP/ATP translocasa se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y media el intercambio transmembrana de ADP y ATP, proporcionando ADP a la ATPasa mitocondrial (complejo V). También promueve la mitofagia de forma independiente a su actividad catalítica (Hoshino *et al.*, 2019). La UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa participa en la síntesis de nucleótidos de azúcar cuyo destino puede estar asociado al almacenamiento de azúcar en forma de glucógeno (cuando hay altos niveles de azúcar en el medio) o para la síntesis de pared celular (Vuyst, Vin and Brussel, 2007). Por otro lado, seis proteínas dentro del grupo de proteínas “Extra-Intra” presentan evidencia de secreción: la proteína con dominio Peptidasa A1, una alfa/beta hidrolasa y la glucosa oxidasa cuentan con péptido señal mientras que la glucosa-6-fosfato isomerasa, una proteína con dominio aldehído deshidrogenasa y la nucleósido difosfato quinasa son secretadas por mecanismos no convencionales.

Las proteínas abundantes no reguladas (98 proteínas) en el proteoma de *A. brasiliensis* obtenido con alta concentración de sacarosa representan el 6.7% del proteoma total (Tabla A8). Veintiséis de las 98 proteínas están presentes en solo dos de las tres concentraciones de sacarosa evaluadas (60, 120 y 180 g/L). Según su ubicación en la célula, 15 proteínas son extracelulares, 64 proteínas son intracelulares y 19 proteínas se encuentran en el grupo denominado “Extra-Intra”. Once de las quince proteínas extracelulares presentan secuencia péptido señal que respalda su secreción al exterior de la célula. De las cuatro proteínas restantes, una proteína con dominio ACB y una proteína no caracterizada presentan evidencia de ser citosólicas, la proteína con dominio NmrA con carácter estructural forma parte del citoesqueleto y solo una proteína con dominio de cianovirina (CVNH) carece de evidencias de secreción y localización en algún compartimento celular. Seis de las 64 proteínas intracelulares contienen secuencia péptido señal (dos isoformas de disulfuro isomerasa, chaperona BiP, subunidad alfa de ATP sintasa, homoserina deshidrogenasa y subunidad Rieske del citocromo c reductasa). La presencia de proteínas intracelulares con péptido señal puede ser debida a que las secuencias péptido señal no solo marcan el destino de las proteínas al exterior de las células, también intervienen en el estado de

plegamiento de las proteínas, la *N*-glicosilación y señalizan la localización en compartimentos celulares (Owji *et al.*, 2018). Por otro lado, ocho proteínas dentro del grupo de proteínas “Extra-Intra” presentan evidencia de secreción (la proteína con dominio glucosa oxidasa, una proteína con dominio tirosinasa Cu-bdy, una glicosil hidrolasa, una proteína con dominio Amb_all, una 1,3-beta-glucanosil transferasa, la proteína Ecm33, la Exo-inulinasa y una isomerasa putativa YbhE) y la nucleósido difosfato quinasa es secretada por mecanismos no convencionales.

El 52% de las proteínas abundantes no reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa son enzimas (7 extracelulares, 17 intracelulares y 15 “Extra-Intra”), de las cuales, siete, una y dos, respectivamente están involucradas en el metabolismo de carbohidratos (clasificación CAZy). El número de enzimas presente en el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa es similar con el obtenido en el proteoma de 20 a 60 g/L de sacarosa (7 extracelulares, 20 intracelulares y 15 “Extra-Intra”). Seis, tres y siete, respectivamente están presentes en la clasificación CAZy. Dentro de las enzimas CAZy (Figura 23), la proteína que contiene el dominio Amb_all (pectina liasa F) está clasificada como polisacárido liasa (PL1_4). Dos isoformas de esta enzima están presentes en el proteoma con concentración de sacarosa de 60 a 180 g/L (0.55 y 3.5 Sp/mL, respectivamente). Esta pectina liasa es una de las enzimas degradadoras de pared celular de plantas que actúa sobre los polímeros de pectina (Yadav *et al.*, 2009). Tiene aplicación a nivel industrial, es empleada en la clarificación de jugos para degradar la pectina sin alterar el grupo éster que es responsable del aroma específico del jugo y tampoco conduce a la formación de metanol que es tóxico (Yadav *et al.*, 2008) y, en la industria textil es utilizada en el desgomado y enriado de fibras naturales como cáñamo, yute, lino (Yadav *et al.*, 2009; Chiliveri, Koti and Linga, 2016). Dos isoformas de malato deshidrogenasa son las enzimas más abundantes en el grupo de enzimas CAZy del proteoma obtenido con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L (3.2 y 2.8 Sp/mL, respectivamente) (Figura 23A). Estas dos isoformas cambian en abundancia en el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa (1.3 y 3.7 Sp/mL) (Figura 23B). En CML se encontró una isoforma de malato deshidrogenasa como enzima única de la concentración de 40 g/L de sacarosa, mientras que en CMS se encontraron dos isoformas de forma abundante no regulada (20, 40, 60, 120 y 180 g/L de sacarosa) de las cuales probablemente una participa de forma directa en el ciclo de Krebs y otra funciona como lanzadera de malato y oxalacetato a través de la membrana mitocondrial (Minárik *et al.*, 2002). En menor abundancia que la malato deshidrogenasa, se encontraron otras tres glicosil hidrolasas en el proteoma obtenido con

concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L (Figura 23A) que están involucradas en la degradación de polisacáridos: endoglucanasa A (1.6 Sp/mL) que es 28 veces más abundante que en CML, proteína que contiene dominio de celulasa (0.6 Sp/mL), una beta-xilanasasa (0.3 Sp/mL) que es 6 veces más abundante que en CML. En el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa se encontraron ocho glicosil hidrolasas aparte de las dos isoformas de malato deshidrogenasa (Figura 23B). Estas glicosil hidrolasas son principalmente degradadoras de polisacáridos como la inulina, celulosa, almidón y xilano. La exo-inulinasa (GH32) es la enzima con mayor abundancia en el grupo de enzimas CAZy (10.2 Sp/mL), seguido de la endo-1,4-beta-xilanasasa (GH11) con abundancia de 6.9 Sp/mL (Figura 23B). Estas dos enzimas son 31 y 22 veces, respectivamente más abundantes que las obtenidas en CML (Figura 34). La presencia de forma abundante no regulada de la endoglucanasa A, proteína con dominio celulasa, beta-xilanasasa y exo-inulinasa puede ser explicada debido a que son enzimas inducibles por carbohidratos cuya estructura se basa en unidades de glucosa (celulosa, celobiosa y maltosa) y de fructosa (Kumar and Naraiian, 2019).

La proteína que contiene el dominio SUN (0.2 Sp/mL) es la glicosil hidrolasa (GH132) menos abundante en el grupo de enzimas CAZy del proteoma obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa. Esta enzima juega un rol importante en la biogénesis de pared celular y formación de septos en *A. fumigatus* (Gastebois *et al.*, 2013). Tres enzimas más están clasificadas como actividad auxiliar del metabolismo de carbohidratos. Entre estas, la glucosa oxidasa (AA3_2) es la tercer enzima más abundante (2.7 Sp/mL) en la clasificación de enzimas CAZy y es alrededor de 67 veces más abundante en CMS que en CML (Figuras 23A y 34). El hecho de que la glucosa oxidasa sea una enzima abundante no regulada en todas las concentraciones de sacarosa evaluadas en CMS (20 a 180 g/L), puede ser un indicador de oxidación extracelular de la glucosa generada después de la hidrólisis de sacarosa, lo cual implica que la vía de las pentosas es altamente activa en CMS ya que el ácido glucónico obtenido como producto de la oxidación extracelular de la glucosa (Wohlfahrt *et al.*, 2004) es incorporado y metabolizado en la vía de las pentosas (Lu *et al.*, 2010; Stincone *et al.*, 2015). Adicionalmente la mayor abundancia de las enzimas CAZy extracelulares en CMS respecto a CML puede ser asociada con el mayor nivel de ramificación en CMS (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

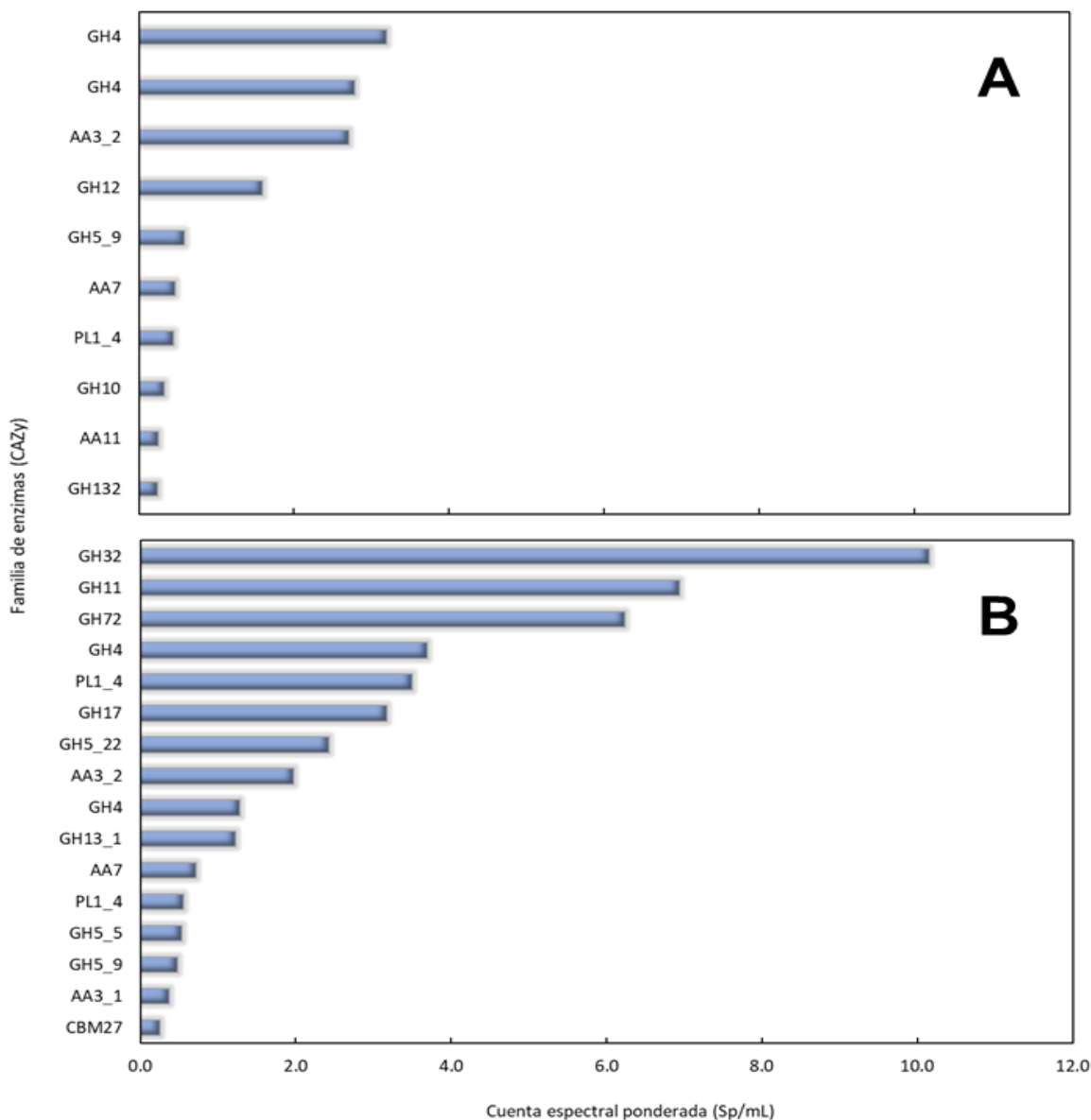


Figura 22. Clasificación CAZy de las enzimas abundantes no reguladas del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS. A) Proteoma de 20 a 60 g/L de sacarosa, B) Proteoma de 60 a 180 g/L de sacarosa.

La distribución de las proteínas abundantes no reguladas según la función principal de las cambia en el proteoma dependiendo de la concentración de sacarosa (Figura 24A). Las proteínas asociadas a componentes (núcleo, ribosoma, membrana, pared celular) o procesos celulares (transcripción y regulación) comprenden el grupo más numeroso (20 y 30 proteínas con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L, respectivamente), seguido de las proteínas del metabolismo de carbohidratos 12 y 18 proteínas con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L y de 60 a 180 g/L,

respectivamente). Las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos que son extracelulares en CMS (20 a 60 g/L de sacarosa) son enzimas CAZy involucradas en la degradación de polisacáridos que también fueron encontradas en CML (beta xilanas, y endoglucanasa A). Mientras que las enzimas CAZy extracelulares en CMS (60 a 180 g/L de sacarosa) que también son encontradas de forma abundante no regulada en CML son la endoglucanasa A y la endo-1,4-beta-xilanas. Las proteínas intracelulares abundantes no reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS que pertenecen al metabolismo de carbohidratos, participan en el metabolismo central de forma independiente de la concentración de sacarosa. Por ejemplo, la fosfotransferasa (hexoquinasa) juega un rol importante en el control de la glucólisis. Fosforila a la glucosa y otras hexosas (manosa, fructosa) y las hexosas 6-fosfato resultantes se pueden descomponer en piruvato mediante glucólisis o se pueden usar para diferentes biosíntesis (Schaffingen, 2021). Se conocen diferentes isoformas de hexoquinasas entre las cuales la hexoquinasa 1 de plantas cumple funciones moonlighting ya que aparte de participar en la glucólisis cumple un rol en la señalización de glucosa (Moore *et al.*, 2003). La piruvato carboxilasa y la malato deshidrogenasa pertenecen al ciclo del ácido cítrico. La primera, es una enzima multifuncional que es encargada de transformar el piruvato en oxalacetato dando inicio al ciclo de Krebs, también participa en el primer paso de la gluconeogénesis (Valle, 2017). Adicionalmente, la piruvato carboxilasa es una enzima moonlighting que en levaduras como *Pichia pastoris* es esencial para la orientación y el ensamblaje adecuados de la proteína peroxisomal alcohol oxidasa (Huberts and Klei, 2010). Como mencionamos anteriormente, la malato deshidrogenasa puede tener participación directa en el ciclo de Krebs o funciona como lanzadera de malato y oxalacetato a través de la membrana mitocondrial (Minárik *et al.*, 2002). En cuanto a las proteínas “Extra-Intra” que son del metabolismo de carbohidratos (20 a 60 g/L de sacarosa), destacan también enzimas de las vías metabólicas centrales: glucosa-6-fosfato isomerasa (glucólisis), malato deshidrogenasa (ciclo de Krebs) y transaldolasa (vía de las pentosas). Estas tres enzimas son conocidas por tener funciones asociadas con la adhesión cuando se encuentran en el exterior de la célula (Amblee and Jeffery, 2015; Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Mientras que las proteínas “Extra-Intra” que son del metabolismo de carbohidratos (60 a 180 g/L de sacarosa) son degradadoras de polisacáridos (endo-1,3-beta-glucosidasa, pectina liasa F y exo-inulinasa) y también enzimas del metabolismo central (lactato glutatión liasa (metabolismo de piruvato), triosa fosfato isomerasa (glucólisis) y malato deshidrogenasa (ciclo de Krebs)).

El tercer grupo de proteínas más numeroso en el proteoma obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa es el del metabolismo de aminoácidos, mientras que en el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa es el cuarto grupo más numeroso. A diferencia de CML donde no estuvo activo el metabolismo de aminoácidos en CMS están presentes nueve y ocho enzimas, respectivamente. Esto confirma que el proteoma es dinámico y que el sistema de cultivo y la concentración de fuente de carbono tienen influencia en la expresión de proteínas (Oda *et al.*, 2006). La 3-hidroxi isobutirato deshidrogenasa es la única enzima abundante no regulada que participa en el catabolismo de aminoácidos (valina, leucina e isoleucina) lo cual puede estar relacionado a que *A. brasiliensis* fue sometido a condiciones de estrés por ejemplo agotamiento de la fuente de carbono y por lo tanto, oxidó estos aminoácidos para incorporarlos en la cadena respiratoria y producir ATP (Schertl, Danne and Braun, 2017). Según la base de datos KEEG, el resto de las enzimas abundantes no reguladas involucradas en el metabolismo de aminoácidos participan en la biosíntesis de metionina y cisteína (adenilil sulfato quinasa), lisina (dihidrodipicolinato sintasa y homoserina deshidrogenasa), L-homocisteína (adenocil homocisteínasa), arginina (aspartato aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa) y metionina (metionina sintasa independiente de cobalamina y S-adenosil metionina sintasa). Las proteínas abundantes no reguladas clasificadas como misceláneas (cumplen funciones variadas) son el cuarto grupo de proteínas más numeroso en el proteoma obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa y el tercer grupo más numeroso en el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa. Dentro de este grupo de proteínas destaca la proteína con dominio ABM que es producida de forma única en CML con 60 g/L de sacarosa mientras que en CMS es producida con 20, 40, 60, 120 y 180 g/L de sacarosa. El dominio ABM es un dominio de monooxigenasa que participa en la síntesis de antibióticos (She *et al.*, 2010). No obstante, en *A. brasiliensis* puede estar implicado en la patogenicidad como en el caso de *Magnaporthe oryzae* (hongo patógeno de plantas) que posee la monooxigenasa de biosíntesis de antibióticos la cual convierte jasmonatos (hormonas vegetales de tipo oxilipina que están implicadas en diversos aspectos del desarrollo del crecimiento de las plantas y su respuesta al estrés) en su versión hidroxilada 12-OH-JA (Schweizer and Goossens, 2016) y de este modo facilita la colonización al atenuar la respuesta de defensa de las plantas (Patkar *et al.*, 2015). Los cuatro grupos de proteínas previamente descritos (Componente/proceso celular, Carbohidratos, aminoácidos y misceláneas) cambian su orden si nos basamos en su abundancia determinada a partir de su CEP (Figura 24B). El resto de las proteínas clasificadas como proteínas/proteólisis, redox/estrés, sin caracterizar, energía, lípidos,

nucleótidos y transporte tienen un número similar de proteínas (Figura 24A). La suma de su CEP cambia denotando mayor abundancia de unos metabolismos sobre otros. Proteínas abundantes no reguladas del metabolismo de lípidos (Figura 24A) son producidas por *A. brasiliensis* en CMS, mientras que en CML no se encontraron proteínas abundantes de este metabolismo comprobando que hay mayor producción de lipasas en CMS que en CML (Falony *et al.*, 2006), además de que en CMS no solo el secretoma sino el proteoma completo es más complejo que en CML con mayor diversidad de proteínas implicadas en numerosos metabolismos (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

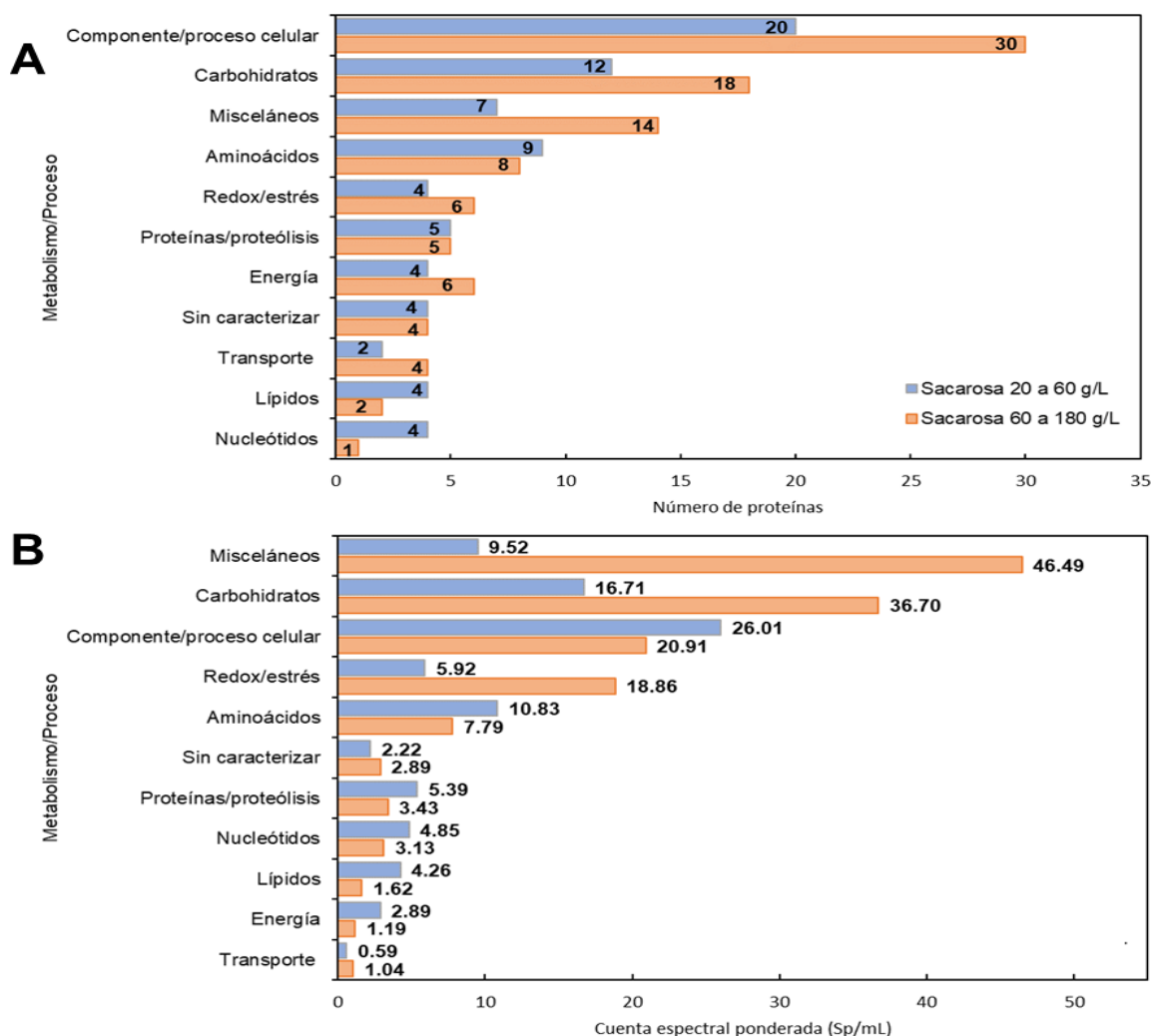


Figura 23. Clasificación de las proteínas abundantes no reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS. A) número de proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan, B) cuenta espectral ponderada de las proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan.

9.5.3. Proteínas abundantes reguladas en CMS

Con el incremento en la concentración de sacarosa disminuye el número de proteínas abundantes reguladas. De 20 a 60 g/L de sacarosa se identificaron 74 proteínas abundantes reguladas mientras que de 60 a 180 g/L de sacarosa se identificaron 50 proteínas abundantes reguladas. El 5% del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS (74 proteínas) son proteínas abundantes y están reguladas (Tabla A9). Todas las proteínas se encuentran presentes en las tres concentraciones de sacarosa evaluadas (20, 40, 60 g/L) excepto por la cistationina beta-sintasa y la proteína con dominio glicosil hidrolasa (GH26) que están presentes con 40 y 60 g/L de sacarosa. De acuerdo con su ubicación en la célula, 12 proteínas son extracelulares, 39 proteínas son intracelulares y 23 proteínas se encuentran en el grupo denominado "Extra-Intra". Todas las proteínas extracelulares presentan evidencia de secreción (péptido señal) a excepción de una proteína con dominio de cianovirina (CVNH) que se encuentra sobre-regulada y probablemente fue secretada a través de vesículas o por fuga celular (Cohen, Chirico and Lipke, 2020). Cinco de las 39 proteínas intracelulares presentan evidencia de secreción, de las cuales dos proteínas de choque térmico 70 (Hsp70) son secretadas por mecanismos no convencionales. En el interior de la célula, las chaperonas participan en el plegamiento y maduración de las proteínas (Pobre, Poet and Hendershot, 2019). Sin embargo, en el exterior de la célula es bien sabido que las Hsp funcionan como señales de alerta ante condiciones de estrés y se ha propuesto que son secretadas mediante la translocación a través de la membrana plasmática y la liberación asociada con vesículas lipídicas y por vía endolisosomal (De Maio, 2014). De esto podemos inferir que las condiciones de CMS provocan alguna clase de estrés en *A. brasiliensis*, lo cual influye en la sobre regulación de estas Hsp. Por otro lado, 15 proteínas dentro del grupo de proteínas "Extra-Intra" presentan evidencia de secreción: 14 proteínas cuentan con péptido señal mientras que una proteína con dominio aldehído reductasa es secretada por mecanismos no convencionales. Las proteínas abundantes y reguladas (50 proteínas) en el proteoma de *A. brasiliensis* obtenido con alta concentración de sacarosa representan el 3.4% del proteoma total (Tabla A10). Nueve de las 50 proteínas están presentes en solo dos de las tres concentraciones de sacarosa evaluadas (60, 120 y 180 g/L). Según su ubicación en la célula, 7 proteínas son extracelulares, 16 proteínas son intracelulares y 27 proteínas se encuentran en el grupo denominado "Extra-Intra". Todas las proteínas extracelulares presentan evidencia que respalda su secreción al exterior de la célula (péptido señal). La UTP-glucosa-1-fosfato uridil transferasa es la única proteína intracelular asociada a la membrana celular. Por otro lado, 12 proteínas dentro del grupo

de proteínas “Extra-Intra” cuentan con péptido señal y de igual forma que en el proteoma con baja concentración de sacarosa (20 a 60 g/L), una proteína con dominio aldehído reductasa es secretada por mecanismos no convencionales. El 57% de las proteínas abundantes reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa son enzimas (7 extracelulares, 18 intracelulares y 17 “Extra-Intra”), de las cuales, cinco, tres y ocho, respectivamente están involucradas en el metabolismo de carbohidratos (clasificación CAZy). El número de enzimas presente en el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa cambia respecto al obtenido en el proteoma de 20 a 60 g/L de sacarosa (5 extracelulares, 10 intracelulares y 23 “Extra-Intra”). Cuatro, una y cinco, respectivamente están presentes en la clasificación CAZy. Dentro de las enzimas CAZy (Figura 25A), una isoforma de la proteína que contiene el dominio Amb_all (pectina liasa F) está clasificada como polisacárido liasa (PL1_4). Dos isoformas de esta pectina liasa están presentes en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS de forma abundante pero no están reguladas. Esto es un indicador de que hay regulación diferencial entre isoenzimas como previamente se ha observado en isoenzimas antioxidantes de plantas donde condiciones de estrés sobre-regulan o bajo-regulan los niveles de isoformas de catalasa, ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa (Parida, Das and Mohanty, 2004). La subunidad de la ATP-citrato liasa cuya clasificación CAZy es módulo de unión a carbohidratos (CBM27) se encuentra sobre-regulada en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa. En *A. niger* el complejo enzimático completo es encargado de la producción de acetil-CoA y regula el crecimiento, desarrollo y biosíntesis de ácido cítrico (Chen et al. 2014) por lo que probablemente también este implicado de la misma forma en el metabolismo de *A. brasiliensis*. La proteína de fusión vesicular Sec17 es otra de las proteínas CAZy (obtenida con 20 a 60 g/L de sacarosa) de la familia glicosil transferasa (GT41). Esta proteína sobre-regulada está directamente involucrada en el transporte intracelular de proteínas y transporte mediado por vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Brunger, 2001). Aunque parece no estar implicada en el metabolismo de carbohidratos, esta chaperona está dentro de la clasificación CAZy GT 41 por lo cual probablemente participe en la transferencia de N-acetil glucosamina durante glicosilación de las proteínas. Tres enzimas CAZy en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa participan como actividades auxiliares del metabolismo de carbohidratos (dos enzimas de la familia AA3_1 y una enzima de la familia AA3_2). Estas oxidorreductasas ayudan a la actividad de otras enzimas de la familia AA a través de sus productos de reacción o apoyan la acción de las glicosil hidrolasas en la

degradación de la lignocelulosa (Sützl *et al.*, 2018). La exo-inulinasa es la glicosil hidrolasa más abundante (8.7 Sp/mL) en el grupo de enzimas CAZy (Figura 25A y Tabla A9). Esta enzima es sobre-regulada en CMS y en CML es abundante no regulada además de que en CMS es 26 veces más abundante que en CML. La endo-inulinasa (1.5 Sp/mL) está presente en el proteoma de *A. brasiliensis* obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa (Figura 25B y Tabla A10). Esta enzima esta sobre-regulada y es más de 130 veces más abundante que en CML donde también es sobre-regulada. La invertasa (1 Sp/mL) que es otra enzima que participa en la hidrólisis de sacarosa, es bajo-regulada en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa mientras que en CML no se encuentra de forma abundante. Por lo tanto, este resultado da soporte a las afirmaciones de la sección (9.2) donde mencionamos que *A. brasiliensis* produce inulinasa e invertasa con sacarosa como única fuente de carbono e inductora en medio mínimo bajo condiciones de CMS y CML con inulinasa como enzima predominante como lo indica la relación I/S. Por otro lado, la glucosa oxidasa (10.7 Sp/mL) es la enzima CAZy más abundante en el proteoma de *A. brasiliensis* obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa y se encuentra sobre-regulada (Figura 25B). Estos resultados demuestran que en CMS con baja concentración de sacarosa (20 a 60 g/L), *A. brasiliensis* produce principalmente exo-inulinasa para la asimilación de la fuente de carbono mientras que con elevada concentración de sacarosa (60 a 180 g/L) *A. brasiliensis* produce glucosa oxidasa para la oxidación extracelular del sustrato. El resto de glicosil hidrolasas de la clasificación de enzimas CAZy (Figuras 25A y B) son enzimas degradadoras de polisacáridos (celulosa, almidón, xilano) donde destacan varias isoformas de xilanasa (1,4-beta-D-arabinoxilano arabinofurano hidrolasa, beta-xilanasa, endo-1,4-beta-xilanasa). Previamente Salgado-Bautista y col. (2020) demostraron que la endo-1,4-beta-xilanasa A es la enzima más abundante del secretoma de *A. brasiliensis* en CMS mientras que en CML una beta-xilanasa fue sobre-regulada (sin represión catabólica) debido al incremento de la concentración de glucosa por lo cual estas enzimas podrían tener un mecanismo de regulación diferente al conocido mediante CreA. En nuestro trabajo se encontraron isoformas de xilanasas en CML de forma abundante no regulada mientras que en CMS con baja concentración de sacarosa (20 a 60 g/L) todas las isoformas son sobre-reguladas; pero, con alta concentración de sacarosa (60 a 180 g/L) son bajo-reguladas. Por lo tanto, el sistema de cultivo, el tipo y la concentración de la fuente de carbono tiene influencia directa sobre la producción de xilanasas de *A. brasiliensis*.

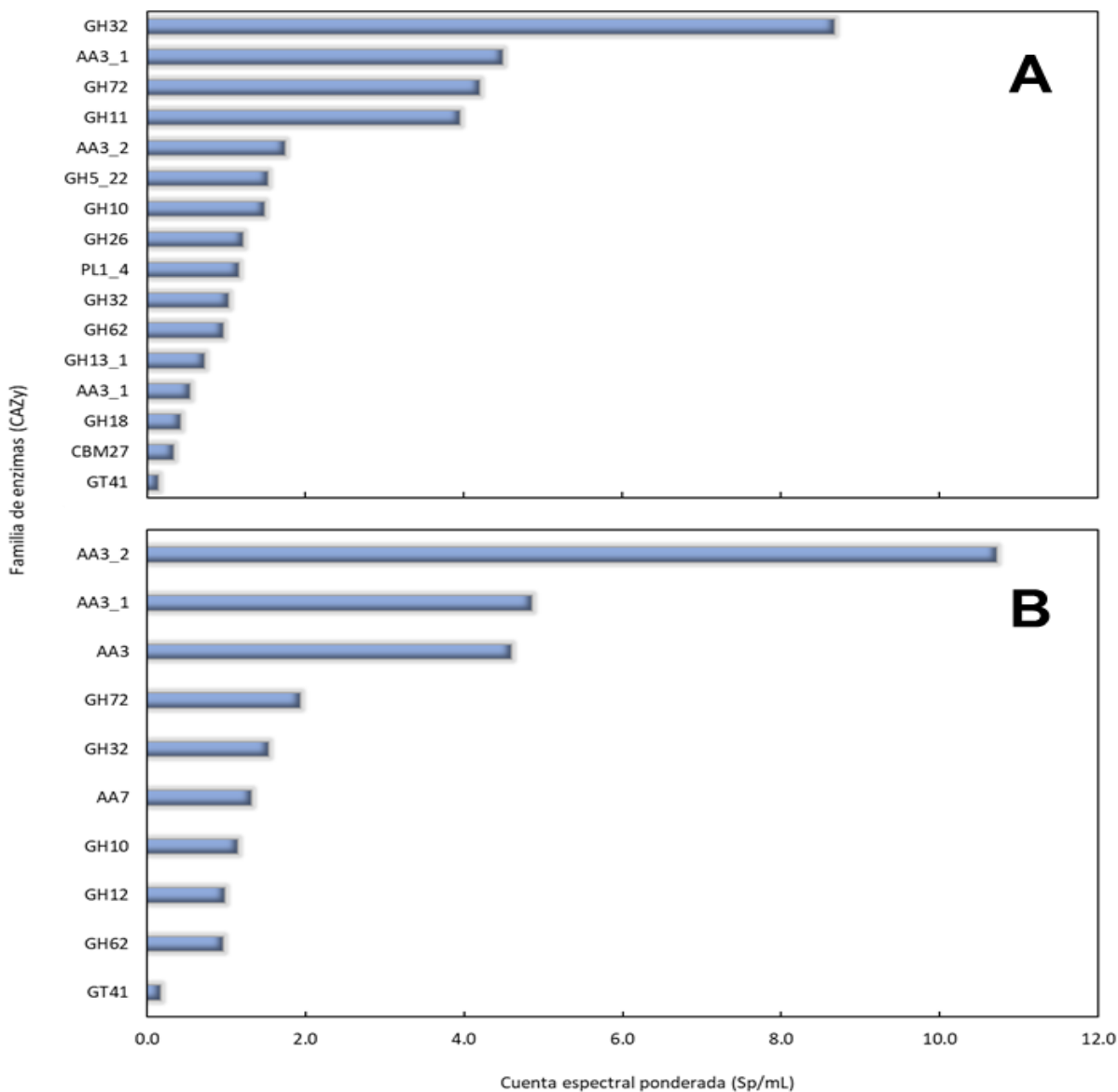


Figura 24. Clasificación CAZy de las enzimas abundantes reguladas del proteoma de *A. brasiliensis* en CMS. A) Proteoma de 20 a 60 g/L de sacarosa, B) Proteoma de 60 a 180 g/L de sacarosa.

De acuerdo con la pendiente resultante de graficar los valores normalizados de la CEP (Tablas A9 y A10), 69 proteínas tienen regulación positiva (sobre-reguladas) y 5 proteínas tienen regulación negativa (bajo-reguladas) en el proteoma obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa mientras que el número de proteínas bajo-reguladas aumenta en el proteoma obtenido con 60 a 180 g/L de sacarosa (27 proteínas son sobre-reguladas y 23 son bajo-reguladas). Según la función principal de las proteínas abundantes (Figura 26A), el metabolismo de carbohidratos es el más abundante en cuanto a número de proteínas (17

y 13 proteínas en el proteoma obtenido con 20 a 60 g/L y 60 a 180 g/L de sacarosa, respectivamente) lo cual es el doble de proteínas sobre-reguladas que en CML. A diferencia de CML donde la endo-inulinasa fue sobre-regulada sin presencia de represión catabólica, en CMS no se encontró presente con concentración de 20 a 60 g/L de sacarosa. No obstante, con 60, 120 y 180 g/L de sacarosa es sobre-regulada la endo-inulinasa demostrando que esta enzima solo se induce en CMS cuando la concentración de sacarosa es mayor a 60 g/L. Mientras que en CML las enzimas reguladas del metabolismo de carbohidratos son enzimas de la glucólisis (Tabla A13), en CMS con concentración de sacarosa de 20 a 60 g/L están sobre-reguladas enzimas de la vía de las pentosas (transcetolasa y ribosa/galactosa isomerasa), del ciclo del ácido cítrico (ATP citrato liasa y la isocitrato deshidrogenasa) y de la glucólisis (enolasa y triosa fosfato isomerasa; y. con concentración de sacarosa de 60 a 180 g/L se bajo-regulan la oxalacetato acetil hidrolasa y la enolasa del ciclo de Krebs y la glucólisis, respectivamente. Que todas las enzimas mencionadas estén reguladas, son un indicador de que las vías están activas y no se ve afectada la regulación global de cada una de las vías ya que no son enzimas de sus puntos de regulación (Nelson *et al.*, 2009).

El segundo grupo de proteínas más numeroso es el de las proteínas que están asociadas a componentes (núcleo, ribosoma, membrana, pared celular) o procesos celulares (transcripción y regulación). Las proteínas de esta categoría obtenidas con baja concentración de sacarosa (20 a 60 g/L) incluyen la proteína de pared celular PhiA, esencial para el desarrollo de conidios (Ferreira de Oliveira *et al.*, 2011), la proteína quinasa activada por mitógenos hog1, la proteína con dominio de factor de transcripción específico de hongos, la tropomiosina, proteína que contiene dominio NAP, la proteína con dominio PH, la histona H4, proteína con dominio de unión a ARN y la 1,3-beta-glucanosiltransferasa que juega un papel importante en la biosíntesis de pared celular fúngica (Bruneau *et al.*, 2001). Todas estas proteínas varían en función, desde conferirle estructura al ADN (cromatina) y regular la expresión génica, hasta participar en el proceso de división celular, transcripción y biosíntesis de pared celular que parece ser un proceso dinámico esencial y relacionado con el crecimiento, ya que la remodelación de la pared celular ocurre continuamente durante la morfogénesis (Latgé *et al.*, 2005). Las proteínas asociadas a componentes o procesos celulares que son obtenidas con 60 a 180 g/L de sacarosa tienen carácter estructural en el ribosoma (proteína que contiene dominio ribosomal S13 y proteína que contiene dominio ribosomal L23eN) y en el citoesqueleto (subunidad 4 de un complejo

proteico relacionado con la actina y la tropomiosina). Algunas proteínas están implicadas en la biosíntesis de pared celular (1,3-beta-glucanosiltransferasa, proteína con dominio de unión a FAD y NAD(P)), señalización (dos isoformas de la proteína 14-3-3, proteína Crd2 de resistencia a cobre) y control del ciclo celular (proteína con dominio de la región TPR). El grupo de proteínas clasificado como misceláneas es el tercer grupo más numeroso obtenido con 20 a 60 g/L de sacarosa. Consta de diez proteínas todas sobre-reguladas que cumplen funciones variadas, de las cuales la proteína con dominio cianovirina destaca por su posible capacidad antiviral (Xiong, Fan and Kitazato, 2010). Aunque se requiere mayor investigación acerca de esta proteína, su biosíntesis por *A. brasiliensis* está ligada al sistema de cultivo (CMS). Con 60 a 180 g/L de sacarosa el tercer grupo de proteínas más numeroso es el redox/estrés. Este grupo cuenta con seis proteínas, todas sobre-reguladas destacando dos isoformas de catalasa que es una enzima no producida con concentración de 20 a 60 g/L.

La categoría proteínas/proteólisis mantiene un número bajo de proteínas abundantes reguladas (con 20 a 60 g/L de sacarosa, 7 proteínas y con 60 a 180 g/L de sacarosa, 3 proteínas). Las 7 proteínas obtenidas con baja concentración de sacarosa son sobre-reguladas. De éstas la mayoría son chaperonas que participan en el plegamiento de proteínas y dos participan en el catabolismo de proteínas (proteína con dominio peptidasa S53 y una proteína con dominio similar a la ubiquitina). Las 3 proteínas obtenidas con alta concentración de sacarosa son peptidasas de las cuales la proteína con dominio peptidasa S53 es bajo-regulada. El resto de los metabolismos contiene un número bajo de proteínas reguladas (menor a 7).

En términos del nivel de abundancia (basada en la CEP) de las proteínas según el metabolismo o proceso (Figura 26B) encontramos que las proteínas del metabolismo redox/estrés son altamente abundantes. Aunque el número de proteínas redox/estrés reguladas en CMS (4 y 6 con 20 a 60 g/L y 60 a 180 g/L de sacarosa, respectivamente) y CML (3) es similar, este grupo de proteínas en CMS es más de 100 veces más abundante que en CML (Figuras 26B y 36B). Por lo tanto, podemos inferir que el sistema antioxidante expresado en *A. brasiliensis* es diferente dependiendo del sistema de cultivo y más eficiente en CMS ya que para la degradación de peróxido de hidrogeno producto de la respiración, en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa se sobre-regula la peroxirredoxina (5.42 Sp/mL) y con 60 a 180 g/L de sacarosa se sobre-regula la peroxirredoxina (1.2 Sp/mL) y adicionalmente dos isoformas de catalasa (1.2 y 1.3 Sp/mL, respectivamente) mientras que en CML se

sobre-regula la catalasa (0.03 Sp/mL). La inducción de sistemas antioxidantes que mantienen el equilibrio redox en respuesta a la mayor disponibilidad de oxígeno, así como al aumento en el nivel de ramificación y el incremento en las especies reactivas de oxígeno en función de la concentración inicial de la fuente de carbono en CMS pueden ser causa de un mejor sistema antioxidante de *A. brasiliensis* en CMS que en CML (Salgado-Bautista *et al.*, 2020). Esto está comprobado en CMS de *A. terreus*, donde se encontró hasta 10 veces menor la concentración de especies reactivas de oxígeno en comparación con CML (Miranda *et al.*, 2013). Por otra parte, las proteínas cuya presencia en el proteoma de *A. brasiliensis* disminuyó por efecto de la concentración de sacarosa (bajo-reguladas) son principalmente asociadas a procesos y componentes celulares (proteína quinasa activada por mitógenos hog1, proteína de la familia del dominio del factor de transcripción específico de hongos y proteína que contiene el dominio ATPasa similar a la actina). Las dos primeras proteínas están involucradas en la transducción de señales en la cascada de señalización de las MAP quinasas. Su bajo-regulación en el proteoma de *A. brasiliensis* sugiere que el incremento en la concentración de sacarosa incide en toda la cascada de señalización regulando de este modo el desarrollo celular de *A. brasiliensis* (Lengeler *et al.*, 2000).

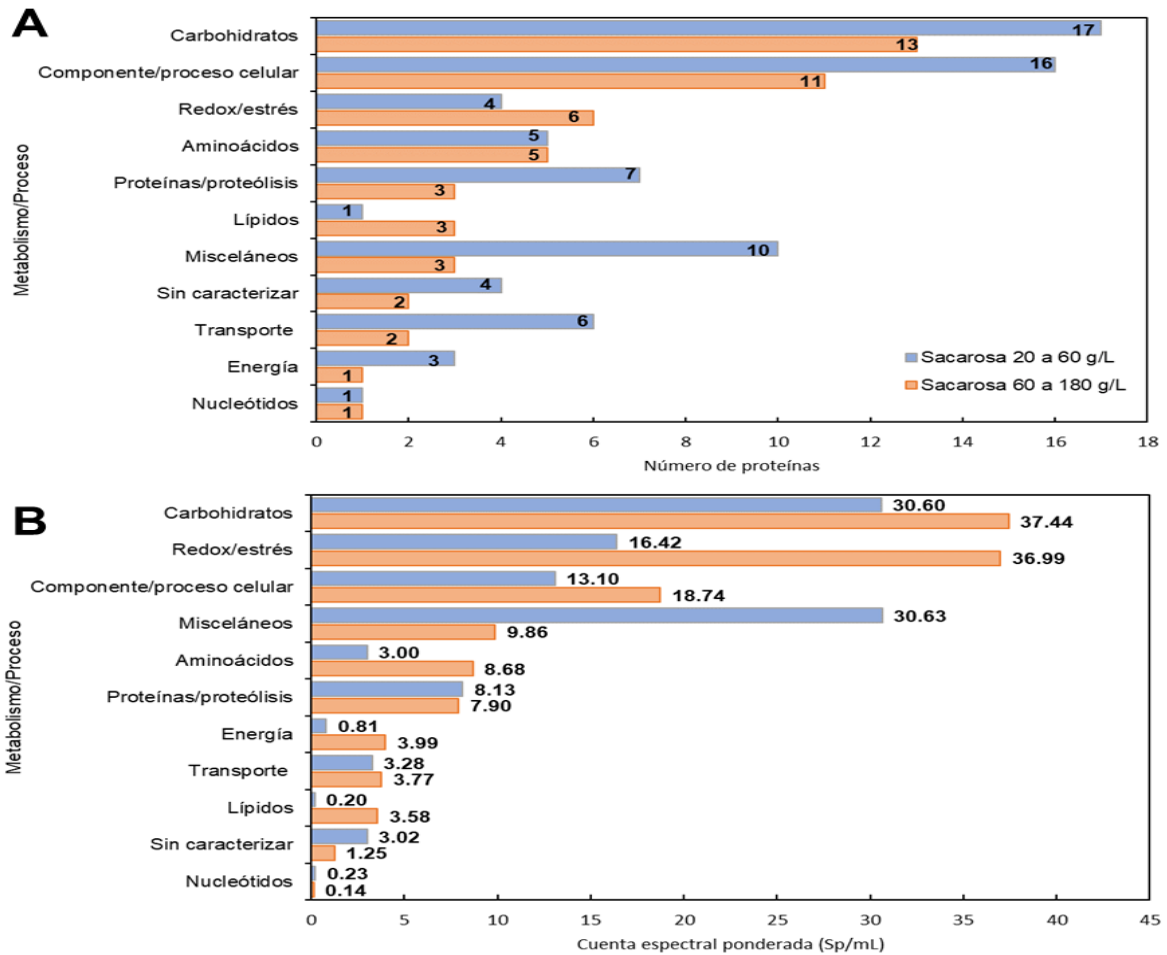


Figura 25. Clasificación de las proteínas abundantes reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS. A) número de proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan, B) cuenta espectral ponderada de las proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan.

9.6. Descripción del proteoma de *A. brasiliensis* en CML

En total 953 proteínas fueron identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML, de las cuales, 186 proteínas son extracelulares, mientras que 727 proteínas son encontradas de forma intracelular. El 21% de las proteínas extracelulares no presenta evidencia de secreción por mecanismos convencionales o no convencionales. Basándonos en el hecho de que no cuentan con secuencia de péptido señal, no necesariamente son proteínas que se liberan por daño en la membrana, lo cual conduce a fuga celular, si no que podrían tener funciones extracelulares como señalización, modulación a respuesta inmune o funciones “moonlighting” diferentes de su función intracelular (Cohen, Chirico and Lipke, 2020). Se observó que el incremento en la concentración de sacarosa favorece la secreción de un

mayor número de proteínas extracelulares únicas en cada concentración de sacarosa estudiada. Con 60 g/L de sacarosa, 39 proteínas fueron secretadas lo cual es 2.8 veces más proteínas respecto a 20 g/L de sacarosa (Figura 27A). La distribución de proteínas intracelulares no se encuentra en función de la concentración de sacarosa, ya que 178 proteínas intracelulares únicas de 20 g/L de sacarosa son obtenidas, mientras que con 40 y 60 g/L de sacarosa se producen 47 y 73 proteínas únicas, respectivamente (Figura 27B). Se ha observado que el secretoma de *A. niger* es muy sensible a cambios en la fuente de carbono pero no el proteoma intracelular, el cual es principalmente afectado por cambios en las condiciones de cultivo tales como pH o aireación (Lu *et al.*, 2010). El incremento en la concentración de glucosa tiene efecto directo en variables asociadas con el crecimiento de *A. brasiliensis* y la complejidad del secretoma, además de que el incremento en la secreción de proteínas está asociado con la morfología del hongo y cambios en el nivel de ramificación (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

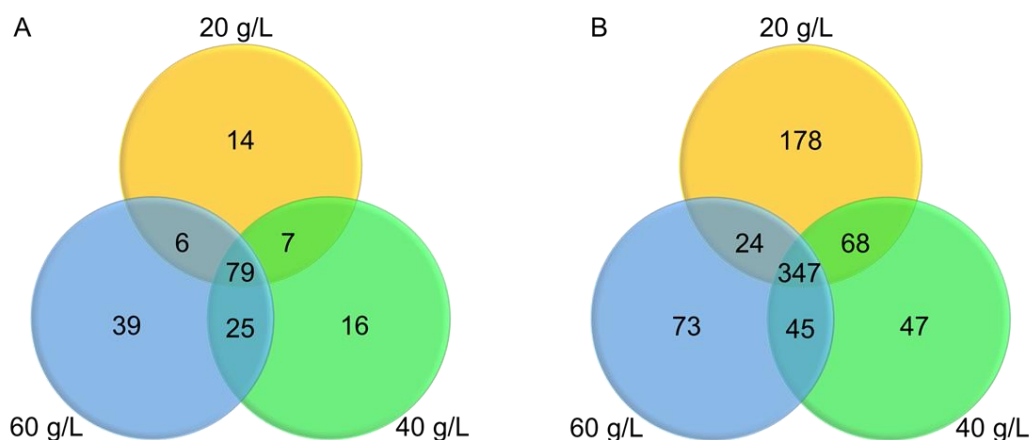


Figura 26. Distribución de proteínas del proteoma de *A. brasiliensis* en CML en función de la concentración de sacarosa. A) proteínas extracelulares, B) proteínas intracelulares.

Un tercer grupo de proteínas fue denominado proteínas “Extra-Intra”, ya que se trata de proteínas que se encontraron extracelular e intracelularmente. A este grupo pertenecen 40 proteínas de las 953 proteínas totales, cuya distribución en función de la concentración de sacarosa fue diferente según su localización dentro o fuera de la célula (Figura 28 A y B). De las 40 proteínas, 23 son enzimas de las cuales 18 cuentan con péptido señal, lo cual respalda su presencia extracelular.

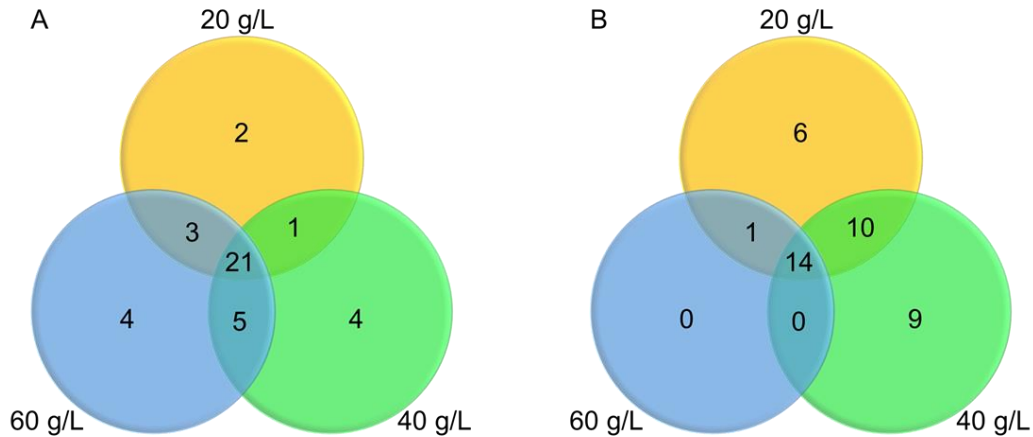


Figura 27. Distribución de proteínas “Extra-Intra” del proteoma de *A. brasiliensis* en CML en función de la concentración de sacarosa. A) distribución extracelular, B) distribución intracelular.

El proteoma completo de *A. brasiliensis* en CML fue clasificado de acuerdo con la función y proceso biológico en el que participan las proteínas que fueron establecidos mediante la información obtenida en bases de datos (Figura 29). El 60% del proteoma esta agrupado en tres categorías principales: componente/proceso celular (262), misceláneas (203) y carbohidratos (109). Mientras que el 40 % del proteoma restante está distribuido en proteínas/proteólisis (83), sin caracterizar (80, de las cuales 12 son proteínas que fueron renombradas al tener ortólogos en otros microorganismos, pero no hay información funcional de estas), redox/estrés (63), transporte y transporte mediado por vesículas (60), energía (46), aminoácidos (27), lípidos (13) y nucleótidos (7).

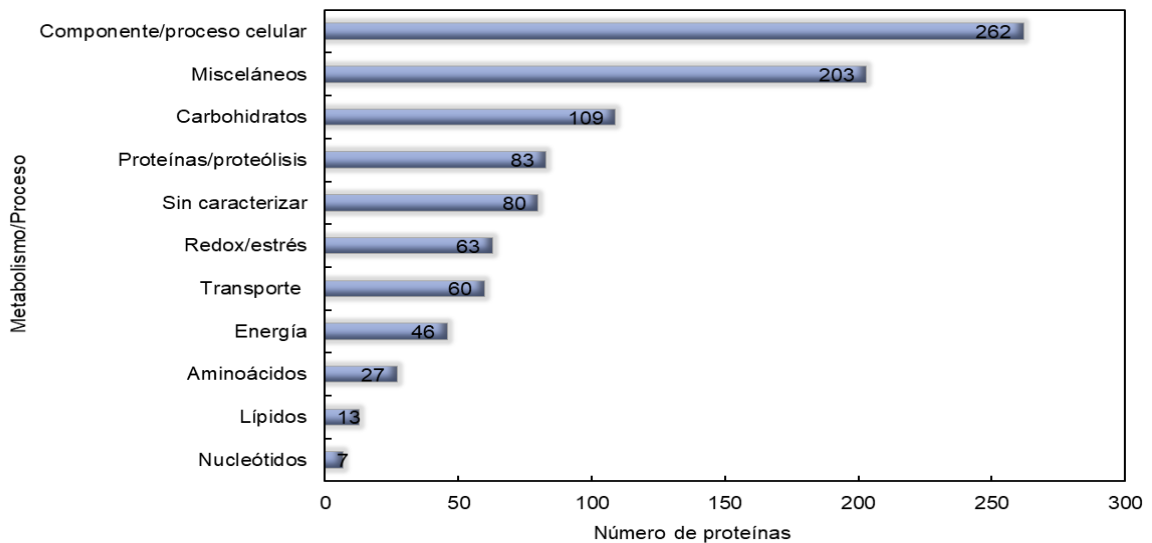


Figura 28. Clasificación del proteoma de *A. brasiliensis* en CML en función del metabolismo o proceso biológico en que participan las proteínas.

Basados en la CEP, las 10 proteínas más abundantes representan el 29 % de toda la CEP del proteoma de *A. brasiliensis* obtenido en CML (Figura 30). Todas son proteínas intracelulares, excepto por la superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD) (2.37 Sp/mL) que fue localizada tanto extracelular como intracelular. De forma extracelular, fue encontrada como proteína única de la concentración de 60 g/L de sacarosa mientras que, de forma intracelular fue encontrada en todas las concentraciones de sacarosa evaluadas., sin embargo, no fue sujeta a regulación. La Cu/Zn SOD es la única proteína (enzima) con función oxidorreductasa dentro del grupo de las 10 proteínas más abundantes. Participa en la reducción de radicales superóxido que son tóxicos para las células dando lugar a la generación de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y aunque la SOD no está asociada a la detoxificación de H₂O₂, se ha encontrado que la actividad de la SOD de *A. niger* incrementa debido a la presencia de H₂O₂ (Li, McNeil and Harvey, 2008). Además, la Cu/Zn SOD junto con el citocromo c oxidasa y enzimas glucolíticas son consideradas proteínas con función moonlighting que comúnmente son expresadas en niveles relativamente altos (Huberts and Klei, 2010; Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

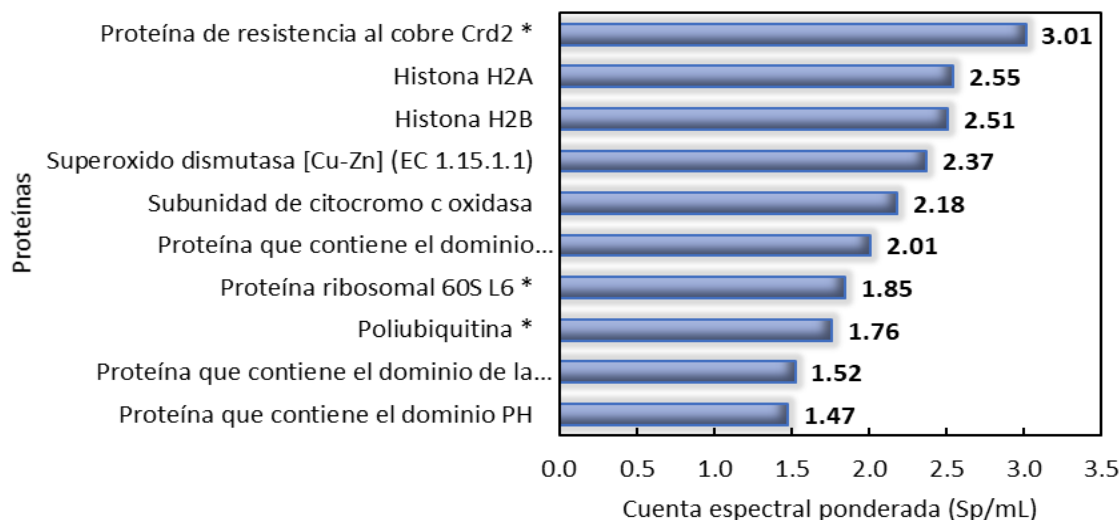


Figura 29. Top 10 proteínas más abundantes del proteoma de *A. brasiliensis* en CML en función de su CEP.

Dos proteínas encontradas dentro del top 10 proteínas más abundantes del proteoma están asociadas al metabolismo energético (la subunidad del citocromo c oxidasa y la proteína que contiene el dominio de la cadena E de la ATP sintasa. La subunidad del citocromo c oxidasa (2.18 Sp/mL) es la única proteína que fue abundante y con regulación positiva, lo

cual significa que incrementa su concentración con el incremento en la concentración de sacarosa en el medio. Esta proteína junto con 12 subunidades más conforman el complejo citocromo c oxidasa ubicado en la cadena respiratoria de la mitocondria, que en su forma activa es el encargado de catalizar la transferencia de electrones a partir del citocromo c reducido hacia el oxígeno molecular (Shoubridge, 2001). La proteína que contiene el dominio de la cadena E de la ATP sintasa (1.52 Sp/mL) es parte del dominio estructural FO de la ATP sintasa, que contiene el canal de protones de la membrana. El complejo de la ATP sintasa sintetiza ATP al usar el potencial electroquímico a través de la membrana interna generado por los complejos de la cadena respiratoria (Wittig and Schägger, 2008). No se conoce el rol fisiológico de su forma dimérica o monomérica., sin embargo, está asociado con la morfología de la mitocondria ya que en condiciones de desestabilización del complejo de la ATP sintasa hay pérdida de formación de crestas mitocondriales (Paumard *et al.*, 2002). Por lo cual, podría funcionar como un mecanismo regulador del metabolismo energético de las células (Wittig and Schägger, 2008). Cinco de las proteínas más abundantes del proteoma están asociadas a procesos y componentes celulares: las histonas H2A (2.55 Sp/mL) y H2B (2.51 Sp/mL) están involucradas en la formación de nucleosomas y estructura de la cromatina (Stefanelli *et al.*, 2018). La proteína ribosomal 60S L6 (1.85 Sp/mL) cuyo homólogo en bacterias se encuentra altamente conservado evolutivamente y participa en el ensamblaje del ribosoma (Gulati *et al.*, 2014). La proteína que contiene el dominio PH (1.47 Sp/mL) está involucrada en la transducción de señales (Suelmann, Sievers and Fischer, 1997). La proteína de resistencia a cobre Crd2 es la más abundante del proteoma de *A. brasiliensis* en CML (3.01 Sp/mL). Aunque la homeostasis del cobre es un proceso poco estudiado en hongos filamentosos, se sabe que esta proteína es una metalotioneína que tiene alta afinidad por el cobre (Cu) y otros metales como el Zinc (Zn) o mercurio (Hg) (Antsotegi-Uskola, Markina-Iñarrairaegui and Ugalde, 2017). En presencia de niveles elevados de Cu⁺ en el interior de la célula, se activan los genes de diferentes metalotioneínas que se unen al Cu⁺ o remueven el exceso de éste (Raffa, Osharov and Keller, 2019). Otra de las diez proteínas más abundantes en el proteoma de *A. brasiliensis* es la poliubiquitina (1.76 Sp/mL). Ésta sirve como señal de reconocimiento para el proteasoma, el principal regulador de la abundancia de proteínas en las células (Zhang and Li, 2018). La elevada concentración de la poliubiquitina en el proteoma de *A. brasiliensis* puede ser un indicador de elevada actividad proteolítica en el proteasoma, que a su vez puede estar asociado a la homeostasis general de las proteínas, la respuesta al estrés, el control del ciclo celular, replicación de ADN, transcripción y la transducción de

señales (Bard *et al.*, 2018). La décima proteína en el grupo de proteínas más abundantes del proteoma es la proteína que contiene el dominio HABP4_PAI-RBP1 (2.01 Sp/mL). El dominio HABP4_PAI-RBP1 es un dominio de unión a hialuronano (glucosaminoglicano) y a ARN. En mamíferos, el hialuronano tiene rol en cambios estructurales en el citoesqueleto y la matriz nuclear durante la división celular (Huang *et al.*, 2000). Basándonos en que la fosfoproteína Ki-1/57 contiene el dominio HABP4 y está asociada al remodelado de la cromatina y regulación de la transcripción (Nery *et al.*, 2004, 2006), podemos sugerir que la probable función de la proteína de *A. brasiliensis* que contiene el dominio HABP4_PAI-RBP1 es similar a la de Ki-1/57 y también podría participar en la estabilidad del ARNm. Para tener una mejor comprensión biológica y bioquímica del proteoma de *A. brasiliensis* en CML, cada grupo de proteínas (extracelulares, intracelulares y “Extra-Intra” fue analizado en tres niveles:

1. Proteínas únicas, abundantes no reguladas y abundantes reguladas (de acuerdo con su presencia en una o más concentraciones de sacarosa y el valor de su cuenta espectral ponderada (CEP).
2. Enzimas, no enzimas y proteínas sin caracterizar.
3. Función principal o proceso en el que están involucradas: proteínas no caracterizadas, componente/proceso celular, misceláneas, metabolismo de carbohidratos, proteínas/proteólisis, transporte y transporte mediado por vesículas, redox/estrés, energía, aminoácidos, lípidos y nucleótidos.

9.6.1. Proteínas únicas

Ciento veintiocho proteínas del proteoma de *A. brasiliensis* en CML se encuentran presentes en sólo una de las tres concentraciones de sacarosa evaluadas (Tabla A11). La distribución de éstas en función de la concentración de sacarosa es dependiente de su ubicación en la célula (Figura 31). De las 128 proteínas únicas, 27 son extracelulares (11 pertenecen a 40 g/L, mientras que 16 proteínas son únicas de 60 g/L de sacarosa) y, 85 son proteínas intracelulares de las cuales, la mayoría se encontraron con 20 g/L de sacarosa (60 proteínas). En el grupo de proteínas denominado “Extra-Intra” se encontraron 16 proteínas únicas de las cuales 8 se encuentran en 40 g/L y 4 en 20 y 60 g/L, respectivamente.

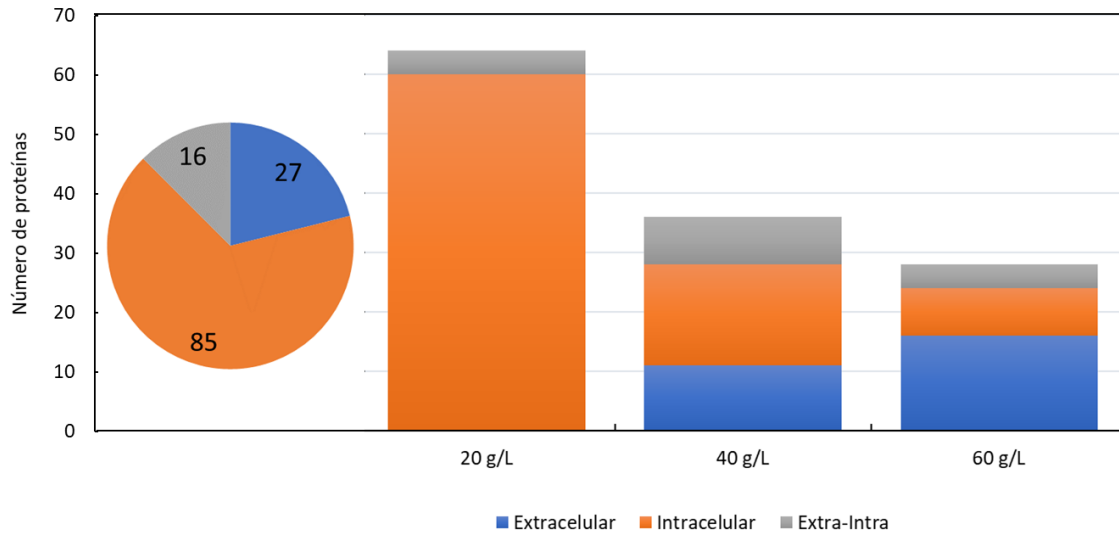


Figura 30. Distribución de proteínas únicas del proteoma de *A. brasiliensis* en CML en función de la concentración de sacarosa y ubicación en la célula.

La mayoría de las proteínas únicas extracelulares presentan evidencia que respalda su secreción al exterior de la célula. Quince proteínas tienen secuencia péptido señal, 2 proteínas son secretadas por mecanismos no convencionales (glutación reductasa y glucosamina 6-fosfato N-acetil transferasa) y una proteína más está asociada a la membrana (subunidad Duo1 del complejo DASH). De forma contraria, solo tres proteínas únicas intracelulares presentan péptido señal, cuatro están asociadas a la membrana y una proteína de choque térmico puede ser secretada mediante mecanismos no convencionales. La mitad de las proteínas únicas del grupo “Extra-Intra” también cuentan con péptido señal. Las proteínas secretadas por mecanismos no convencionales, generalmente son citosólicas (enzimas del metabolismo y chaperonas) y pueden cumplir funciones moonlighting fuera de la célula (Reindl *et al.*, 2019). Muchas de estas proteínas cumplen funciones celulares importantes asociadas a supervivencia, desarrollo, señalización, o virulencia y en la mayoría de los casos, la secreción no convencional de éstas es desencadenada por estrés (Dimou and Nickel, 2018). El estrés puede causar deterioro en la integridad funcional de la vía de secreción clásica; por lo tanto, se incrementa la necesidad de vías alternativas de secreción. Las proteínas secretadas por vías no convencionales se dividen en dos categorías: las que carecen de péptido señal (tienen algún otro mecanismo de señalización) que son secretadas a través de poros en la membrana plasmática, a través de un transportador denominado “ABC” (transporta péptidos acetilados y proteínas de apareamiento en levaduras) y por el sistema auto

fagosoma/endosoma. La segunda categoría comprende proteínas con péptido señal y/o dominios transmembrana que pasan por el retículo endoplásmico, pero evitan el aparato de Golgi para ser secretadas (Rabouille, 2017). Diferentes proteínas han sido reportadas extracelulares aún sin tener evidencia de péptido señal. Por ejemplo, la proteasa aspártica (PepN) de *Aspergillus niger* es secretada por mecanismos no convencionales cuando existe limitación por fuente de carbono (Wang *et al.*, 2008). Aunque los mecanismos de secreción de PepN son desconocidos, se descarta la secreción no convencional mediada por autofagosomas como en el caso de la proteína de unión a acil-CoA (*acb1*) en levaduras (Burggraaf, Punt and Ram, 2016).

La glutatión reductasa es responsable de mantener el suministro de glutatión reducido. En su estado reducido, el glutatión es clave para mantener el control de las especies reactivas de oxígeno dentro de la célula (Couto, Wood and Barber, 2016). Esta enzima tiende a acumularse en regiones donde hay alto flujo de electrones (donde las especies reactivas son generadas). En bacterias, es común encontrar glutatión reductasa en el espacio periplásmico asociada a la membrana interna y también de forma extracelular (Couto *et al.*, 2015). En hongos es común encontrarla en el citoplasma y en organelos como la mitocondria (Couto *et al.*, 2013), y retículo endoplásmico (Chakravarthi, Jessop and Bulleid, 2006). Sin embargo, se ha encontrado secretada por diferentes hongos del género *Aspergillus*: *A. niger* (Lu *et al.*, 2010), *A. brasiliensis* (Salgado-Bautista *et al.*, 2020), *A. terreus* (Adav, Ravindran and Sze, 2013), etc., y aunque se desconoce su función en el exterior de la célula, al acumularse en el retículo endoplásmico de *A. brasiliensis*, su secreción pudo haber sido inducida por estrés en este organelo. También, se ha reportado que su presencia puede estar asociada a lisis celular (Lu *et al.*, 2010) y asociada a otras oxidorreductasas extracelulares (peroxidasas y celobiosa deshidrogenasa) durante la hidrólisis de lignina por *A. terreus* en cultivos sólidos con aserrín como sustrato (Adav, Ravindran and Sze, 2013). La glucosamina 6-fosfato N-acetil transferasa cataliza la síntesis de N-acetilglucosamina-6-fosfato, molécula intermediaria en la vía de la Uridina difosfato N-acetil glucosamina cuyo producto final es usado para la síntesis de quitina (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2008). Al ser una enzima clave para mantener la estructura de la pared celular (Látgé *et al.*, 2005), pudo ser secretada por *A. brasiliensis* debido a la constante síntesis y remodelado de la pared celular durante el crecimiento del hongo (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

A pesar de que esperamos que todas las proteínas extracelulares deben tener una secuencia péptido señal o que son secretadas por mecanismos no convencionales, es

común encontrar en el secretoma proteínas que típicamente son intracelulares cuya explicación está dada por probable ruptura celular (Li, Peng and Chen, 2013). En el presente trabajo se minimizó la posibilidad de obtener proteínas típicamente intracelulares en el secretoma siguiendo la metodología descrita por Salgado et al. (2020) que consistió en tomar las muestras en un estado fisiológico de no envejecimiento celular y siendo cuidadosos durante el procesamiento de las muestras. Sin embargo, en la clasificación de proteínas únicas es donde se encuentran proteínas secretadas que típicamente son intracelulares (16 proteínas). De forma interesante, la concentración de sacarosa tiene influencia directa en el número de proteínas secretadas que comúnmente son intracelulares (1 proteína de 20 g/L, 3 proteínas de 40 g/L y 12 proteínas de 60 g/L). La transaldolasa (enzima única de 20 g/L de sacarosa) participa en la fase no oxidativa de la vía de las pentosas (Samland *et al.*, 2012). La malato deshidrogenasa (enzima única de 40 g/L de sacarosa) cataliza la Inter conversión de malato y oxalacetato utilizando las coenzimas NAD/NADH. En células eucariotas existen al menos dos isoformas de esta enzima, una que participa de forma directa en el ciclo de Krebs y otra citosólica que funciona como lanzadera de malato y oxalacetato a través de la membrana mitocondrial (Minárik *et al.*, 2002). Mientras que con 20 y 40 g/L de sacarosa se secretan proteínas típicamente intracelulares asociadas al metabolismo central de carbohidratos, con 60 g/L de sacarosa las proteínas secretadas que comúnmente son intracelulares son principalmente antioxidantes (tioredoxina, proteína de unión a FAD/NAD, tioredoxina reductasa, Cu/Zn SOD y peroxirredoxina). De este modo, podemos interpretar que con concentración baja de fuente de carbono (20 g/L) el metabolismo se dirige hacia la generación de intermediarios para la síntesis de ADN a través de la vía de las pentosas (6-fosfogluconato deshidrogenasa al igual que la transaldolasa es producida con 20 g/L de sacarosa; solo que la primera se encontró de forma intracelular). Cuando la concentración de sacarosa se duplica (40 g/L), el metabolismo se dirige hacia la generación de energía y producción de intermediarios para la síntesis de aminoácidos. Cuando la concentración es de 60 g/L de sacarosa, el metabolismo es dirigido hacia la protección celular del estrés oxidativo. No debemos descartar la posibilidad de que todas estas proteínas carentes de péptido señal y que no fueron secretadas por mecanismos no convencionales pudieron haber sido transportadas al exterior de la célula mediante vesículas o exosomas (Kowal, Tkach and Théry, 2014) y una vez fuera de la célula pueden también tener funciones moonlighting involucradas en la adhesión a células huésped durante la patogenicidad o como receptores de proteínas en la superficie celular (Amblee and Jeffery, 2015).

Por otro lado, el 35% de las proteínas únicas son enzimas (15 extracelulares, 19 intracelulares y 11 “Extra-Intra”). De las cuales, nueve, cuatro y seis, respectivamente están involucradas en el metabolismo de carbohidratos (clasificación CAZy). Dentro de las enzimas CAZy, ocho con función oxidoreductasa están clasificadas como actividades auxiliares (AA) del metabolismo de carbohidratos y siete glicosil hidrolasas (GH) de las cuales, una invertasa (GH32) y la malato deshidrogenasa (GH4) están directamente asociadas al metabolismo de la sacarosa (Figura 32). La glucosa oxidasa es la enzima con mayor concentración en el grupo de enzimas CAZy (0.28 Sp/mL). Se encontró en el proteoma de *A. brasiliensis* en el grupo “Extra-Intra”. Sin embargo, es una enzima que cuenta con péptido señal y el gen que codifica para esta enzima es homólogo a uno de los tres genes de *A. niger* que codifican para glucosa oxidasa extracelular (Pel *et al.*, 2007). La glucosa oxidasa participa en la oxidación extracelular de la glucosa, específicamente cuando la concentración de la fuente de carbono (maltosa) es superior a 20 g/L (Lu *et al.*, 2010). Como productos de la oxidación extracelular de la glucosa se obtienen ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Wohlfahrt *et al.*, 2004). El ácido glucónico posteriormente es incorporado y metabolizado en la vía de las pentosas (Lu *et al.*, 2010; Stincone *et al.*, 2015), mientras que la remoción del peróxido de hidrógeno es mediada por la catalasa y peroxidasas (Li, McNeil and Harvey, 2008), lo cual respalda la presencia de catalasa y peroxirredoxina en el proteoma de *A. brasiliensis*. La malato deshidrogenasa (0.04 Sp/mL) y la invertasa (0.01 Sp/mL) están 7 y 28 veces menos concentradas que la glucosa oxidasa, respectivamente (Figura 32). En este contexto, se puede interpretar nuevamente que la vía de las pentosas esta activa ya que la invertasa es la primera enzima que participa en el metabolismo de la sacarosa, hidroliza el enlace fructosa-glucosa de la sacarosa (Nadeem *et al.*, 2015) y una vez que se encuentra disponible la glucosa en el medio, esta es oxidada a ácido glucónico.

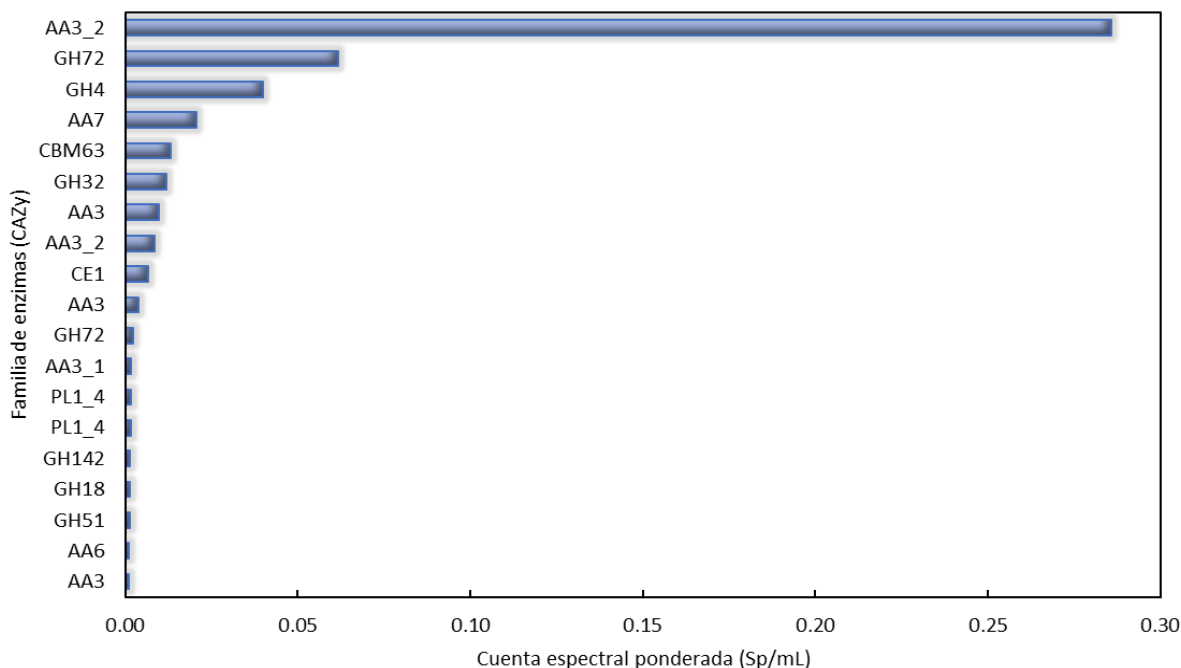


Figura 31. Clasificación CAZy de las enzimas únicas del proteoma de *A. brasiliensis* en CML.

Según la función principal de las proteínas únicas (Figura 33A), el 34% (44 proteínas) está asociado a componentes (núcleo, ribosoma, membrana, pared celular) o procesos celulares (transcripción y regulación). El 14% (18 proteínas) tienen función asociada a procesos redox y respuesta a estrés. Entre las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos (14 proteínas, 11%), la invertasa está directamente asociada al metabolismo de la sacarosa y algunas enzimas participan en las vías metabólicas centrales: la isocitrato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa (ciclo de Krebs) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la transaldolasa (vía de las pentosas fosfato). El 7% (9 proteínas) están asociadas al transporte, el 9% (11 proteínas de las cuales tres son dominios con función desconocida (DUF) son proteínas no caracterizadas, el 7% (9 proteínas) son proteínas de los complejos de la cadena respiratoria, asociadas al metabolismo energético, el 9% (11 proteínas) fueron clasificadas como misceláneas por tener funciones diversas, asociadas a metabolismos como el de antibióticos (proteína que contiene el dominio ABM), vitaminas (biotina sintasa) e hidrocarburos (enzima lactonizante 3-carboxi-cis, cis-muconato). Un número bajo de proteínas (12) correspondiente al 9% del total de proteínas únicas está asociado a diferentes metabolismos como el de aminoácidos, proteínas/proteólisis, lípidos y nucleótidos. La distribución de proteínas únicas en términos de su abundancia según el metabolismo o proceso es diferente que si solo nos basamos en el número de proteínas (Figura 33B). A pesar de que componente/proceso celular comprende el mayor número de

proteínas (Figura 33A), éstas no son realmente abundantes. Basándonos en la abundancia, el grupo de proteínas únicas más abundante es el asociado al metabolismo redox/estrés seguido de las proteínas del metabolismo energético. Con 60 g/L de sacarosa hay mayor abundancia de proteínas únicas del metabolismo redox/estrés, lo cual sugiere que bajo estas condiciones hay elevada concentración de especies reactivas de oxígeno y está asociado con la elevada concentración de la fuente de carbono (Salgado-Bautista *et al.*, 2020).

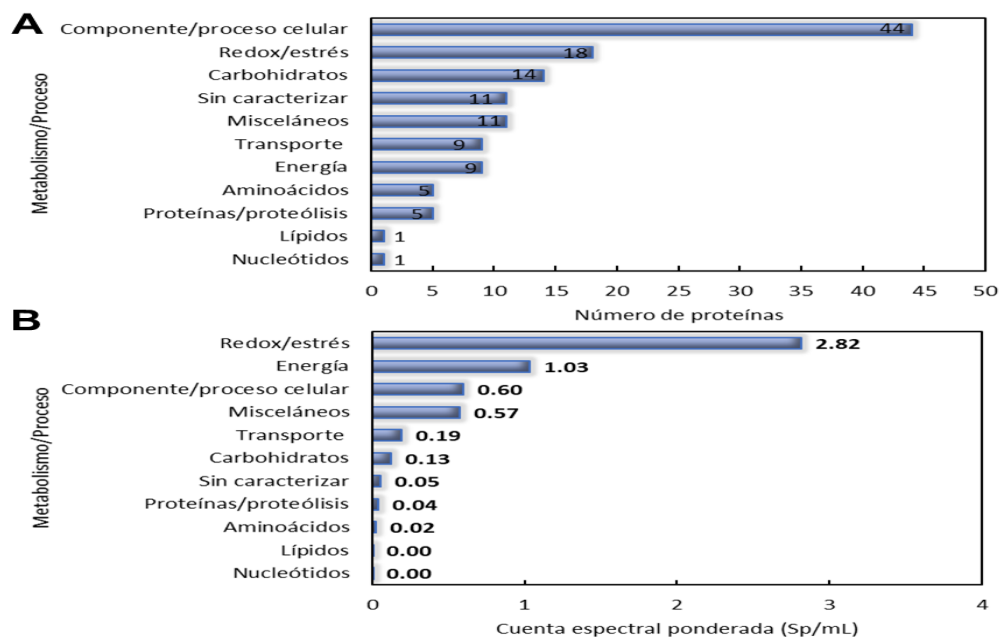


Figura 32. Clasificación de las proteínas únicas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML. A) número de proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan, B) cuenta espectral ponderada de las proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan.

La alta concentración de sacarosa (60 g/L) permite mayor secreción y diversidad de proteínas únicas extracelulares (Tabla A11). Mientras que, con la concentración más baja de sacarosa evaluada (20 g/L) se obtiene la mayor cantidad y diversidad de proteínas únicas intracelulares (60 proteínas) principalmente asociadas a procesos y componentes celulares. Lo cual sugiere que con concentración baja de sustrato es muy activo el crecimiento y duplicación celular de *A. brasiliensis*. Pero, con concentración alta de sustrato, se activan otros metabolismos principalmente asociados a la respuesta a estrés y procesos redox.

9.6.2. Proteínas abundantes no reguladas

El 7.7% del proteoma de *A. brasiliensis* en CML (73 proteínas) son proteínas abundantes no reguladas (Tabla A12). Todas las proteínas están presentes en las 3 concentraciones de sacarosa evaluadas (20, 40, 60 g/L). Según su ubicación en la célula, 14 proteínas son extracelulares, 54 proteínas son intracelulares y 5 proteínas se encuentran en el grupo denominado “Extra-Intra”. Todas las proteínas extracelulares presentan evidencia que respalda su secreción al exterior de la célula: 13 tienen secuencia péptido señal (una glicosil hidrolasa está anclada a la membrana celular) y solo una proteína es secretada por mecanismos no convencionales. Por el contrario, ninguna de las 54 proteínas intracelulares cuenta con evidencias de secreción. La Cu/Zn SOD es la única de las proteínas del grupo “Extra-Intra” que no cuenta con evidencias de secreción. En mamíferos la Cu/Zn SOD es extracelular y previene del daño por especies reactivas de oxígeno a las células y tejidos (Fattman, Schaefer and Oury, 2003). Dada su importancia biológica, se ha estudiado el rol de las SODs en *A. fumigatus* y se cree que podrían ser factores de virulencia putativos de éste patógeno (Lambou *et al.*, 2010). Por lo tanto, La Cu/Zn SOD extracelular de *A. brasiliensis* podría tener función moonlighting y estar asociada a la patogenicidad aparte de detoxificar a las células de los aniones superóxido.

El 26% de las proteínas abundantes no reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML son enzimas, (11 extracelulares, 4 intracelulares y 4 “Extra-Intra”). De las cuales, nueve, una y una, respectivamente están involucradas en el metabolismo de carbohidratos (clasificación CAZy). Dentro de las enzimas CAZy (Figura 34), una oxidoreductasa GMC (ortólogo de glucosa oxidasa en otras especies de *Aspergillus*) está clasificada como actividad auxiliar (AA3_2) del metabolismo de carbohidratos. Las 10 enzimas restantes son glicosil hidrolasas de las cuales, la exo-inulinasa (GH32) es la tercera enzima más abundante de este grupo y está directamente asociada al metabolismo de la sacarosa. La exo-inulinasa al ser una enzima abundante pero no regulada en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML, da soporte a las afirmaciones de los resultados de actividad enzimática (sección 9.2) donde mencionamos que no hay efecto negativo en la actividad inulinasa debido al incremento en la concentración de sacarosa y, por lo tanto, no hay represión catabólica de la inulinasa en CML bajo las condiciones estudiadas. El resto de las enzimas CAZy participan en el metabolismo de carbohidratos complejos (almidón, xilano y glucosaminoglicano). La glucoamilasa (GH15) se encontró tanto extracelular como intracelular. La glucoamilasa es la enzima más eficientemente secretada por *A. niger* y el gen que codifica para su síntesis (*glaA*) es inducido principalmente por almidón y sus

productos de hidrólisis (entre ellos la glucosa) (Ganzlin and Rinas, 2008). Basados en lo anterior, es probable que en el proteoma de *A. brasiliensis*, la glucoamilasa fuera inducida por glucosa. Del mismo modo, está comprobado que diferentes carbohidratos cuya estructura se basa en unidades de glucosa (celulosa, celobiosa y maltosa) y la fructosa son efectivos inductores de xilanasas y glucanasas (Kumar and Naraian, 2019). Por lo tanto, esto ayuda a explicar la presencia abundante pero no regulada de las xilanasas (GH11 y GH10), la 1,4-beta-D-arabinosilano arabinofuranohidrolasa (GH62) y endoglucanasa (GH12).

Como ya mencionamos, la enzima que contiene el dominio HABP4_PAI-RBP1, miembro de las glicosil hidrolasas familia 13 (GH13_25) es una de las 10 proteínas más abundantes en todo el proteoma. Es una proteína intracelular que está presente en las tres concentraciones de sacarosa evaluadas (20, 40 y 60 g/L). Por lo tanto, su participación durante la división celular, transcripción y estabilidad de ARNm es requerida en los cultivos de *A. brasiliensis* independientemente de la concentración de sacarosa en el medio.

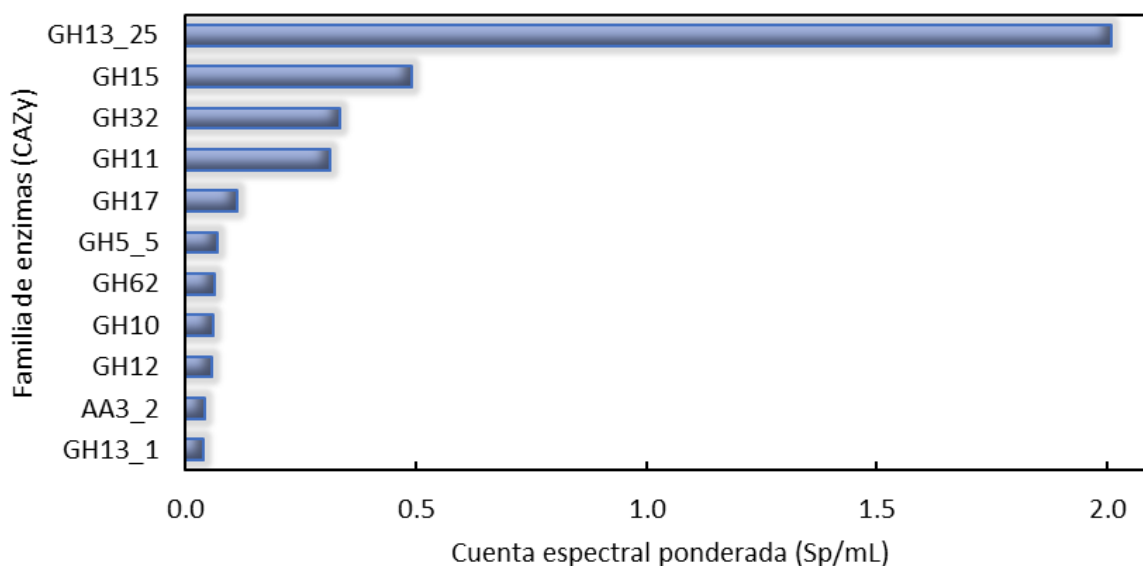


Figura 33. Clasificación CAZy de las enzimas abundantes no reguladas del proteoma de *A. brasiliensis* en CML.

Según la función principal de las proteínas abundantes no reguladas (Figura 35A), las proteínas extracelulares abundantes no reguladas son principalmente del metabolismo de carbohidratos, mientras que las intracelulares son asociadas principalmente a procesos y componentes celulares. El 36% (26 proteínas) está asociado a componentes (núcleo, ribosoma, membrana, pared celular) o procesos celulares (transcripción y regulación). El 18% (13 proteínas), el 16% (12 proteínas) y el 15% (11 proteínas) son proteínas con

funciones misceláneas, del metabolismo energético y de carbohidratos, respectivamente. Las proteínas clasificadas como misceláneas tienen funciones diversas, asociadas a patogenicidad (Proteína de respuesta a antibióticos similar a CipC) y el metabolismo de ácidos grasos (Acil-CoA tioesterasa II). Todas las proteínas que participan en el metabolismo energético forman parte de los complejos de la cadena respiratoria (citocromos y ATP sintasa). De las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos, la exo-inulinasa participa en el metabolismo directo de la sacarosa y la piruvato carboxil transferasa (enzima del ciclo de Krebs) es la encargada de transformar el piruvato en oxalacetato dando inicio al ciclo de Krebs. Mientras que el 15 % restante corresponde con proteínas asociadas al metabolismo de proteínas/proteólisis (4 proteínas), transporte (3 proteínas), redox/estrés (2 proteínas) y 2 proteínas sin caracterizar.

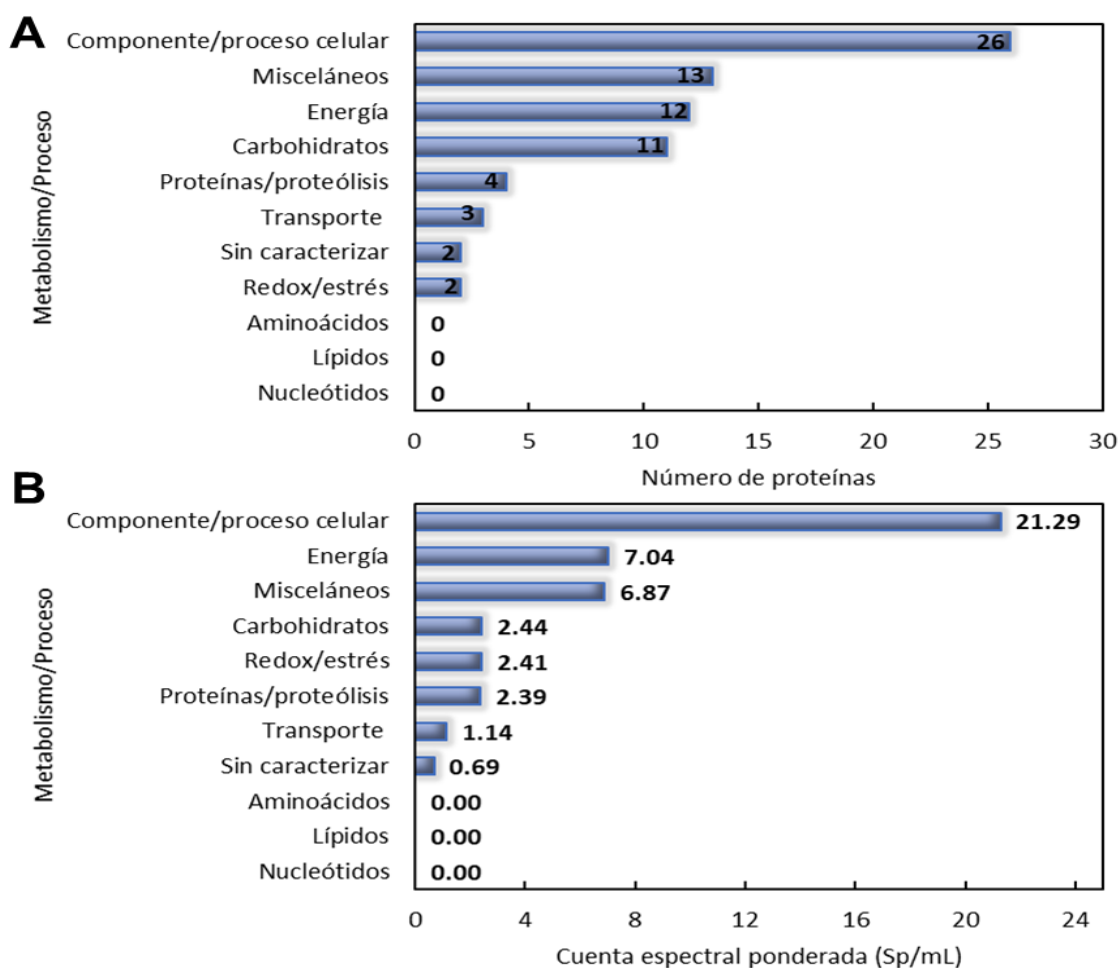


Figura 34. Clasificación de las proteínas abundantes no reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML. A) número de proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan, B) cuenta espectral ponderada de las proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan.

Aunque el número de proteínas abundantes no reguladas de algunos metabolismos es menor que en otros, basándonos en la CEP (Figura 35B) podemos comprobar que las proteínas del metabolismo energético son más abundantes que las proteínas clasificadas como misceláneas. De esto se puede interpretar que el crecimiento y respiración de *A. brasiliensis* se encuentran activos en mayor medida que el resto de los metabolismos. Del mismo modo ocurre con las proteínas de procesos redox/estrés que, aunque son solo dos, son un grupo de proteínas abundantes siendo la Cu/Zn SOD una enzima antioxidante importante durante el crecimiento de *A. brasiliensis*.

9.6.3. Proteínas abundantes reguladas

El 8% del proteoma de *A. brasiliensis* en CML (76 proteínas) son proteínas abundantes y están reguladas. 70 de las 76 proteínas se encuentran presentes en las tres concentraciones de sacarosa evaluadas (20, 40, 60 g/L). De acuerdo con su ubicación en la célula, 11 proteínas son extracelulares, 63 proteínas son intracelulares y solo 2 proteínas se encuentran en el grupo denominado "Extra-Intra". De las 11 proteínas extracelulares, 8 son enzimas y todas cuentan con secuencia péptido señal que respalda su secreción al exterior de la célula. Adicionalmente, la 1,3-beta-glucanosiltransferasa es una enzima asociada a la membrana celular. De las 65 proteínas restantes solo la proteína de transferencia de fosfatidilinositol presenta evidencia de secreción y sólo 10 son enzimas. Según la función principal de las proteínas abundantes reguladas (Figura 36A), el 45% (34 proteínas) está asociado a componentes (núcleo, ribosoma, membrana, pared celular) o procesos celulares (transcripción y regulación). Las proteínas de esta categoría incluyen la 1,3-beta-glucanosiltransferasa, Histonas H4 y H2A, la proteína que contiene el dominio ribosomal L23eN, la purina-citocina permeasa, la proteína que contiene el dominio Sm, la proteína que contiene el dominio 14-3-3, la proteína que contiene el dominio YL1_C y dos isoformas de la proteína que contiene el dominio RRM el cual es un dominio de unión a ARN (Shepard and Hertel, 2009). Todas estas proteínas varían en función, desde conferirle estructura al ADN (cromatina) y regular la expresión génica, hasta participar en el proceso de división celular, transcripción y procesamiento del ARN. El 11% (8 proteínas) son proteínas del metabolismo energético, principalmente componentes de los citocromos (sobre-reguladas) y la ATP sintasa de la cadena respiratoria (bajo-regulada) excepto por la subunidad G de la ATPasa vacuolar (ATPasa-V) (sobre-regulada) que es un complejo proteico de membrana que funciona como bomba de protones al hidrolizar ATP. Ésta es

encargada de acidificar compartimentos intracelulares en células eucariotas lo que la vuelve fundamental en diferentes procesos celulares (Vasanthakumar and Rubinstein, 2020).

Otro 11% (8 proteínas) corresponde con el metabolismo de carbohidratos. Aunque está reportado que en CML la síntesis de las enzimas inducibles es reprimida cuando la concentración de azúcar es mayor a 10 g/L, (Viniestra-González and Favela-Torres, 2006), la endo-inulinasa de *A. brasiliensis* está sobre regulada, lo cual demuestra que bajo las condiciones de CML evaluadas (20 a 60 g/L de sacarosa) no hay represión catabólica en la síntesis de ésta enzima aun cuando los productos de hidrólisis de sacarosa son de más fácil asimilación y son considerados como represores (Rubio and Navarro, 2006). Cuatro enzimas asociadas al metabolismo de carbohidratos participan en la glucólisis. La fosfoglicerato mutasa (reacción 8) y enolasa (reacción 9) son sobre-reguladas, mientras que la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (reacción 6) y fosfoglicerato quinasa (reacción 7) son bajo reguladas. El nivel de regulación en estas 4 enzimas probablemente este dado por acumulación de su sustrato y mediante modificaciones postraduccionales como la acetilación-des acetilación observada en enzimas de diferentes vías metabólicas y en la fosfoglicerato mutasa-1 (Hallows, Yu and Denu, 2012). Por lo tanto, la regulación de las cuatro enzimas no afecta la regulación global de la vía de la glucólisis que está dada en las reacciones 1, 3 y 10 (Nelson *et al.*, 2009).

La categoría proteínas/proteólisis ocupa el 9% del total de proteínas con 7 proteínas reguladas de las cuales tres participan en el catabolismo de proteínas y son sobre reguladas (dos peptidasas y una proteína con dominio similar a la ubiquitina), otras dos proteínas participan en el plegamiento de proteínas (una sobre-regulada y la otra bajo-regulada), mientras que la subunidad beta del complejo asociado al polipéptido naciente (bajo-regulada) previene de la interacción inadecuada de los polipéptidos emergentes con otras proteínas citoplasmáticas (Beatrix, Sakai and Wiedmann, 2000) y participa como sensor de proteostasis que permite a la célula un mecanismo de regulación en el que la traducción es controlada por el estado de plegamiento del proteoma celular y la respuesta celular al estrés (Kirstein-Miles *et al.*, 2013). El resto de las proteínas reguladas (24%) comprende proteínas misceláneas, sin caracterizar, redox/estrés, transporte y del metabolismo de nucleótidos. Entre estas destacan la proteína antigénica que contiene el dominio Rick, asociada a patogenicidad (bajo-regulada), la mucina-7 de resistencia a antifúngicos (sobre-regulada), una catalasa (sobre-regulada) relacionada con la respuesta a estrés y la adenilato quinasa (sobre-regulada) que participa en el metabolismo de nucleótidos.

La Figura 23a nos da un panorama general del número de proteínas abundantes reguladas dependiendo del metabolismo o proceso. Sin embargo, en términos del nivel de abundancia de las proteínas según el metabolismo o proceso (Figura 36B) encontramos que las 7 proteínas clasificadas como proteínas/proteólisis en conjunto son ligeramente más abundantes que las 8 proteínas del metabolismo de carbohidratos. Aunque las proteínas clasificadas como proceso/componente celular son las más abundantes, recordemos que el grupo comprende 34 proteínas, lo que significa que de forma individual su abundancia es relativamente menor que las proteínas de otros grupos, por lo tanto, otros metabolismos pueden estar más activos.

De acuerdo con la pendiente resultante de graficar los valores normalizados de la CEP (Tabla A13), 40 proteínas tienen regulación positiva (sobre-reguladas) y 36 proteínas tienen regulación negativa (bajo-reguladas). Todas las proteínas extracelulares son sobre-reguladas, lo cual significa que su presencia en el proteoma de *A. brasiliensis* incrementa con la intensificación en la concentración de sacarosa. De estas proteínas destacan la proteína con dominio peptidasa A1, la 1,3-beta-glucanosiltransferasa y la catalasa. Las proteínas intracelulares sobre-reguladas pertenecen al citocromo c oxidasa, la enolasa y la fosfoglicerato mutasa de la glucólisis, la subunidad 2 del complejo de preplegamiento, la proteína que contiene el dominio RRM, la subunidad G de la ATPasa-V, la adenilato quinasa, entre otras.

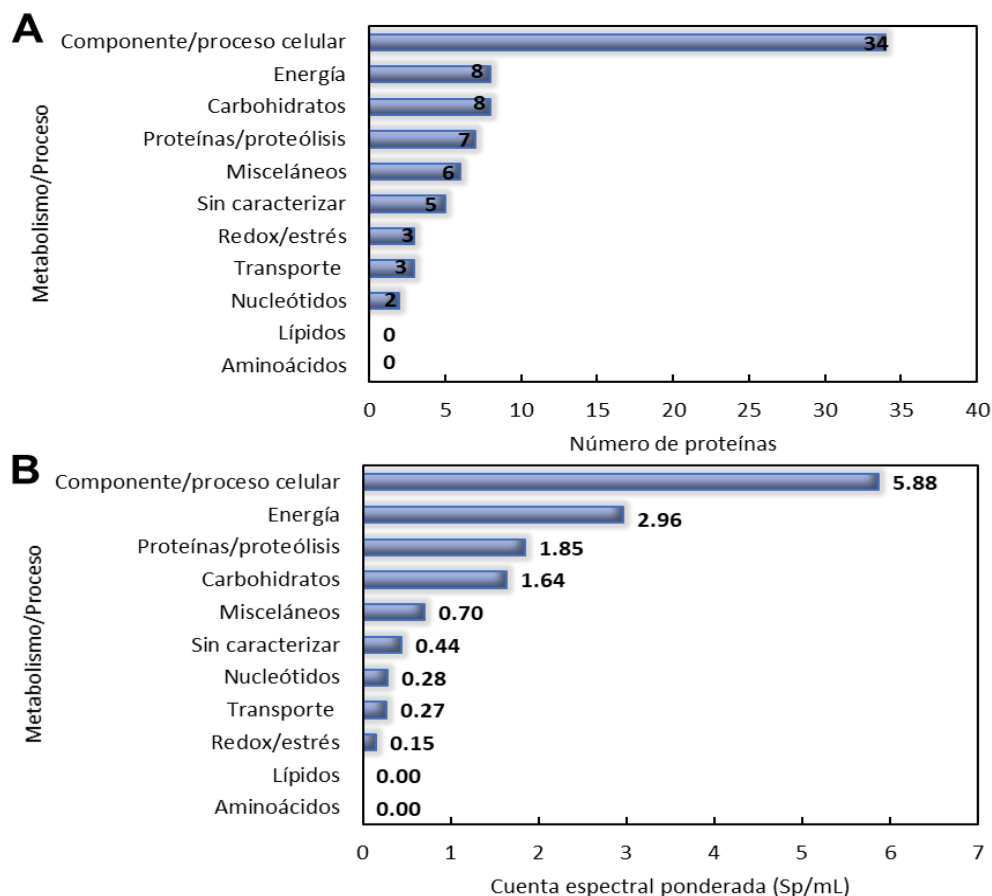


Figura 35. Clasificación de las proteínas abundantes reguladas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML. A) número de proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan, B) cuenta espectral ponderada de las proteínas en función del metabolismo o proceso biológico en que participan.

Por otra parte, las proteínas cuya presencia en el proteoma de *A. brasiliensis* disminuye por efecto de la concentración de sacarosa (bajo-reguladas) son todas intracelulares y principalmente asociadas a procesos y componentes celulares (histonas H4 y H2A, la proteína que contiene el dominio ribosomal L23eN, la proteína que contiene el dominio 14-3-3 y una isoforma de la proteína que contiene el dominio RRM) lo cual sugiere que la concentración de sacarosa incide en el crecimiento de *A. brasiliensis* a través de la transcripción de genes y procesamiento del ARNm (Celona *et al.*, 2011; Afroz *et al.*, 2015). Otras proteínas bajo-reguladas involucradas en otros metabolismos son la subunidad beta del complejo asociado al polipéptido naciente, la ribosa/galactosa isomerasa y la proteína antigénica que contiene el dominio Rick.

10. CONCLUSIONES

10.1. Conclusión general

La identificación y análisis del proteoma de *Aspergillus brasiliensis* permitió explicar las diferencias fisiológicas y enzimáticas por efecto del sistema de cultivo y la concentración de sacarosa; en particular, se demostró mayor complejidad en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS, así como mayor secreción de proteínas. Este estudio demostró alta abundancia y sobre-regulación de enzimas degradadoras de carbohidratos en CMS. También permitió corroborar que la producción de inulinasa por *A. brasiliensis* es mayor a la de invertasa y que la síntesis de inulinasa no está sujeta a represión catabólica ni en CMS ni en CML, mientras que la síntesis de invertasa es bajo-regulada en CMS. Mientras que en CMS el metabolismo central de la glucosa está activo, en CML, predominan procesos celulares asociados con la replicación y transcripción de ADN, y la síntesis de pared celular. Este hallazgo, junto con la regulación de proteínas asociadas con componentes y procesos celulares y los elevados niveles de producción de CO₂ presentan nuevas evidencias para proponer que en CMS el catabolismo predomina sobre el anabolismo.

10.2. Conclusiones parciales

- *Aspergillus brasiliensis* produce inulinasa e invertasa en medio mínimo con sacarosa como única fuente de carbono en CMS y CML, siendo la inulinasa la enzima predominante.
- El incremento en la concentración de sacarosa aumenta la producción y productividad de inulinasa e invertasa sin represión catabólica en ambos tipos de cultivo.
- La tasa de producción de CO₂ en CMS aumenta significativamente con el aumento en la concentración de sacarosa; la constante de inhibición por sustrato demuestra que en CMS la inhibición por sustrato es menor que en CML.

- El número de proteínas bajo-reguladas debido al aumento en la concentración de sacarosa es significativamente mayor en CML que en CMS.
- La síntesis de enzimas que degradan polisacáridos es bajo-regulada en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa, mientras que con concentraciones menores a 60 g/L éstas no son afectadas por la concentración de sacarosa en ninguno de los sistemas de cultivo.
- El incremento en la concentración de sacarosa favorece la regulación positiva (sobre-regulación) de la endo-inulinasa y exo-inulinasa del proteoma de *A. brasiliensis* en CML y CMS, respectivamente.
- En CMS hay mayor producción de enzimas antioxidantes que en CML y su sobre-regulación está asociada con el incremento en la concentración de ERO debida al aumento en la concentración de sacarosa.
- *A. brasiliensis* mantiene activa la vía de la ubiquitinación en ambos sistemas de cultivo, pero solo en CMS hay evidencia de que ésta activa la degradación proteica mediada por el proteasoma.
- En CMS y CML hay presencia extracelular de proteínas que típicamente son intracelulares. Estas proteínas probablemente tienen funciones moonlighting asociadas con la adhesión a soportes sólidos.

11. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se sugieren las siguientes perspectivas para la realización de estudios posteriores con *A. brasiliensis*.

- Estudiar la ruta biosintética de nogalamicina en CMS.
- Producir y caracterizar cianovirina en CMS.
- Estudiar modificaciones postraduccionales de inulinasa en CML y CMS.
- Estudiar la degradación de cloro aromáticos en CMS y CML.
- Caracterizar la mucina-7 para conocer como participa en la resistencia a compuestos con actividad fungicida.

- Caracterizar la proteína 14-3-3 que es una de las proteínas más abundantes en CMS.

12. REFERENCIAS

A. Al-Saman, M. *et al.* (2021) 'Optimization of lovastatin production by *Aspergillus terreus* ATCC 10020 using solid-state fermentation and its pharmacological applications', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31(November 2020), p. 101906. doi: 10.1016/j.bcab.2021.101906.

Abarca, M. L. *et al.* (2004) 'Taxonomy and significance of black aspergilli. [Taxonomía y significado de los aspergillus negros].', *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), pp. 33–49. Available at: <https://bit.ly/2BIG3GM>.

Abd Allah AbdAl-Aziz, S., El-Metwally, M. M. and Ismail Ali Saber, W. E. (2012) 'Molecular identification of a novel inulinolytic fungus isolated from and grown on tubers of *Helianthus tuberosus* and statistical screening of medium components', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12), pp. 3245–3254. doi: 10.1007/s11274-012-1134-y.

Abd El Aty, A. A., Wehaidy, H. R. and Mostafa, F. A. (2014) 'Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett – Burman and Taguchi methods', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 102, pp. 261–268. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.11.007.

Abdella, A., Segato, F. and Wilkins, M. R. (2020) 'Optimization of process parameters and fermentation strategy for xylanase production in a stirred tank reactor using a mutant *Aspergillus nidulans* strain', *Biotechnology Reports*. Elsevier B.V., 26. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00457.

Acuña-Argüelles, M. E. *et al.* (1995) 'Production and properties of three pectinolytic activities.pdf', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, pp. 808–814.

Adav, S. S. *et al.* (2010) 'Quantitative iTRAQ secretome analysis of *aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes', *Journal of Proteome Research*, 9(8), pp. 3932–3940. doi: 10.1021/pr100148j.

Adav, S. S., Ravindran, A. and Sze, S. K. (2013) 'Proteomic analysis of temperature

dependent extracellular proteins from *Aspergillus fumigatus* grown under solid-state culture condition', *Journal of Proteome Research*, 12(6), pp. 2715–2731. doi: 10.1021/pr4000762.

Adnan, M. *et al.* (2018) 'Carbon catabolite repression in filamentous Fungi', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), pp. 1–23. doi: 10.3390/ijms19010048.

Aebersold, R. and Mann, M. (2003) 'Mass spectrometry-based proteomics', *Nature*, 422, pp. 198–207. Available at: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>.

Afreen, S. *et al.* (2018) 'Extracellular laccase production and its optimization from *Arthrospira maxima* catalyzed decolorization of synthetic dyes', *Saudi Journal of Biological Sciences*. King Saud University, 25(7), pp. 1446–1453. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.015.

Afroz, T. *et al.* (2015) 'One , Two , Three , Four ! How Multiple RRM's Read the Genome Sequence', *Methods in Enzymology*, 558, pp. 235–278. doi: 10.1016/bs.mie.2015.01.015.

Agrawal, K. *et al.* (2019) 'Process optimization, purification and characterization of alkaline stable white laccase from *Myrothecium verrucaria* ITCC-8447 and its application in delignification of agroresidues', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V, 125, pp. 1042–1055. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.108.

Aguilar, C. N. (1998) 'www.m edigraphic. org.mx', *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 40, pp. 158–165.

Aguilar, C. N. *et al.* (2001) 'Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures', *Process Biochemistry*, 36(6), pp. 565–570. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00251-X.

Ajala, A. S. *et al.* (2020) 'A study on effect of fermentation conditions on citric acid production from cassava peels', *Scientific African*. Elsevier B.V., 8, pp. 4–9. doi: 10.1016/j.sciaf.2020.e00396.

Akpabli-Tsigbe, N. D. K. *et al.* (2021) 'Novel solid-state fermentation extraction of 5-O-caffeoylquinic acid from heilong48 soybean using *Lactobacillus helveticus*: Parametric screening and optimization', *Lwt-Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 149, p.

111809. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111809.

Al-Dabbagh, Y. N. and Mahmood, W. A. (2015) 'Effect of Carbon , Nitrogen and pH on Inulinase Production from Local Isolate of *Aspergillus niger*', *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 27(3), pp. 1–8.

Al-Dhabi, N. A. *et al.* (2020) 'Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation', *Saudi Journal of Biological Sciences*. The Authors, 27(1), pp. 474–479. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.11.011.

Alexandri, M. *et al.* (2020) 'High L(+)-lactic acid productivity in continuous fermentations using bakery waste and lucerne green juice as renewable substrates', *Bioresource Technology*. Elsevier, 316(August), p. 123949. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123949.

Almanaa, T. N. *et al.* (2020) 'Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues', *Journal of King Saud University - Science*. The Author(s), 32(2), pp. 1555–1561. doi: 10.1016/j.jksus.2019.12.011.

Alves, J. N. e O., Jorge, J. A. and Guimarães, L. H. S. (2013) 'Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emericella nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source', *Advances in Microbiology*, 03(05), pp. 421–429. doi: 10.4236/aim.2013.35057.

Amadi, O. C. *et al.* (2020) 'Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17 under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 6(7), p. e04566. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04566.

Amblee, V. and Jeffery, C. J. (2015) 'Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface', *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0130575.

American Society for Testing and Materials (2012) 'Standard Test Method for Resistance to Growth of Mold on the Surface of Interior Coatings in an Environmental Chamber', *ASTM*

D3273, (Reapproved 2012), pp. 1–4.

Andersen, M. R. *et al.* (2011) 'Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88', *Genome Research*, 21(6), pp. 885–897. doi: 10.1101/gr.112169.110.

Anderson, T. M. (2009) *Industrial Fermentation Processes*. 3rd edn, *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd edn. USA: Elsevier. doi: 10.1016/B978-012373944-5.00369-2.

Andrews, J. F. (1968) 'A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates', *Biotechnology and Bioengineering*, 10, pp. 707–723.

Ang, S. K. *et al.* (2013) 'Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 48(9), pp. 1293–1302. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.019.

Anjum, T., Azam, A. and Irum, W. (2012) 'Production of cyclosporine a by submerged fermentation from a local isolate of *Penicillium fellutanum*', *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(4), pp. 372–374. doi: 10.4103/0250-474X.107082.

Antsoategi-Uskola, M., Markina-Iñarrairaegui, A. and Ugalde, U. (2017) 'Copper resistance in *Aspergillus nidulans* relies on the PI-type ATPase CrpA, regulated by the transcription factor AceA', *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 912. doi: 10.3389/fmicb.2017.00912.

Aranda, C. *et al.* (2006) 'Fungal invertase expression in solid-state fermentation', *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), pp. 229–233.

Aro, N., Pakula, T. and Penttilä, M. (2005) 'Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi', 29, pp. 719–739. doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.006.

Asaff, A. *et al.* (2006) 'Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations', *Process Biochemistry*, 41(6), pp. 1303–1310. doi: 10.1016/j.procbio.2006.01.001.

Asagbra, A. E., Sanni, A. I. and Oyewole, O. B. (2005) 'Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate', *World*

Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(2), pp. 107–114. doi: 10.1007/s11274-004-2778-z.

Ashburner, M. *et al.* (2000) 'Gene Ontology: tool for the unification of biology', *Nature Genetics*, 25, pp. 1535–1540.

Astoreca, A. *et al.* (2007) 'Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina', *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), pp. 314–318. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.027.

Attwood, P. V and Wieland, T. (2015) 'Nucleoside diphosphate kinase as protein histidine kinase', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 160, pp. 153–160. doi: 10.1007/s00210-014-1003-3.

Baker, S. E. and Bennett, J. W. (2008) *Genomics of the Aspergilli, The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*.

Balachandran, C. *et al.* (2021) 'Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes', *Saudi Journal of Biological Sciences*. The Author(s), 28(8), pp. 4263–4269. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.04.069.

Balasubramaniam, A. K., Nagarajan, K. V. and Paramasamy, G. (2001) 'Optimization of media for beta-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation', *Process Biochemistry*, 37(4), pp. 1241–1247. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00204-7.

Bansal, N. *et al.* (2012) 'Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues', *Waste Management*. Elsevier Ltd, 32(7), pp. 1341–1346. doi: 10.1016/j.wasman.2012.03.006.

Bard, J. A. M. *et al.* (2018) 'Annual Review of Biochemistry Structure and Function of the 26S Proteasome', *Annual Review of Biochemistry*, 87(27), pp. 1–28. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem->.

- Barrios-González, J. and Mejía, A. (1996) 'Production of Secondary Metabolites by Solid-State Fermentation', *Biotechnology Annual Review*, 2(C), pp. 85–121. doi: 10.1016/S1387-2656(08)70007-3.
- Barrios-González, J. and Tarragó-Castellanos, M. R. (2017) 'Solid-State Fermentation: Special Physiology of Fungi', in J.-M. Mérillon, K. G. R. (ed.) *Fungal Metabolites, Reference Series in Phytochemistry*. Switzerland: Springer International Publishing, pp. 319–347. doi: 10.1007/978-3-319-25001-4.
- de Barros Ranke, F. F. *et al.* (2020) 'Ethanol from rice byproduct using amylases secreted by *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. Enzyme partial purification and characterization', *Journal of Environmental Management*, 266. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110591.
- Baskaran, R. and Krishnan, C. (2020) 'Enhanced production of cellulase from a novel strain *Trichoderma gamsii* M501 through response surface methodology and its application in biomass saccharification', *Process Biochemistry*. Elsevier, 99(August), pp. 48–60. doi: 10.1016/j.procbio.2020.08.006.
- Bateman, A. *et al.* (2017) 'UniProt: The universal protein knowledgebase', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(D1), pp. D158–D169. doi: 10.1093/nar/gkw1099.
- Bateman, R. L. *et al.* (2001) 'Mechanistic Inferences from the Crystal Structure of Fumarylacetoacetate Hydrolase with a Bound Phosphorus-based Inhibitor *', *The Journal of biological chemistry*, 276(18), pp. 15284–15291. doi: 10.1074/jbc.M007621200.
- Beatrix, B., Sakai, H. and Wiedmann, M. (2000) 'The α and β subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions', *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), pp. 37838–37845. doi: 10.1074/jbc.M006368200.
- Behera, S. S. and Ray, R. C. (2016) 'Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 86, pp. 656–669. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090.

Bessarabova, M. *et al.* (2012) 'Knowledge-based analysis of proteomics data.', *BMC bioinformatics*, 13(s13). doi: 10.1186/1471-2105-13-s16-s13.

Bhatt, B. *et al.* (2020) 'Kitchen waste for economical amylase production using *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 26. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101654.

Bhatt, K. *et al.* (2020) 'Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 164, pp. 3332–3339. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.205.

Binod, P. *et al.* (2013) 'Industrial enzymes - Present status and future perspectives for india', *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72(5), pp. 271–286.

Blueggel, M., Chamrad, D. and Meyer, H. E. (2004) 'Bioinformatics in proteomics', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 5, pp. 79–88. doi: 10.1201/9781420027624.

Box, J. A. *et al.* (2008) 'Spliceosomal cleavage generates the 3' end of telomerase RNA', *Nature*. Nature Publishing Group, 456(7224), pp. 910–914. doi: 10.1038/nature07584.

Brandl, J. and Andersen, M. R. (2017) 'Aspergilli: Models for systems biology in filamentous fungi', *Current Opinion in Systems Biology*. Elsevier Ltd, 6, pp. 67–73. doi: 10.1016/j.coisb.2017.09.005.

Bruneau, J. *et al.* (2001) 'Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis', pp. 2812–2823.

Brunelle, J. L. and Green, R. (2014) *One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4.

Brunger, A. T. (2001) 'Structural insights into the molecular mechanism of calcium-dependent vesicle – membrane fusion', *Current Opinion in Structural Biology*, 11, pp. 163–173.

Bulfer, S. L., Hendershot, J. M. and Trievel, R. C. (2012) 'Crystal structure of homoisocitrate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*', *Proteins*, 80(2), pp. 661–666. doi: 10.1002/prot.23231.

Burggraaf, A. M., Punt, P. J. and Ram, A. F. J. (2016) 'The unconventional secretion of PepN is independent of a functional autophagy machinery in the filamentous fungus *Aspergillus niger*', *FEMS Microbiology Letters*, 363(15), pp. 1–15. doi: 10.1093/femsle/fnw152.

Callegari, E. and Navarrete, M. (2012) 'The Use of Mass Spectrometry for Characterization of Fungal Secretomes', *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*.

Camara, M. C. *et al.* (2020) 'Alternative methods for gibberellic acid production, recovery and formulation: A case study for product cost reduction', *Bioresource Technology*. Elsevier, 309, p. 123295. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123295.

Canela, H., Takami, L. and Ferreira, M. (2017) 'cipC is important for *Aspergillus fumigatus* virulence', *Acta Pathologica, Microbiologica e Immunologica Scandinavica*, 125(2), pp. 141–147. doi: 10.1111/apm.12648.

Carollo, C. A. *et al.* (2010) 'Fungal tyrosine betaine , a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp . fungi', 114, pp. 473–480. doi: 10.1016/j.funbio.2010.03.009.

Carota, E. *et al.* (2020) 'Mixed glycerol and orange peel-based substrate for fed-batch microbial biodiesel production', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 6(9). doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04801.

Carpinelli Macedo, J. V. *et al.* (2020) 'Cost-effective lactic acid production by fermentation of agro-industrial residues', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 27(June). doi: 10.1016/j.bcab.2020.101706.

Carrillo-Sancen, G. *et al.* (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*. Elsevier Ltd, 51(12), pp. 2001–2010. doi:

10.1016/j.procbio.2016.09.001.

Carvalho, P. C. *et al.* (2016) 'Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 102–117. doi: 10.1038/nprot.2015.133.

De Castro, A. M. H. *et al.* (2010) 'Trichoderma harzianum IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), pp. 2111–2122. doi: 10.1007/s12010-010-8986-0.

Catherman, A. D., Skinner, O. S. and Kelleher, N. L. (2014) 'Top Down proteomics: Facts and perspectives', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 445(4), pp. 683–693. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.041.

Celona, B. *et al.* (2011) 'Substantial Histone Reduction Modulates Genomewide Nucleosomal Occupancy and Global Transcriptional Output', *Plos Biology*, 9(6). doi: 10.1371/journal.pbio.1001086.

Chakravarthi, S., Jessop, C. E. and Bulleid, N. J. (2006) 'The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress', *EMBO Reports*, 7(3), pp. 271–275. doi: 10.1038/sj.embor.7400645.

Chakravarti, R. and Sahai, V. (2002) 'Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods', *Process Biochemistry*, 38(4), pp. 481–486. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00138-3.

Chandra, D., Liu, J. and Tang, D. G. (2002) 'Early Mitochondrial Activation and Cytochrome c', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(52), pp. 50842–50854. doi: 10.1074/jbc.M207622200.

Chen, H. *et al.* (2014) 'Physiological characterization of ATP - citrate lyase in *Aspergillus niger*', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(4), pp. 721–731. doi: 10.1007/s10295-014-1418-3.

- Chen, Y., Zhu, J. and Ying, S. (2014) 'The GPI-anchored protein Ecm33 is vital for conidiation , cell wall integrity , and multi-stress tolerance of two filamentous entomopathogens but not for virulence', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, pp. 5517–5529. doi: 10.1007/s00253-014-5577-y.
- Chiliveri, S. R., Koti, S. and Linga, V. R. (2016) 'Retting and degumming of natural fibers by pectinolytic enzymes produced from *Bacillus tequilensis* SV11 - UV37 using solid state fermentation', *SpringerPlus*. Springer International Publishing, 5(559). doi: 10.1186/s40064-016-2173-x.
- Cohen, M. J., Chirico, W. J. and Lipke, P. N. (2020) 'Through the back door : Unconventional protein secretion', *The Cell Surface*. Elsevier Ltd, p. 100045. doi: 10.1016/j.tcsw.2020.100045.
- Cortázar, A. R. *et al.* (2014) 'SECRETOOL: Integrated secretome analysis tool for fungi', *Amino Acids*, 46(2), pp. 471–473. doi: 10.1007/s00726-013-1649-z.
- Cottrell, J. S. (2011) 'Protein identification using MS/MS data', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 74(10), pp. 1842–1851. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.014.
- Couto, N. *et al.* (2013) 'Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: A proteomic approach', *Journal of Proteome Research*, 12(6), pp. 2885–2894. doi: 10.1021/pr4001948.
- Couto, N. *et al.* (2015) 'Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms', *Journal of Proteome Research*, 14(10), pp. 4207–4222. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00312.
- Couto, N., Wood, J. and Barber, J. (2016) 'The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 95(June), pp. 27–42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
- Cui, Y. *et al.* (2020) 'Aerobic acetone-butanol-isopropanol (ABI) fermentation through a co-culture of *Clostridium beijerinckii* G117 and recombinant *Bacillus subtilis* 1A1', *Metabolic*

Engineering Communications. International Metabolic Engineering Society, 11. doi: 10.1016/j.mec.2020.e00137.

Das, D., Bhat, R. and Selvaraj, R. (2019) 'Review of inulinase production using solid-state fermentation', *Annals of Microbiology*. *Annals of Microbiology*, 69, pp. 201–209. doi: 10.1007/s13213-019-1436-5.

Das, D., Selvaraj, R. and Ramananda Bhat, M. (2019) 'Optimization of inulinase production by a newly isolated strain *Aspergillus flavus* var. *flavus* by solid state fermentation of *Saccharum arundinaceum*', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 22(September), p. 101363. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101363.

Deshpande, N. *et al.* (2008) 'Protein glycosylation pathways in filamentous fungi', *Glycobiology*, 18(8), pp. 626–637. doi: 10.1093/glycob/cwn044.

Deutsch, E. W. *et al.* (2010) 'A guided tour of the Trans-Proteomic Pipeline', *Proteomics*, 10(6), pp. 1150–1159. doi: 10.1002/pmic.200900375.

Dezam, A. P. G. *et al.* (2017) 'Microbial production of organic acids by endophytic fungi', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 11, pp. 282–287. doi: 10.1016/j.bcab.2017.08.001.

Dhillon, G. S., Kaur, S. and Brar, S. K. (2012) 'In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain', *International Biodeterioration and Biodegradation*. Elsevier Ltd, 72, pp. 67–75. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.05.012.

Díaz-Godínez, G. *et al.* (2001) 'Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation : a comparative study', *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 26, pp. 271–275.

Díaz, A. B. *et al.* (2012) 'Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace', *Food and Bioproducts Processing*. Institution of Chemical Engineers, 90(1), pp. 72–78. doi: 10.1016/j.fbp.2010.12.003.

- Dimou, E. and Nickel, W. (2018) 'Unconventional mechanisms of eukaryotic protein secretion', *Current Biology*. Elsevier, 28(8), pp. R406–R410. doi: 10.1016/j.cub.2017.11.074.
- Dinarvand, M. *et al.* (2013) 'Effect of C / N Ratio and Media Optimization through Response Surface Methodology on Simultaneous Productions of Intra- and Extracellular Inulinase and Invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611', *Biomed Research International*, 2013.
- Dinarvand, M., Rezaee, M. and Foroughi, M. (2017) 'Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM)', *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 48(3), pp. 427–441. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.026.
- Dobson, C. M. (2004) 'Experimental investigation of protein folding and misfolding', *Methods*, 34(1), pp. 4–14. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.002.
- Doyle, S. (2011) 'Fungal proteomics: From identification to function', *FEMS Microbiology Letters*, 321(1), pp. 1–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02292.x.
- Dubois, M. *et al.* (1956) 'Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances', *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017.
- El-Aneed, A., Cohen, A. and Banoub, J. (2009) 'Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers', *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), pp. 210–230. doi: 10.1080/05704920902717872.
- Eng, J. K. *et al.* (2015) 'A Deeper Look into Comet - Implementation and Features', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(11), pp. 1865–1874. doi: 10.1007/s13361-015-1179-x.
- Escaramboni, B. *et al.* (2018) 'Ethanol biosynthesis by fast hydrolysis of cassava bagasse using fungal amylases produced in optimized conditions', *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 112, pp. 368–377. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.12.004.
- Estrada-Martínez, R. *et al.* (2019) 'A Mild Thermal Pre-treatment of the Organic Fraction of

Municipal Wastes Allows High Ethanol Production by Direct Solid-state Fermentation', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24(2), pp. 401–412. doi: 10.1007/s12257-019-0032-7.

Ezeilo, U. R., Wahab, R. A. and Mahat, N. A. (2020) 'Optimization studies on cellulase and xylanase production by *Rhizopus oryzae* UC2 using raw oil palm frond leaves as substrate under solid state fermentation', *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 156, pp. 1301–1312. doi: 10.1016/j.renene.2019.11.149.

Faccio, G., Nivala, O. and Kruus, K. (2011) 'Sulfhydryl oxidases : sources , properties , production and applications', *Appl Microbiol Biotechnol*, 91, pp. 957–966. doi: 10.1007/s00253-011-3440-y.

Falony, G. *et al.* (2006) 'Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation', *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), pp. 235–240.

Farinas, C. S. (2015) 'Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier, 52, pp. 179–188. doi: 10.1016/j.rser.2015.07.092.

Fattman, C. L., Schaefer, L. M. and Oury, T. D. (2003) 'Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine', *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3), pp. 236–256. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00275-2.

Favela-Torres, E. *et al.* (1998) 'Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations', *Process Biochemistry*, 33(2), pp. 103–107. doi: 10.1016/S0032-9592(97)00032-0.

Feitosa, P. R. B. *et al.* (2020) 'Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for the bio-enrichment of bioactive compounds in *Moringa oleifera* (moringa) leaves', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 27. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101709.

Feldman, D., Yarden, O. and Hadar, Y. (2020) 'Seeking the Roles for Fungal Small-Secreted Proteins in Affecting Saprophytic Lifestyles', *Frontiers in Microbiology*, 11(455). doi:

10.3389/fmicb.2020.00455.

Ferrarezi, A. L. *et al.* (2014) 'Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier B.V., 107, pp. 106–113. doi: 10.1016/j.molcatb.2014.05.012.

Ferreira de Oliveira, J. M. . *et al.* (2011) 'Proteomic analysis of the secretory response of *Aspergillus niger* to D-maltose and D-xylose', *PLoS ONE*, 6(6), p. e20865. doi: 10.1371/journal.pone.0020865.

Flärdh, K. and Buttner, M. J. (2009) 'Streptomyces morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium', *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), pp. 36–49. doi: 10.1038/nrmicro1968.

Fontanesi, F. *et al.* (2006) 'Assembly of mitochondrial cytochrome c -oxidase , a complicated and highly regulated cellular process', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(6), pp. C1129–C1147. doi: 10.1152/ajpcell.00233.2006.

Freson, K. (2019) *The platelet proteome*. 4th edn, *Platelets*. 4th edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-813456-6.00008-4.

Fricker, L. D. *et al.* (2006) 'Peptidomics: Identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues', *Mass Spectrometry Reviews*, 25(2), pp. 327–344. doi: 10.1002/mas.20079.

Frisvad, J. C. and Larsen, T. O. (2015) 'Chemodiversity in the genus *Aspergillus*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), pp. 7859–7877. doi: 10.1007/s00253-015-6839-z.

Fugate, C. J. and Jarrett, J. T. (2012) 'Biotin synthase: Insights into radical-mediated carbon-sulfur bond formation', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V., 1824(11), pp. 1213–1222. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.01.010.

Gallart-ayala, H. *et al.* (2014) 'New branches in the degradation pathway of monochlorocatechols by *Aspergillus nidulans*: A metabolomics analysis', *Journal of*

Hazardous Materials, 268, pp. 264–272. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.01.024.

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

García-Alonso, Á. *et al.* (2007) 'Platelet genomics and proteomics', in Michelson, A. (ed.) *Platelets*. second. Academic Press, pp. 99–116. doi: 10.1016/B978-012369367-9/50767-9.

Gardiner, D. M. *et al.* (2012) 'Comparative Pathogenomics Reveals Horizontally Acquired Novel Virulence Genes in Fungi Infecting Cereal Hosts', *PLOS Pathogens*, 8(9), p. e1002952. doi: 10.1371/journal.ppat.1002952.

Garuba, E. O. and Onilude, A. A. (2020) 'Exo-Inulinase Production by a Catabolite Repression-Resistant Mutant Thermophilic *Aspergillus tamaris* -U4 in Solid State Fermentation', *Biotechnology Journal International*, 24(4), pp. 21–31. doi: 10.9734/BJI/2020/v24i430110.

Gastebois, A. *et al.* (2013) 'SUN Proteins Belong to a Novel Family of beta - (1 , 3) -Glucan-modifying Enzymes Involved in Fungal Morphogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 288(19), pp. 13387–13396. doi: 10.1074/jbc.M112.440172.

Germeç, M. *et al.* (2020) 'Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase', *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 43(2), pp. 217–232. doi: 10.1007/s00449-019-02219-1.

Giansanti, P. *et al.* (2016) 'Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 11(5), pp. 993–1006. doi: 10.1038/nprot.2016.057.

Giraldo, M. A. *et al.* (2012) 'Thermostable invertases from *Paecilomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), pp. 463–472. doi: 10.1007/s11274-011-0837-9.

Glish, G. L. and Burinsky, D. J. (2008) 'Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(2), pp. 161–172. doi: 10.1016/j.jasms.2007.11.013.

Gomes, E. *et al.* (2018) *Fungal Growth on Solid Substrates, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/b978-0-444-63990-5.00003-7.

Gonzales, T. A. *et al.* (2020) 'Optimization of anaerobic fermentation of *Actinobacillus succinogenes* for increase the succinic acid production', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 27, p. 101718. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101718.

Gonzalez, J. C. *et al.* (2013) 'Production of *Trametes pubescens* Laccase under Submerged and Semi-Solid Culture Conditions on Agro-Industrial Wastes', *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0073721.

Graminha, E. B. N. *et al.* (2008) 'Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition', *Animal Feed Science and Technology*, 144(1–2), pp. 1–22. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029.

Greene, G. H. *et al.* (2014) 'Ecology Drives the Distribution of Specialized Tyrosine Metabolism Modules in Fungi', *Genome Biology and Evolution*, 6(1), pp. 121–132. doi: 10.1093/gbe/evt208.

Grintzalis, K. *et al.* (2014) 'Role of oxidative stress in sclerotial differentiation and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), pp. 5561–5571. doi: 10.1128/AEM.01282-14.

Guerrero-Urrutia, C. *et al.* (2021) 'Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 108, pp. 169–175. doi: 10.1016/j.procbio.2021.06.014.

Gugnani, H. C. (2003) 'Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli', *Frontiers in Bioscience*, 8(SUPPL.), pp. 346–357. doi: 10.2741/1002.

Gulati, M. *et al.* (2014) 'Functional Interaction between Ribosomal Protein L6 and RbgA during Ribosome Assembly', *PLoS Genetics*, 10(10). doi: 10.1371/journal.pgen.1004694.

Gulsunoglu, Z. *et al.* (2020) 'Enhancement of phenolic antioxidants in industrial apple waste by fermentation with *Aspergillus* spp.', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 25. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101562.

Guo, N. *et al.* (2020) 'Improvement of flavonoid aglycone and biological activity of mulberry leaves by solid-state fermentation', *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 148. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112287.

Gurgel, I. *et al.* (2019) 'The *Aspergillus fumigatus* Mucin MsbA Regulates the Cell Wall Integrity Pathway and Controls Recognition of the Fungus by the Immune System', *mSphere*, 4(3), pp. 1–15.

Hallows, W. C., Yu, W. and Denu, J. M. (2012) 'Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1 protein-mediated deacetylation', *Journal of Biological Chemistry*. © 2012 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 287(6), pp. 3850–3858. doi: 10.1074/jbc.M111.317404.

Hansen, G. H. *et al.* (2015) 'Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes : Comparison of solid state and submerged fermentation', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 50(9), pp. 1327–1341. doi: 10.1016/j.procbio.2015.05.017.

Hart-Smith, G. (2014) 'A review of electron-capture and electron-transfer dissociation tandem mass spectrometry in polymer chemistry', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 808, pp. 44–55. doi: 10.1016/j.aca.2013.09.033.

Hashemi, M. *et al.* (2010) 'Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties', *Journal of Bioscience and Bioengineering*. The Society for Biotechnology, Japan, 110(3), pp. 333–337. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.03.005.

- Hashemi, M. *et al.* (2013) 'Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus* sp. KR-8104 α -amylase at different pH and temperatures', *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 43(1), pp. 661–667. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.08.002.
- Hayek, S. R., Rane, H. S. and Parra, K. J. (2019) 'Reciprocal Regulation of V-ATPase and Glycolytic Pathway Elements in Health and Disease', *Frontiers in Physiology*, 10(127), pp. 1–9. doi: 10.3389/fphys.2019.00127.
- Heusden, G. P. H. Van (2009) 'Genomics 14-3-3 proteins: Insights from genome-wide studies in yeast', *Genomics*. Elsevier Inc., 94(5), pp. 287–293. doi: 10.1016/j.ygeno.2009.07.004.
- Heusden, G. P. H. Van and Steensma, H. Y. (2006) 'Yeast 14-3-3 proteins', *Yeast*, 23(3), pp. 159–171. doi: 10.1002/yea.1338.
- Hill, T. W. and Kafer, E. (2001) 'Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions', *Fungal Genetics Newsletter*, 48(December), pp. 20–21. doi: 10.4148/1941-4765.1173.
- Hölker, U. and Lenz, J. (2005) 'Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages?', *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), pp. 301–306. doi: 10.1016/j.mib.2005.04.006.
- Horikawa, I. *et al.* (1995) 'Molecular cloning of a novel human cDNA on chromosome 1q21 and its mouse homolog encoding a nuclear protein with DNA-binding ability', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208(3), pp. 999–1007. doi: 10.1006/bbrc.1995.1433.
- Hoshino, A. *et al.* (2019) 'The ADP / ATP translocase drives mitophagy independent of nucleotide exchange', *Nature*. Springer US, 575(7782), pp. 375–379. doi: 10.1038/s41586-019-1667-4.
- Houseknecht, J. *et al.* (2008) 'Reclassification of ATCC® 16404TM and ATCC® 9642TM as

Aspergillus brasiliensis', *Pharmaceutical Microbiology Forum*, 14(10), pp. 2–14.

Housseiny, M. M. (2014) 'Production of an endoinulinase from *Aspergillus niger* AUMC 9375, by solid state fermentation of agricultural wastes, with purification and characterization of the free and immobilized enzyme', *Journal of Microbiology*, 52(5), pp. 389–398. doi: 10.1007/s12275-014-3561-y.

Huang, L. *et al.* (2000) 'Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein', *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), pp. 29829–29839. doi: 10.1074/jbc.M002737200.

Huberts, D. H. E. W. and Klei, I. J. Van Der (2010) 'Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking', *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier B.V., 1803(4), pp. 520–525. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.022.

Hurtado-Guerrero, R. *et al.* (2008) 'Structural and kinetic differences between human and *Aspergillus fumigatus* D-glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase', *Biochemical Journal*, 415(2), pp. 217–223. doi: 10.1042/BJ20081000.

Huynh, M. L., Russell, P. and Walsh, B. (2009) 'Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 519, pp. 507–513. doi: 10.1007/978-1-59745-281-6_34.

Ibarra, B. A. *et al.* (2018) 'The 14-3-3 homolog, ArtA, regulates development and secondary metabolism in the opportunistic plant pathogen *Aspergillus flavus* Downloaded from <http://aem.asm.org/> on December 16, 2017 by FUDAN UNIVERSITY Downloaded from <http://aem.asm.org/> on December', *Applied and Environmental Microbiology*, 84(5). doi: 10.1128/AEM.02241-17.

Ichinose, S. *et al.* (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*. Elsevier Ltd, 125(2), pp. 141–147. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.08.019.

- Ire, F. S., Chima, I. J. and Ezebuio, V. (2021) 'Enhanced xylanase production from UV-mutated *Aspergillus niger* grown on corn cob and sawdust', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101869.
- Ishida, H. *et al.* (2000) 'Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*', *Current Genetics*, 37(6), pp. 373–379. doi: 10.1007/s002940000118.
- Ismail, A. A. (2017) 'Production of the immunosuppressant cyclosporin A by a new soil isolate, *Aspergillus fumigatus*, in submerged culture', *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), pp. 3305–3317. doi: 10.1007/s00253-016-8052-0.
- Israni, N. and Shivakumar, S. (2020) 'Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from directly valorized ragi husk and sesame oil cake by *Bacillus megaterium* strain Ti3: Statistical optimization and characterization', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 148, pp. 20–30. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.082.
- Jeffery, C. J. (2020) 'Enzymes, pseudoenzymes, and moonlighting proteins: diversity of function in protein superfamilies', *FEBS Journal*, 287(19), pp. 4141–4149. doi: 10.1111/febs.15446.
- Jia, Z. *et al.* (2010) 'Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of *Aspergillus terreus*', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), pp. 2014–2025. doi: 10.1007/s12010-009-8762-1.
- Jiang, X. *et al.* (2019) 'Efficient production of inulooligosaccharides from inulin by endoinulinase from *Aspergillus arachidicola*', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 208(July 2018), pp. 70–76. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.053.
- Jing, W. *et al.* (2003) 'Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*', *Process Biochemistry*, 39(1), pp. 5–11. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00264-9.
- Jonckheere, A. I. and Smeitink, J. A. M. (2012) 'Mitochondrial ATP synthase: architecture,

function and pathology', *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 35(2), pp. 211–225. doi: 10.1007/s10545-011-9382-9.

Joyce, S. A., Lango, L. and Clarke, D. J. (2011) *The Regulation of Secondary Metabolism and Mutualism in the Insect Pathogenic Bacterium Photorhabdus luminescens*. 1st edn, *Advances in Applied Microbiology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-387048-3.00001-5.

Kagliwal, L. D., Survase, S. A. and Singhal, R. S. (2009) 'A novel medium for the production of cephamycin C by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 100(9), pp. 2600–2606. doi: 10.1016/j.biortech.2008.11.046.

Kajander, T. *et al.* (2002) 'The structure of *Neurospora crassa* 3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme, a β propeller cycloisomerase', *Structure*, 10(4), pp. 483–492. doi: 10.1016/S0969-2126(02)00744-X.

Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) 'KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes', *Nucleic Acids Research*, 28(1), pp. 27–30. doi: 10.3892/ol.2020.11439.

Kapoor, M., Panwar, D. and Kaira, G. S. (2016) *Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes: Technical Challenges and Commercialization Potential, Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-802392-1.00003-4.

Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) 'Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons', *Analytical Chemistry*, 60(20), pp. 2299–2301. doi: 10.1021/ac00171a028.

Katz, M. E., Bernardo, S. M. and Cheetham, B. F. (2008) 'The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation', *Current Genetics*, 54(1), pp. 47–55. doi: 10.1007/s00294-008-0198-6.

- Keller, A. *et al.* (2005) 'A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats.', *Molecular systems biology*, 1. doi: 10.1038/msb4100024.
- Keller, A. and Shteynberg, D. (2007) 'Software Pipeline and Data Analysis for MS/MS Proteomics: The Trans-Proteomic Pipeline', in Chen, C. H. W. and C. (ed.) *Bioinformatics for Comparative Proteomics, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, pp. 46–48. doi: 10.1007/978-1-60761-977-2.
- Kessner, D. *et al.* (2008) 'ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development', *Bioinformatics*, 24(21), pp. 2534–2536. doi: 10.1093/bioinformatics/btn323.
- Khanapur, M. *et al.* (2017) 'Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase: A potential target for TB', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6), pp. 1725–1736. doi: 10.1016/j.bmc.2017.02.001.
- Kim, Y., Nandakumar, M. P. and Marten, M. R. (2007a) 'Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation', *Fungal Genetics and Biology*, 44(9), pp. 886–895. doi: 10.1016/j.fgb.2006.12.001.
- Kim, Y., Nandakumar, M. P. and Marten, M. R. (2007b) 'Proteomics of filamentous fungi', *Trends in Biotechnology*, 25(9), pp. 395–400. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.07.008.
- Kirstein-Miles, J. *et al.* (2013) 'The nascent polypeptide-associated complex is a key regulator of proteostasis', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 32(10), pp. 1451–1468. doi: 10.1038/emboj.2013.87.
- Kniemeyer, O. *et al.* (2006) 'Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*', *Current Genetics*, 49(3), pp. 178–189. doi: 10.1007/s00294-005-0047-9.
- Kniemeyer, O. (2011) 'Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*', *Proteomics*, 11(15), pp. 3232–3243. doi: 10.1002/pmic.201100087.
- Knob, A. *et al.* (2020) 'A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii*: Efficient and low-

cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101565.

Knowledge, O. and Morris, S. M. (2007) 'Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge', *Morris, Sidney*, 137(6), pp. 1602S–1609S.

Kokila, R. and Mrudula, S. (2010) 'Optimization of culture conditions for amylase production by thermophilic *Bacillus* sp. in submerged fermentation', *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 12(3), pp. 653–658.

Komander, D. (2009) 'Early Career Research Award The emerging complexity of protein ubiquitination', *Biochemical Society Transactions*, 37(5), pp. 937–953. doi: 10.1042/BST0370937.

Kowal, J., Tkach, M. and Théry, C. (2014) 'Biogenesis and secretion of exosomes', *Current Opinion in Cell Biology*, 29(1), pp. 116–125. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.

Kraus, P. R., Hofmann, A. F. and Harris, S. D. (2002) 'Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA', *FEMS Microbiology Letters*, 210(1), pp. 61–66.

Krijgsheld, P. *et al.* (2012) 'Spatially resolving the secretome within the mycelium of the cell factory *aspergillus niger*', *Journal of Proteome Research*, 11(5), pp. 2807–2818. doi: 10.1021/pr201157b.

Krijgsheld, P. *et al.* (2013) 'Development in *aspergillus*', *Studies in Mycology*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 74, pp. 1–29. doi: 10.3114/sim0006.

Krishna, C. (2005) 'Solid-state fermentation systems - An overview', *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1–2), pp. 1–30. doi: 10.1080/07388550590925383.

Krüger, R. *et al.* (2001) 'Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes', *Analytical Chemistry*, 73(24), pp. 5812–5821. doi: 10.1021/ac010827r.

Krull, R. *et al.* (2013) 'Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 163(2),

pp. 112–123. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.024.

Kumar, A. and Naraiian, R. (2019) *Differential expression of the microbial B-1,4-xylanase, and B-1,4-endoglucanase genes, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Genes Biochemistry and Applications*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-63503-7.00006-1.

Kumar, C. G. and Takagi, H. (1999) 'Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint', *Biotechnology Advances*, 17(7), pp. 561–594. doi: 10.1016/S0734-9750(99)00027-0.

Kumar, S., Gujjala, L. K. S. and Banerjee, R. (2017) 'Simultaneous pretreatment and saccharification of bamboo for biobutanol production', *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 101, pp. 21–28. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.02.028.

Kurien, B. T., Aggarwal, R. and Scofield, R. H. (2019) 'Protein extraction from gels: A brief review', *Methods in Molecular Biology*, 1855, pp. 479–482. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_40.

Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4', *Nature*, 227, pp. 680–685.

Lambou, K. *et al.* (2010) 'Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*', *Molecular Microbiology*, 75(4), pp. 910–923. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07024.x.

Lareo, C. *et al.* (2006) 'Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support', *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3–4), pp. 391–399. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.06.009.

Lario, L. D. *et al.* (2020) 'Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528', *Biotechnology Reports*, 28. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00546.

Laskay, Ü. A. *et al.* (2013) 'Proteome digestion specificity analysis for rational design of

extended bottom-up and middle-down proteomics experiments', *Journal of Proteome Research*, 12(12), pp. 5558–5569. doi: 10.1021/pr400522h.

Latgé, J. P. *et al.* (2005) 'Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*', *Medical Mycology*, 43(SUPPL.1), pp. 15–22. doi: 10.1080/13693780400029155.

Lengeler, K. B. *et al.* (2000) 'Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp. 746–785. doi: 10.1128/MMBR.64.4.746-785.2000.Updated.

Li, Peng, X. and Chen, H. (2013) 'Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation', *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier Ltd, 116(4), pp. 493–498. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.001.

Li, Q., McNeil, B. and Harvey, L. M. (2008) 'Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D', *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3), pp. 394–402. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.019.

Lilley, K. S. and Friedman, D. B. (2006) 'Difference gel electrophoresis DIGE', *Drug Discovery Today: Technologies*, 3(3), pp. 347–353. doi: 10.1016/j.ddtec.2006.09.013.

Lilley, K. S., Razzaq, A. and Dupree, P. (2002) 'Two-dimensional gel electrophoresis : recent advances in sample preparation , detection and quantitation', *Electrophoresis*, 6(1), pp. 46–50. doi: 10.1016/S1367-5931(01)00275-7.

Lim, D. *et al.* (2001) 'Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach', *Proteomics*, 1(7), pp. 899–910. doi: 10.1002/1615-9861(200107)1:7<899::aid-prot899>3.3.co;2-r.

Limkar, M. B., Pawar, S. V. and Rathod, V. K. (2019) 'Statistical optimization of xylanase and alkaline protease co-production by *Bacillus* spp using Box-Behnken Design under submerged fermentation using wheat bran as a substrate', *Biocatalysis and Agricultural*

- Biotechnology*. Elsevier Ltd, 17(February), pp. 455–464. doi: 10.1016/j.bcab.2018.12.008.
- Linger, J. G. and Tyler, J. K. (2007) 'Chromatin disassembly and reassembly during DNA repair', *Mutation Research*, 618(1–2), pp. 52–64. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.05.039.
- Lisacek, F. (2018) 'Proteome informatics', *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3(1991), pp. 60–75. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20479-2.
- Liu *et al.* (2021) 'Mitochondrial ATP Synthase Subunit d, a Component of the Peripheral', *The Plant Journal*, 107(3), pp. 713–726. doi: 10.1111/tpj.15317.
- Liu, J. *et al.* (2020) 'Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 152, pp. 288–294. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256.
- Lopez-Ramirez, N. *et al.* (2018) 'Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor', *Bioresource Technology*. Elsevier, 265, pp. 291–298. doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.015.
- López, J. L. (2007) 'Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 849(1–2), pp. 190–202. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.11.049.
- Lu, X. *et al.* (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), pp. 1–13.
- Luo, S. and Levine, R. L. (2009) 'Methionine in proteins defends against oxidative stress ABSTRACT', *The FASEF Journal*, 23(2), pp. 464–472. doi: 10.1096/fj.08-118414.
- Ma, X. *et al.* (2020) 'Lactic acid and animal feeds production from *Sophora flavescens* residues by *Rhizopus oryzae* fermentation', *Process Biochemistry*. Elsevier, 92, pp. 401–

408. doi: 10.1016/j.procbio.2020.01.030.

Machida, M. *et al.* (2005) 'Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*', *Nature*, 438(7071), pp. 1157–1161. doi: 10.1038/nature04300.

Maeda, H. *et al.* (2004) 'Transcriptional analysis of gene 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), pp. 74–83. doi: 10.1007/s00253-004-1608-4.

Mai, H. T. N., Lee, K. M. and Choi, S. S. (2016) 'Enhanced oxalic acid production from corncob by a methanol-resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid-state fermentation', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 51(1), pp. 9–15. doi: 10.1016/j.procbio.2015.11.005.

De Maio, A. (2014) 'Extracellular Hsp70 : export and function', *Current Protein and Peptide Science*, 15(3), pp. 225–231. doi: 10.2174/1389203715666140331113057.Abstract.

Mandari, V., Nema, A. and Devarai, S. K. (2020) 'Sequential optimization and large scale production of lipase using tri-substrate mixture from *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid state fermentation', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 89, pp. 46–54. doi: 10.1016/j.procbio.2019.10.026.

Martens, L. (2011) 'Bioinformatics challenges in mass spectrometry-driven proteomics', in K. Gevaert, J. V. (ed.) *Gel-Free Proteomics, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, pp. 359–371. doi: 10.1007/978-1-61779-148-2_24.

Martens, L. and Hermjakob, H. (2007) 'Proteomics data validation: Why all must provide data', *Molecular BioSystems*, 3(8), pp. 518–522. doi: 10.1039/b705178f.

Martínez-Burgo, Y. *et al.* (2014) 'Heterologous expression of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 cephamycin C gene cluster', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 186, pp. 21–29. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.06.002.

Matera, G. A. and Wang, Z. (2014) 'REVIEWS A day in the life of the spliceosome', *Nature*

- Reviews Molecular Cellular Biology*, 15(2), pp. 108–121. doi: 10.1038/nrm3742.
- Matthiesen, R. (2007) 'Methods, algorithms and tools in computational proteomics: A practical point of view', *Proteomics*, 7(16), pp. 2815–2832. doi: 10.1002/pmic.200700116.
- McLean, K. J. *et al.* (2015) 'Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of *Penicillium chrysogenum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), pp. 2847–2852. doi: 10.1073/pnas.1419028112.
- Medina, M. L., Kiernan, U. A. and Francisco, W. A. (2004) 'Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*', 41, pp. 327–335. doi: 10.1016/j.fgb.2003.11.014.
- Meijer, M. *et al.* (2011) 'Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli', *Studies in Mycology*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 69, pp. 19–30. doi: 10.3114/sim.2011.69.02.
- Mejia, R. (2011) 'Not All Genes Are Equal ; Shortage of Histones Affects Some Genes More Than Others', *Plos Biology*, 9(6), pp. 9–11. doi: 10.1371/journal.pbio.1001098.
- Melin, P., Schnürer, J. and Wagner, E. (2002) 'Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species', *Molecular Genetics and Genomics*, 267(6), pp. 695–702. doi: 10.1007/s00438-002-0695-0.
- Melnichuk, N. *et al.* (2020) 'Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation', *Waste Management*. Elsevier Ltd, 106, pp. 155–161. doi: 10.1016/j.wasman.2020.03.025.
- Meyer, V., Wu, B. and Ram, A. F. J. (2011) 'Aspergillus as a multi-purpose cell factory: Current status and perspectives', *Biotechnology Letters*, 33(3), pp. 469–476. doi: 10.1007/s10529-010-0473-8.
- Miller, G. L. *et al.* (1960) 'Measurement of Carboxymethylcellulase Activity', *Analytical*

- Biochemistry*, 132(2), pp. 127–132. doi: 10.1016/0003-2697(60)90004-X.
- Milne, J. L. S. and Institutes, N. (2013) *Structure and Regulation of Pyruvate Dehydrogenases*. 2nd edn, *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2nd edn. Edited by A. Press. Published by Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-378630-2.00079-7.
- Minárik, P. *et al.* (2002) 'Malate Dehydrogenases - Structure and function', *General Physiology and Biophysics*, 21(3), pp. 257–265.
- Miranda, R. U. *et al.* (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), pp. 85–93. doi: 10.1016/j.funbio.2012.12.001.
- Mishra, N. C. (2010) 'Introduction to Proteomics: Principles and Applications.', in *Introduction to Proteomics : Principles and Applications*.
- Mitchell, D. A., von Meien, O. F. and Krieger, N. (2003) 'Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors', *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), pp. 137–147. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00126-2.
- Mitchell Wells, J. and McLuckey, S. A. (2005) 'Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins', *Methods in Enzymology*, 402(1993), pp. 148–185. doi: 10.1016/S0076-6879(05)02005-7.
- Mohamed, S. A. *et al.* (2013) 'Solid state production of polygalacturonase and xylanase by *Trichoderma* species using cantaloupe and watermelon rinds', *Journal of Microbiology*, 51(5), pp. 605–611. doi: 10.1007/s12275-013-3016-x.
- Mollapour, M. *et al.* (2007) 'Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Targets the Yeast Fps1 Aquaglyceroporin for Endocytosis , Thereby Rendering Cells Resistant to Acetic Acid □', *Moleccular and Cellular Biology*, 27(18), pp. 6446–6456. doi: 10.1128/MCB.02205-06.
- Monod, M. *et al.* (2002) 'Secreted proteases from pathogenic fungi', *International Journal of Medical Microbiology*, 292(5–6), pp. 405–419. doi: 10.1078/1438-4221-00223.

Monteoliva, L. (2016) 'The Cell Wall Protein Ecm33 of *Candida albicans* is Involved in Chronological Life Span , Morphogenesis , Cell Wall Regeneration , Stress Tolerance , and Host – Cell Interaction', *Frontiers in Microbiology*, 7(64), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00064.

Montiel-González, A. M. *et al.* (2004) 'Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*', *Process Biochemistry*, 39(12), pp. 2085–2090. doi: 10.1016/j.procbio.2003.10.013.

Moore, B. *et al.* (2003) 'Role of the Arabidopsis Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling', *Science*, 300(5617), pp. 332–336.

Moran-Aguilar, M. G. *et al.* (2021) 'Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain', *Biochemical Engineering Journal*, 172, p. 108060. doi: 10.1016/j.bej.2021.108060.

Morris, S. (2006) 'Arginine: beyond protein', *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), pp. 508–512.

Mrudula, S. and Murugammal, R. (2011) 'Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate', *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), pp. 1119–1127. doi: 10.1590/S1517-83822011000300033.

Nadeem, H. *et al.* (2015) 'Microbial invertases : A review on kinetics , thermodynamics , physiochemical properties', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 50(8), pp. 1202–1210. doi: 10.1016/j.procbio.2015.04.015.

Nadler, W. M. *et al.* (2017) 'MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification', *Journal of Proteome Research*, 16(3), pp. 1207–1215. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00805.

Nandakumar, M. P. and 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), pp. 2216–2222. doi: 10.1002/1522-2683(200207)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y.

do Nascimento, F. V. *et al.* (2021) 'Insights into media supplementation in solid-state fermentation of soybean hulls by *Yarrowia lipolytica*: Impact on lipase production in tray and insulated packed-bed bioreactors', *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 166, p. 107866. doi: 10.1016/j.bej.2020.107866.

Nazareth, T. C. *et al.* (2020) 'The use of low-cost brewery waste product for the production of surfactin as a natural microbial biocide', *Biotechnology Reports*, 28. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00537.

Negi, S., Gupta, S. and Banerjee, R. (2011) 'Extraction and purification of glucoamylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single-stage fermentation', *Food Technology and Biotechnology*, 49(3), pp. 310–315.

Neifar, M. *et al.* (2016) '*Pseudomonas extremorientalis* BU118: a new salt-tolerant laccase-secreting bacterium with biotechnological potential in textile azo dye decolourization', 3 *Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 6(1). doi: 10.1007/s13205-016-0425-7.

Nelson, D. L. *et al.* (2009) *Principios de Bioquímica*. 5a. ed. Edited by Omega. Barcelona.

Nery, F. C. *et al.* (2004) 'Ki-1/57 Interacts with RACK1 and Is a Substrate for the Phosphorylation by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-activated Protein Kinase C', *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), pp. 11444–11455. doi: 10.1074/jbc.M306672200.

Nery, F. C. *et al.* (2006) 'Evidence for the interaction of the regulatory protein Ki-1/57 with p53 and its interacting proteins', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(3), pp. 847–855. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.036.

Neupane, P. *et al.* (2019) 'ATP Synthase : Structure , Function and Inhibition ATP : The Fuel for Life', *Biomolecular Concepts*, 10(1), pp. 1–10.

Niehaus, T. D. *et al.* (218AD) 'Evidence that the metabolite repair enzyme NAD (P) HX epimerase has a moonlighting function', *Bioscience Reports*, 38(3), p. BSR20180223. doi:

10.1042/BSR20180223.

Nielsen, K. F. *et al.* (2009) 'Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), pp. 1225–1242. doi: 10.1007/s00216-009-3081-5.

Oda, K. *et al.* (2006) 'Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), pp. 3448–3457. doi: 10.1128/AEM.72.5.3448.

Oda, K. (2012) 'New families of carboxyl peptidases: Serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases', *Journal of Biochemistry*, 151(1), pp. 13–25. doi: 10.1093/jb/mvr129.

Oh, Y. T. *et al.* (2010) 'Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*', *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier Inc., 47(3), pp. 246–253. doi: 10.1016/j.fgb.2009.11.002.

de Oliveira, B. H. *et al.* (2020) 'Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium* sp. (GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation', *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 147, p. 112235. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112235.

De Oliveira, J. *et al.* (2017) 'Gibberellic Acid Production by Different Fermentation Systems Using Citric Pulp as Substrate/Support', *BioMed Research International*, 2017, p. 8. doi: 10.1155/2017/5191046.

De Oliveira, J. and De Graaff, L. (2011) 'Proteomics of industrial fungi: Trends and insights for biotechnology', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), pp. 225–237. doi: 10.1007/s00253-010-2900-0.

Omeje, K. O. *et al.* (2020) 'Synthetic dyes decolorization potential of agroindustrial waste-derived thermo-active laccase from *Aspergillus* species', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 29, p. 101800. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101800.

Ooijkaas, L. P. *et al.* (2000) 'Defined media and inert supports: Their potential as solid-state fermentation production systems', *Trends in Biotechnology*, 18(8), pp. 356–360. doi:

10.1016/S0167-7799(00)01466-9.

Oostra, J. *et al.* (2001) 'Intra-Particle Oxygen Diffusion Limitation in Solid-State Fermentation', *Biotechnology and Bioengineering*, 75(1), pp. 13–24.

Owji, H. *et al.* (2018) 'A Comprehensive Review of Signal Peptides: Structure, Roles, and Applications', *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH., 97(6), pp. 422–441. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.06.003.

Palumbo, J. D., O'keeffe, T. L. and Abbas, H. K. (2008) 'Microbial interactions with mycotoxigenic fungi and mycotoxins', *Toxin Reviews*, 27(42067), pp. 261–285. doi: 10.1080/15569540802416301.

Pamarthy, S. *et al.* (2018) 'The curious case of vacuolar ATPase : regulation of signaling pathways', *Molecular Cancer*. Molecular Cancer, 17(41), pp. 1–9.

Pandey, A. (2003) 'Solid-state fermentation', 13(November 2001), pp. 81–84.

Pandey, A. K. and Negi, S. (2020) 'Enhanced cellulase recovery in SSF from *Rhizopus oryzae* SN5 and immobilization for multi-batch saccharification of carboxymethylcellulose', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 26(October 2019), p. 101656. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101656.

Pant, G. *et al.* (2015) ' Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis* ', *Journal of Taibah University for Science*. Taibah University, 9(1), pp. 50–55. doi: 10.1016/j.jtusci.2014.04.010.

Papadaki, E. *et al.* (2020) 'Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process', *Bioresource Technology*. Elsevier, 309, p. 123317. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123317.

Papagianni, M. (2004) 'Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes', 22, pp. 189–259. doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.09.005.

Parida, A. K., Das, A. B. and Mohanty, P. (2004) 'Investigations on the antioxidative defence

responses to NaCl stress in a mangrove , *Bruguiera parviflora* : Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes', *Plant Growth Regulation*, 42, pp. 213–226.

Park, Y., Yoon, S. and Lee, H. (2010) 'A novel diene lactone hydrolase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1 : Purification , characterization , and expression', *BBA - General Subjects*. Elsevier B.V., 1800(11), pp. 1164–1172. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.07.006.

Patel, A. K., Singhanian, R. R. and Pandey, A. (2017) *Biotechnology of Microbial Enzymes, Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9.

Patel, H. and Gupte, A. (2016) 'Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP', *Bioresources and Bioprocessing*. Springer Berlin Heidelberg, 3(1). doi: 10.1186/s40643-016-0088-6.

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

Patkar, R. N. *et al.* (2015) 'A fungal monooxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 11, pp. 733–740. doi: 10.1038/nchembio.1885.

Paul, J. S. *et al.* (2020) 'Production of biocatalyst α -amylase from agro-waste "rice bran" by using *Bacillus tequilensis* TB5 and standardizing its production process', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 26. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101648.

Paumard, P. *et al.* (2002) 'The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology', *The EMBO Journal*, 21(3), pp. 221–230.

Pedersen, M. *et al.* (2007) 'Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*', *Biotechnology Letters*, 29(5), pp. 743–748. doi: 10.1007/s10529-007-9314-9.

Pel, H. J. *et al.* (2007) 'Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory

Aspergillus niger CBS 513.88', *Nature Biotechnology*, 25(2), pp. 221–231. doi: 10.1038/nbt1282.

Pereira Scarpa, J. de C. *et al.* (2019) 'Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production', *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 141, p. 111795. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111795.

Pfliegler, W. P. *et al.* (2020) 'The Aspergilli and Their Mycotoxins: Metabolic Interactions With Plants and the Soil Biota', *Frontiers in Microbiology*, 10(February). doi: 10.3389/fmicb.2019.02921.

Phukon, L. C. *et al.* (2020) 'Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6', *Bioresource Technology*. Elsevier, 309, p. 123352. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123352.

Pierron, D. *et al.* (2012) 'Biochimica et Biophysica Acta Cytochrome c oxidase : Evolution of control via nuclear subunit addition ☆', *BBA - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1817(4), pp. 590–597. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.07.007.

Pili, J. *et al.* (2015) 'Utilization of Orange Peel, Corn Steep Liquor, and Parboiled Rice Water in the Production of Polygalacturonase from *Aspergillus Niger*', *Industrial Biotechnology*, 11(5), pp. 284–291. doi: 10.1089/ind.2015.0011.

Pitol, L. O. *et al.* (2017) 'Optimization studies to develop a low-cost medium for production of the lipases of *Rhizopus microsporus* by solid-state fermentation and scale-up of the process to a pilot packed-bed bioreactor', *Process Biochemistry*. Elsevier, 62, pp. 37–47. doi: 10.1016/j.procbio.2017.07.019.

Plascencia-Jatomea, M. *et al.* (2014) *Aspergillus spp. (Black Mold), Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-411552-1.00008-9.

Pobre, K. F. R., Poet, X. G. J. and Hendershot, X. L. M. (2019) 'The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions : Getting by with a little help from

ERdj friends', *Journal of Biological Chemistry*, 294(6), pp. 2098–2108. doi: 10.1074/jbc.REV118.002804.

Pomastowski, P. and Buszewski, B. (2014) 'Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier Ltd, 53, pp. 167–177. doi: 10.1016/j.trac.2013.09.010.

Prabaningtyas, R. K. *et al.* (2018) 'Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus Niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate', *Energy Procedia*. Elsevier B.V., 153, pp. 242–247. doi: 10.1016/j.egypro.2018.10.010.

Pranay, K., Padmadeo, S. R. and Prasad, B. (2019) 'Production of amylase from *Bacillus subtilis* sp. strain KR1 under solid state fermentation on different agrowastes', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 21, p. 101300. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101300.

Priyadarshini, S., Pradhan, S. K. and Ray, P. (2020) *Production, characterization and application of thermostable, alkaline α -amylase (AA11) from *Bacillus cereus* strain SP-CH11 isolated from Chilika Lake*, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.149.

Qiu, X. *et al.* (2020) 'Combining genetically-encoded biosensors with high throughput strain screening to maximize erythritol production in *Yarrowia lipolytica*', *Metabolic Engineering*. Elsevier Inc., 60(March), pp. 66–76. doi: 10.1016/j.ymben.2020.03.006.

Rabouille, C. (2017) 'Pathways of Unconventional Protein Secretion', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 27(3), pp. 230–240. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.007.

Raffa, N., Osherov, N. and Keller, N. P. (2019) 'Copper utilization, regulation, and acquisition by *Aspergillus fumigatus*', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), p. 1980. doi: 10.3390/ijms20081980.

Rahnama, N. *et al.* (2013) 'Effect of alkali pretreatment of rice straw on cellulase and

xylanase production by local trichoderma harzianum SNRS3 under solid state fermentation', *BioResources*, 8(2), pp. 2881–2896. doi: 10.15376/biores.8.2.2881-2896.

Raimbault, M. (1998) 'General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.PDF', *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), pp. 1–15. doi: 10.2225/vol1-issue3-fulltext-9.

Ramos, O. S. and Malcata, F. X. (2011) *Food-Grade Enzymes*. Second Edi, *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*. Second Edi. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00213-0.

Rani, R. *et al.* (2009) 'Recent advances in solid-state fermentation', 44, pp. 13–18. doi: 10.1016/j.bej.2008.10.019.

Rani, R. *et al.* (2010) 'Enzyme and Microbial Technology Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc., 46(7), pp. 541–549. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.010.

Rashad, M. M. and Nooman, M. U. (2009) 'Production , Purification and Characterization of Extracellular Invertase from *Saccharomyces Cerevisiae* NRRL Y-12632 by Solid-State Fermentation of Red Carrot Residue', 3(3), pp. 1910–1919.

Razali, S. A., Rasit, N. and Ooi, C. K. (2021) 'Statistical analysis of xylanase production from solid state fermentation of rice husk associated fungus *Aspergillus Niger*', *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd., 39(2), pp. 1082–1087. doi: 10.1016/j.matpr.2020.06.366.

Regula, R. G. T. *et al.* (2005) 'Analysis of the major proteins secreted by the human opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro conditions', *Medical Mycology*, 43(7), pp. 623–630. doi: 10.1080/13693780500089216.

Rehm, J., Willmitzer, L. and Heyer, A. G. (1998) 'Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*', *Journal of Bacteriology*, 180(5), pp. 1305–1310.

Reichard, U. *et al.* (2006) 'Sedolisins , a New Class of Secreted Proteases from *Aspergillus fumigatus* with Endoprotease or Tripeptidyl-Peptidase Activity at Acidic pHs', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), pp. 1739–1748. doi: 10.1128/AEM.72.3.1739.

Reindl, M. *et al.* (2019) 'A potential lock-type mechanism for unconventional secretion in fungi', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). doi: 10.3390/ijms20030460.

Reinis, F. *et al.* (2014) 'Effect of Temperature , Water Activity , and pH on Growth and Production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes', *Journal of Food Protection*, 77(11), pp. 1947–1952. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-495.

dos Reis, L. *et al.* (2013) 'Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 146, pp. 597–603. doi: 10.1016/j.biortech.2013.07.124.

Reyes-Ocampo, I., González-Brambila, M. and López-Isunza, F. (2013) 'An analysis of the metabolism of *Aspergillus niger* growing over a solid substrate', *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), pp. 41–56.

Robledo-Olivo, A. *et al.* (2009) 'Induction and Repression Kinetics of Fungal Beta-Fructofuranosidase in Submerged Culture', *International Journal of Food Engineering*, 5(2). doi: 10.2202/1556-3758.1224.

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

Rossi, S. C. *et al.* (2009) 'Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 42(4), pp. 484–486. doi: 10.1016/j.foodres.2009.01.016.

Rouwenhorst, R. J. *et al.* (1988) 'Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556', *Applied and Environmental*

Microbiology, 54(5), pp. 1131–1137. doi: 10.1128/aem.54.5.1131-1137.1988.

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

Ruiz, B. *et al.* (2010) 'Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source', *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), pp. 146–167. doi: 10.3109/10408410903489576.

Sadygov, R. G., Cociorva, D. and Yates, J. R. (2004) 'Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book', *Nature Methods*, 1(3), pp. 195–202. doi: 10.1038/nmeth725.

Sales de Menezes, L. H. *et al.* (2021) 'Artificial neural network hybridized with a genetic algorithm for optimization of lipase production from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid-state fermentation', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101885.

Salgado-Bautista, D. *et al.* (2020) 'Solid-state fermentation increases secretome complexity in *Aspergillus brasiliensis*', *Fungal Biology*, 124(8), pp. 723–734. doi: 10.1016/j.funbio.2020.04.006.

Samland, A. K. *et al.* (2012) 'Conservation of structure and mechanism within the transaldolase enzyme family', *FEBS Journal*, 279(5), pp. 766–778. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08467.x.

Samson, R. A. *et al.* (2007) 'Diagnostic tools to identify black aspergilli', *Studies in Mycology*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 59, pp. 129–145. doi: 10.3114/sim.2007.59.13.

Saqib, A. A. N. *et al.* (2010) 'Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF)', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 45(5), pp. 641–646. doi: 10.1016/j.procbio.2009.12.011.

Saravanan, A. *et al.* (2020) 'Production of pigment using *Aspergillus tamarii*: New potentials for synthesizing natural metabolites', *Environmental Technology and Innovation*. Elsevier B.V., 19, p. 100967. doi: 10.1016/j.eti.2020.100967.

Saritha, M. *et al.* (2016) 'Do cultural conditions induce differential protein expression: Profiling of extracellular proteome of *Aspergillus terreus* CM20', *Microbiological Research*. Elsevier GmbH., 192, pp. 73–83. doi: 10.1016/j.micres.2016.06.006.

Saucedo-Castañeda, G. *et al.* (1994) 'On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations', *Process Biochemistry*, 29(1), pp. 13–24. doi: 10.1016/0032-9592(94)80054-5.

Saykhedkar, S. S. and Singhal, R. S. (2004) 'Solid-state fermentation for production of griseofulvin on rice bran using *Penicillium griseofulvum*', *Biotechnology Progress*, 20(4), pp. 1280–1284. doi: 10.1021/bp0343662.

Schaftingen, E. Van (2021) 'Hexokinase/Glucokinase ☆', *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 3rd edn, 1, pp. 149–161. doi: 10.1016/B978-0-12-819460-7.00034-7.

Schertl, P., Danne, L. and Braun, H. (2017) '3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase is involved in both , Valine and Isoleucine degradation in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Physiology*, 175(1). doi: 10.1104/pp.17.00649.

Schmidt, A., Forne, I. and Imhof, A. (2014) 'Bioinformatic analysis of proteomics data', *BMC systems biology*, 8(Suppl 2). doi: 10.1186/1752-0509-8-S2-S3.

Schweizer, F. and Goossens, A. (2016) 'Jasmonates : signal transduction components and their roles in environmental stress responses', *Plant Molecular Biology*, 91, pp. 673–689. doi: 10.1007/s11103-016-0480-9.

Senzel, L., Gnatenko, D. V. and Bahou, W. F. (2009) 'The platelet proteome', *Current Opinion in Hematology*, 16(5), pp. 329–333. doi: 10.1097/MOH.0b013e32832e9dc6.

Sethi, B. K. *et al.* (2016) 'Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCF 4269.10 using chickling vetch peels', *Journal of Taibah University for Science*. Taibah

University, 10(4), pp. 571–583. doi: 10.1016/j.jtusci.2015.11.001.

Shah, P. *et al.* (2009) 'A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture', *Proteomics*, 9(11), pp. 3126–3135. doi: 10.1002/pmic.200800933.

Shaligram, N. S. *et al.* (2008) 'Compactin production in solid-state fermentation using orthogonal array method by *P. brevicompactum*', *Biochemical Engineering Journal*, 41(3), pp. 295–300. doi: 10.1016/j.bej.2008.05.011.

Sharma Ghimire, P. and Jin, C. (2017) 'Genetics, Molecular, and Proteomics Advances in Filamentous Fungi', *Current Microbiology*. Springer US, 74(10), pp. 1226–1236. doi: 10.1007/s00284-017-1308-9.

Sharma, R., Oberoi, H. S. and Dhillon, G. S. (2016) *Fruit and Vegetable Processing Waste: Renewable Feed Stocks for Enzyme Production, Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-802392-1.00002-2.

Sharma, R., Singh, J. and Verma, N. (2020) 'Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 and *Bacillus subtilis* BR-15', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 25, p. 101575. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101575.

She, Y. *et al.* (2010) 'Mass Spectrometry Following Mild Enzymatic Digestion Reveals Phosphorylation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Through Mechanisms Involving Direct Nucleotide Binding', *Journal of Proteome*, 9(6), pp. 3311–3318.

Shepard, P. J. and Hertel, K. J. (2009) 'The SR protein family.', *Genome biology*, 10(10), p. 242. doi: 10.1186/gb-2009-10-10-242.

Shevchenko, A. *et al.* (2007) 'In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes', *Nature Protocols*, 1(6), pp. 2856–2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468.

Shoubridge, E. . (2001) 'Cytochrome c oxidase deficiency', *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*, 106, pp. 46–52. doi: 10.1002/ajmg.1378.

Shteynberg, D. *et al.* (2013) 'Combining Results of Multiple Search Engines in Proteomics', *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(9), pp. 2383–2393. doi: 10.1074/mcp.R113.027797.

Siala, R. *et al.* (2012) 'Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design', *The Scientific World Journal*, 2012. doi: 10.1100/2012/564932.

Silva, D. F. *et al.* (2018) 'Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 67, pp. 29–37. doi: 10.1016/j.procbio.2018.02.008.

da Silva, F. L. *et al.* (2018) 'Valorization of an agroextractive residue—Carnauba straw—for the production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation (SSF)', *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 127(29), pp. 661–669. doi: 10.1016/j.renene.2018.05.025.

Singh, P. and Gill, P. K. (2006) 'Production of inulinases: Recent advances', *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), pp. 151–162.

Singh, R. S. *et al.* (2018) 'Solid-state fermentation of carrot pomace for the production of inulinase by *Penicillium oxalicum* BGPUP-4', *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), pp. 31–39. doi: 10.1713/ftb.56.01.18.5411.

Singh, R. S. *et al.* (2020) 'Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace', *Bioresource Technology Reports*. Elsevier, 9, p. 100364. doi: 10.1016/j.biteb.2019.100364.

Singh, R. S. and Chauhan, K. (2017) 'Inulinase production from a new inulinase producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier, 9, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.bcab.2016.10.012.

Singh, R. S., Chauhan, K. and Singh, R. P. (2017) 'Enzymatic Approaches for the Synthesis of High Fructose Syrup', in Gahlawat, S. K. *et al.* (eds) *Plant Biotechnology: Recent*

Advancements and Developments. Springer Singapore, pp. 1–390. doi: 10.1007/978-981-10-4732-9.

Singh, R. S. and Singh, R. P. (2017) 'Inulinases', *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, pp. 423–446. doi: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00018-X.

Singh, R. S., Sooch, B. S. and Puri, M. (2007) 'Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1', *Bioresource Technology*, 98(13), pp. 2518–2525. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.011.

Singh, S. and Gupta, A. (2014) 'Comparative fermentation studies on amylase production by *Aspergillus flavus* TF-8 using Sal (*Shorea robusta*) deoiled cake as natural substrate: Characterization for potential application in detergency', *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 57, pp. 158–165. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.03.035.

Singhania, R. R. *et al.* (2014) 'Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *penicillium janthinellum* cellulases', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 169, pp. 490–495. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.011.

Singhania, R. R. *et al.* (2015) *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-63453-5.00015-X.

Sleno, L. and Volmer, D. A. (2004) 'Ion activation methods for tandem mass spectrometry', *Journal of Mass Spectrometry*, 39(10), pp. 1091–1112. doi: 10.1002/jms.703.

Socol, C. R. *et al.* (2017) 'Recent developments and innovations in solid state fermentation', *Biotechnology Research and Innovation*. Sociedade Brasileira de Biotecnologia, 1(1), pp. 52–71. doi: 10.1016/j.biori.2017.01.002.

Solís-Pereira, S. *et al.* (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), pp. 36–41. doi: 10.1007/BF00166845.
- Solis-Pereyra, S. *et al.* (1996) 'Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(3), pp. 257–260. doi: 10.1007/BF00360924.
- Sondhi, S. and Saini, K. (2019) 'Response surface based optimization of laccase production from *Bacillus sp.* MSK-01 using fruit juice waste as an effective substrate', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 5(5), p. e01718. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01718.
- Souza, P. M. *et al.* (2015) 'A biotechnology perspective of fungal proteases', *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), pp. 337–346. doi: 10.1590/S1517-838246220140359.
- Stefanelli, G. *et al.* (2018) *Epigenetic mechanisms of learning and memory*, *Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-804078-2.00015-5.
- Steiger, M. G. *et al.* (2019) 'Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*', *Metabolic Engineering*. Elsevier Inc., 52, pp. 224–231. doi: 10.1016/j.ymben.2018.12.004.
- Stincone, A. *et al.* (2015) 'The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway', *Biological Reviews*, 90(3), pp. 927–963. doi: 10.1111/brv.12140.
- Ström, K., Schnürer, J. and Melin, P. (2005) 'Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression', *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), pp. 119–124. doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.047.
- Su, C. *et al.* (2004) 'DNA damage induces downregulation of histone gene expression through the G 1 checkpoint pathway', *The EMBO Journal*, 23(5), pp. 1133–1143. doi: 10.1038/sj.emboj.7600120.
- Subramaniam, R. and Vimala, R. (2012) 'SOLID STATE AND SUBMERGED

FERMENTATION FOR THE PRODUCTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES: A COMPARATIVE STUDY', *International Journal of science and Nature*, 3(3), pp. 480–486.

Suelmann, R., Sievers, N. and Fischer, R. (1997) 'Nuclear traffic in fungal hyphae: In vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*', *Molecular Microbiology*, 25(4), pp. 757–769. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5131873.x.

Sultana, A. *et al.* (2004) 'Structure of the polyketide cyclase SnoaL reveals a novel mechanism for enzymatic aldol condensation', *EMBO Journal*, 23(9), pp. 1911–1921. doi: 10.1038/sj.emboj.7600201.

Sulyman, A. O., Igunnu, A. and Malomo, S. O. (2020) 'Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 6(12), p. e05668. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05668.

Sützl, L. *et al.* (2018) 'Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family', *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), pp. 2477–2492.

Svanström, Å. *et al.* (2013) 'The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi'.

Swaney, D. L., Wenger, C. D. and Coon, J. J. (2010) 'Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics', *Journal of Proteome Research*, 9(3), pp. 1323–1329. doi: 10.1021/pr900863u.

Szabo, Z. and Janaky, T. (2015) 'Challenges and developments in protein identification using mass spectrometry', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., 69, pp. 76–87. doi: 10.1016/j.trac.2015.03.007.

Tacin, M. V. *et al.* (2019) 'Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus sp.* from Amazon', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 17, pp. 369–378. doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.013.

Tamayo, E. N. *et al.* (2008) 'CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which

- controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*', *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), pp. 984–993. doi: 10.1016/j.fgb.2008.03.002.
- Tanner, M. E. (2002) 'Understanding Nature ' s Strategies for Enzyme-Catalyzed Racemization and Epimerization Racemization at an Activated Center:', *Accounts of Chemical Research*, 35(4), pp. 237–246.
- Thibault, J. *et al.* (2000) 'Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and K L a in solid-state fermentation', *Process Biochemistry*, 36(1–2), pp. 9–18.
- Thomas, L., Larroche, C. and Pandey, A. (2013) 'Current developments in solid-state fermentation', *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 81, pp. 146–161. doi: 10.1016/j.bej.2013.10.013.
- Timoumi, A. *et al.* (2017) 'Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), pp. 351–366. doi: 10.1007/s00253-016-7856-2.
- Tram, G. *et al.* (2021) *Streptococcus suis pathogenesis — A diverse array of virulence factors for a zoonotic lifestyle*. 1st edn, *Advances in Microbial Physiology*. 1st edn. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/bs.ampbs.2020.12.002.
- Trivedi, S., Divecha, J. and Shah, A. (2012) 'Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 90(1), pp. 483–490. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.068.
- Tsang, A. *et al.* (2009) 'Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome', *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier Inc., 46(1), pp. S153–S160. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.014.
- Tsiatsiani, L. and Heck, A. J. R. (2015) 'Proteomics beyond trypsin', *FEBS Journal*, 282(14), pp. 2612–2626. doi: 10.1111/febs.13287.
- Umekawa, M. *et al.* (2017) 'Ecm33 is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast', *FEBS Letters*, 591(22), pp. 3721–3729. doi:

10.1111/ijlh.12426.

Valle, M. (2017) “ Pyruvate Carboxylase , Structure and Function ”, *Subcellular Biochemistry*. 30th edn. Edited by J. M.-W. J.R. Harris. Switzerland: Springer International Publishing, 83, pp. 291–322. doi: 10.1007/978-3-319-46503-6.

Varga, J. *et al.* (2007) ‘Aspergillus brasiliensis sp. nov., a biseriate black Aspergillus species with world-wide distribution’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), pp. 1925–1932. doi: 10.1099/ijls.0.65021-0.

Varga, J., Frisvad, J. C. and Samson, R. A. (2011) ‘Two new aflatoxin producing species, and an overview of Aspergillus section Flavi’, *Studies in Mycology*, 69, pp. 57–80. doi: 10.3114/sim.2011.69.05.

Vasanthakumar, T. and Rubinstein, J. L. (2020) ‘Structure and Roles of V-type ATPases’, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 45(4), pp. 295–307. doi: 10.1016/j.tibs.2019.12.007.

Vasara, T. *et al.* (2002) ‘Characterisation of two 14-3-3 genes from Trichoderma reesei : interactions with yeast secretory pathway components’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1590(1–3), pp. 27–40.

Venkata Dasu, V., Panda, T. and Chidambaram, M. (2003) ‘Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi’s method’, *Process Biochemistry* *Process Biochemistry*, 38(6), pp. 877–880. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00068-7.

Viniegra-González, G. *et al.* (2003) ‘Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems’, *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), pp. 157–167. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00128-6.

Viniegra-González, G. and Favela-Torres, E. (2006) ‘Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression?’, *Food Technology and Biotechnology*, pp. 397–406.

Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

33748769291&partnerID=tZOtx3y1.

Vivek-Ananth, R. P. *et al.* (2018) 'Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species', *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-018-25016-4.

Volke-Sepulveda, T. *et al.* (2016) 'Secretomic Insight into Glucose Metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in Solid-State Fermentation', *Journal of Proteome Research*, 15(10), pp. 3856–3871. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00663.

Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M. and Favela-Torres, E. (2003) 'Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*', *Bioresource Technology*, 87(1), pp. 81–86. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00207-9.

Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M. and Favela-Torres, E. (2006) 'Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis', *Bioresource Technology*, 97(14), pp. 1583–1591. doi: 10.1016/j.biortech.2005.07.026.

Vries, R. P. De *et al.* (2017) *Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus Aspergillus*. doi: 10.1186/s13059-017-1151-0.

Vuyst, L. De, Vin, F. De and Brussel, V. U. (2007) 'Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria', *Comprehensive Glycoscience*. Edited by H. Kamerling. Elsevier, pp. 477–519.

Waegelé, B. *et al.* (2009) 'CRONOS: The cross-reference navigation server', *Bioinformatics*, 25(1), pp. 141–143. doi: 10.1093/bioinformatics/btn590.

Wahl, M. C., Will, C. L. and Lührmann, R. (2009) 'Review The Spliceosome : Design Principles of a Dynamic RNP Machine', *Cell*, 136, pp. 701–718. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.009.

Walker, J. M. (2009) *Statistical Analysis in Proteomics IN Series Editor*.

Wang *et al.* (2021) 'Oxidative phosphorylation system as the target of glycinin basic peptide

against *Aspergillus niger*', *Lwt-Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 150(June), p. 111977. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111977.

Wang, B. *et al.* (2010) 'Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing', *Nucleic Acids Research*, 38(15), pp. 5075–5087. doi: 10.1093/nar/gkq256.

Wang, Y. *et al.* (2008) 'Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression', *Fungal Genetics and Biology*, 45(1), pp. 17–27. doi: 10.1016/j.fgb.2007.09.012.

Wang, Z. *et al.* (2020) 'Efficient ethanol production from paper mulberry pretreated at high solid loading in Fed-nonisothermal-simultaneous saccharification and fermentation', *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 160, pp. 211–219. doi: 10.1016/j.renene.2020.06.128.

Ward, O. P. *et al.* (2006) 'Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*', *ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY*, 58(05), pp. 1–75. doi: 10.1016/S0065-2164(05)58001-8.

Wein, S. P. *et al.* (2012) 'Improvements in the protein identifier cross-reference service', *Nucleic Acids Research*, 40(W1), pp. 276–280. doi: 10.1093/nar/gks338.

Wells, T. and Ragauskas, A. J. (2012) 'Biotechnological opportunities with the β -ketoadipate pathway', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 30(12), pp. 627–637. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.09.008.

Wilm, M. (2011) 'Principles of electrospray ionization', *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(7), pp. 1–8. doi: 10.1074/mcp.M111.009407.

Wittig, I. and Schägger, H. (2008) 'Structural organization of mitochondrial ATP synthase', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1777(7–8), pp. 592–598. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.04.027.

Wohlfahrt, G. *et al.* (2004) 'The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 260, pp. 69–83. doi: 10.1023/B.

Wolffe, A. P. and Hayes, J. J. (1999) 'Chromatin disruption and modification', *Nucleic Acids*

Research, 27(3), pp. 711–720.

Wu, G. (2009) 'Amino acids: metabolism, functions, and nutrition', *Amino Acids*, 37, pp. 1–17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.

Xiong, S., Fan, J. and Kitazato, K. (2010) 'The antiviral protein cyanovirin-N: The current state of its production and applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), pp. 805–812. doi: 10.1007/s00253-010-2470-1.

Yadav, Sangeeta *et al.* (2008) 'Purification and characterisation of an acidic pectin lyase produced by *Aspergillus ficuum* strain MTCC 7591 suitable for clarification of fruit juices', *Annals of Microbiology*, 58(1), pp. 61–65.

Yadav, Sangeeta *et al.* (2009) 'Pectin lyase : A review', *Process Biochemistry*, 44(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.procbio.2008.09.012.

Yao, W. *et al.* (2015) 'Assembly of the Arp5 Subunit Involved in Distinct INO80 Chromatin-Remodeling Activities'. doi: 10.1074/jbc.M115.674887.

Yemendzhiev, H., Gerginova, M. and Alexieva, Z. (2009) 'Biochemical and genetic studies of phenol biodegradation by *aspergillus awamori* strain', *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 62(9), pp. 1089–1093.

Yoon, L. W. *et al.* (2014) 'Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 67, pp. 319–338. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.05.013.

Yuan, X. L. *et al.* (2006) 'Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*', *Microbiology*, 152(10), pp. 3061–3073. doi: 10.1099/mic.0.29051-0.

Zafar, M. *et al.* (2020) 'HPLC based characterization of citric acid produced from indigenous fungal strain through single and Co-Culture fermentation', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 29, p. 101796. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101796.

Zhang, B. *et al.* (2012) 'Secretome of *Aspergillus oryzae* in Shaoxing rice wine koji',

International Journal of Food Microbiology. Elsevier B.V., 155(3), pp. 113–119. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.014.

Zhang, C. *et al.* (2020) 'Enhanced direct fermentation from food waste to butanol and hydrogen by an amylolytic *Clostridium*', *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 153, pp. 522–529. doi: 10.1016/j.renene.2020.01.151.

Zhang, F. *et al.* (2014) 'Proteomic profile of *Aspergillus flavus* in response to water activity', *Fungal Biology*. Elsevier Ltd, 119(2–3), pp. 114–124. doi: 10.1016/j.funbio.2014.11.005.

Zhang, H. and Li, X. (2018) *FGFs in Injury Repair and Regeneration, Fibroblast Growth Factors*. Edited by Academic Press. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-816142-5.00002-3.

Zhang, Z. *et al.* (2014) 'High-throughput proteomics', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7, pp. 427–454. doi: 10.1146/annurev-anchem-071213-020216.

Zheng, J. yong *et al.* (2019) 'High-level expression and characterization of a stereoselective lipase from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris*', *Protein Expression and Purification*. Elsevier, 155, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.pep.2018.10.012.

Zheng, L. *et al.* (2020) 'Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation', *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier, 122. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108990.

Zhou, S. *et al.* (2020) 'Use of acetate for the production of 3-hydroxypropionic acid by metabolically-engineered *Pseudomonas denitrificans*', *Bioresource Technology*. Elsevier, 307, p. 123194. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123194.

13. ANEXOS

13.1. Anexo 1

Tabla A1.1. Producción de ácidos orgánicos por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

Producto	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción		Referencia
				CMS: mg/g	CMLSSS: g/L	
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>		Cáscara de yuca	4.9 g/L		(Ajala <i>et al.</i> , 2020)
Ácido cítrico	Consortio de <i>Aspergillus niger-Rhizopus stolonifer</i> ^a		Cáscara de naranja	7.7 g/L		(Zafar <i>et al.</i> , 2020)
Ácido cítrico	<i>Aspergillus awamori</i>	CMS	Salvado de trigo: bagazo de caña de azúcar	106.8		(Dezam <i>et al.</i> , 2017)
Ácido giberélico	<i>Fusarium moniliforme</i>		Pulpa de naranja	7.6		(De Oliveira <i>et al.</i> , 2017)
Ácido láctico	<i>Rhizopus oryzae</i>		Residuos de <i>Sophora flavescens</i>	40.8 g/L		(Ma <i>et al.</i> , 2020)
Ácido oxálico	<i>Aspergillus niger</i> ^b		Olote de maíz	123.0 mg/g		(Mai, Lee and Choi, 2016)
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	CMLSSS *	Pulpa de cítricos y cáscara de soja	0.3		(Camara <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Gibberella fujikuroi</i>		Pulpa de naranja	0.3		(De Oliveira <i>et al.</i> , 2017)
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>		Cáscara de yuca	1.7		(Ajala <i>et al.</i> , 2020)
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>		Pulpa de naranja	0.2		(De Oliveira <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>		Licor de maíz/bagazo de mandioca	31.6		(Carpinelli Macedo <i>et al.</i> , 2020)
Ácido láctico	<i>Bacillus coagulans</i>	CML	Hidrolizados de residuos de panadería y jugo de alfalfa	62.2		(Alexandri <i>et al.</i> , 2020)
Ácido succínico	<i>Actinobacillus succinogenes</i> ^a		Glucosa	17.5		(Gonzales <i>et al.</i> , 2020)
Ácido 3-hidroxipropiónico	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ^b		Acetato de sodio	1.7		(Zhou <i>et al.</i> , 2020)

* CMLSSS: cultivo en medio líquido con sustratos sólidos suspendidos. a: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. b: microorganismo modificado (mutante).

Tabla A1.2. Producción de antibióticos y fármacos por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

Producto	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción	Referencia
Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i> ^a	CMS	Salvado de trigo	8.7 mg/gss	(Al-Saman et al. 2021)
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i> ^a		Salvado de arroz suplementado con sacarosa	9732.4 µg/g	(Saykhedkar and Singhal, 2004)
Compactina	<i>Penicillium brevicompactum</i> ^a		Salvado de trigo y residuos de coco	815 ug/g	(Shaligram et al., 2008)
Cefamicina C	<i>Nocardia lactamdurans</i>	CMS	Harina de soja	15.8 mg/g	(Kagliwal, Survase and Singhal, 2009)
Tetraciclina	<i>Streptomyces</i> sp.		Cáscaras de maní	13.2 mg/g	(Asagbra, Sanni and Oyewole, 2005)
Ciclosporina A	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Maltosa	31.2 mg/L	(Ismail, 2017)
Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i> ^b		Almidón soluble	952.7 mg/L	(Jia et al., 2010)
Ciclosporina A	<i>Penicillium fellutanum</i>		Glucosa	16.2 µg/mL	(Anjum, Azam and Irum, 2012)
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i> ^a	CML	Sacarosa	1.2 g/L	(Venkata Dasu, Panda and Chidambaram, 2003)
Compactina	<i>Penicillium citrinum</i> ^{a,b}		Glucosa y glicerol	456.0 mg/L	(Chakravarti and Sahai, 2002)
Pravastatina	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^{a,b}		Glucosa	6.0 g/L	(McLean et al., 2015)
Cefamicina C	<i>Streptomyces clavuligerus</i>		Sacarosa y glicerol	3640.0 ug/mL	(Martínez-Burgo et al., 2014)

a: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. b: microorganismo modificado (mutante).

Tabla A1.3. Producción de biocombustibles por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

Producto	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción (g/L)	Referencia
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Astillas de morera de papel	63.9	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
Etanol *	Asociación: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Scheffersomyces stipitis</i> , y <i>Schwanniomyces occidentalis</i> .	CMS	Residuos de frutas y vegetales	0.3	(Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2019)
Etanol	<i>Kluyveromyces marxianus</i>		Residuos de paja de carnauba	7.5	(da Silva <i>et al.</i> , 2018)
Butanol	<i>Clostridium</i> sp.		Desechos de comida	16.6	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
Butanol	<i>Clostridium Beijerinckii</i> ^a		Bambú	6.5	(Kumar, Gujjala and Banerjee, 2017)
Acetona	Asociación: <i>Clostridium beijerinckii</i> -	CML		1.7	
Butanol	<i>Bacillus subtilis</i> ^b		Glucosa	4.8	(Cui <i>et al.</i> , 2020)
Isopropanol				0.9	
Biodiesel	<i>Rhodospiridium toruloides</i>		Cáscara de naranja y glicerol	18.1	(Carota <i>et al.</i> , 2020)

*: Resultados reportados en términos de mL de producto por g de sustrato (mL/g). a: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. b: microorganismo modificado (mutante).

Tabla A1.4. Producción de otros metabolitos por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

Producto	Microorganismo	Cultivo	Sustrato	Producción	
				CMS: mg/g	Referencia
Quercetina				0.2	
Isómero de catequina	<i>Aspergillus niger</i>		Cáscara de manzana	0.6	(Gulsunoglu <i>et al.</i> , 2020)
Eriodictiol				6.4	
Isómero de catequina				1.4	
Eriodictiol	<i>Aspergillus tubingensis</i>		Cáscara de manzana	0.8	(Gulsunoglu <i>et al.</i> , 2020)
Ácido gálico				1.0	
Catequina				0.4	
Epicatequina	<i>Aspergillus niger</i>	CMS	Harina de hoja de moringa	0.1	(Feitosa <i>et al.</i> , 2020)
Galato de epigalocatequina					
Quercetina	<i>Monascus anka</i>		Hojas de morera	5.3	(Guo <i>et al.</i> , 2020)
Kaempferol				1.9	
Ácido 5-O-cafeoilquínico	<i>Lactobacillus helveticus</i> ^a		Haba de soja	11.4	(Akpabli-Tsigbe <i>et al.</i> , 2021)
Aromas afrutados*	<i>Ceratocystis fimbriata</i>		Pulpa de cítricos y melaza de caña de azúcar	99.6	(Rossi <i>et al.</i> , 2009)
Pigmentos	<i>Aspergillus tamarii</i>		Glucosa	2.5 mg/L	(Saravanan <i>et al.</i> , 2020)
Eritritol	<i>Yarrowia lipolytica</i> ^b		Glucosa	148.0	(Qiu <i>et al.</i> , 2020)
Polihidroxialcanoato	<i>Bacillus megaterium</i> ^a	CML	Cáscara de raji y residuos de ajonjolí	0.4	(Israni and Shivakumar, 2020)
Surfactina			Residuos de mosto cervecero	0.2	(Nazareth <i>et al.</i> , 2020)
Lipopéptidos			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ^a	Glicerol	2.0
Lipopéptidos	<i>Bacillus subtilis</i> ^a		Glucosa	2.4	(Sharma, Singh and Verma, 2020)

*: Resultados reportados en términos de μmol de producto por L de espacio vacío del reactor por g de sustrato ($\mu\text{mol}/\text{L g}$). a: Resultados reportados con condiciones de cultivo optimizadas. b: microorganismo modificado (mutante).

13.2. Anexo 2

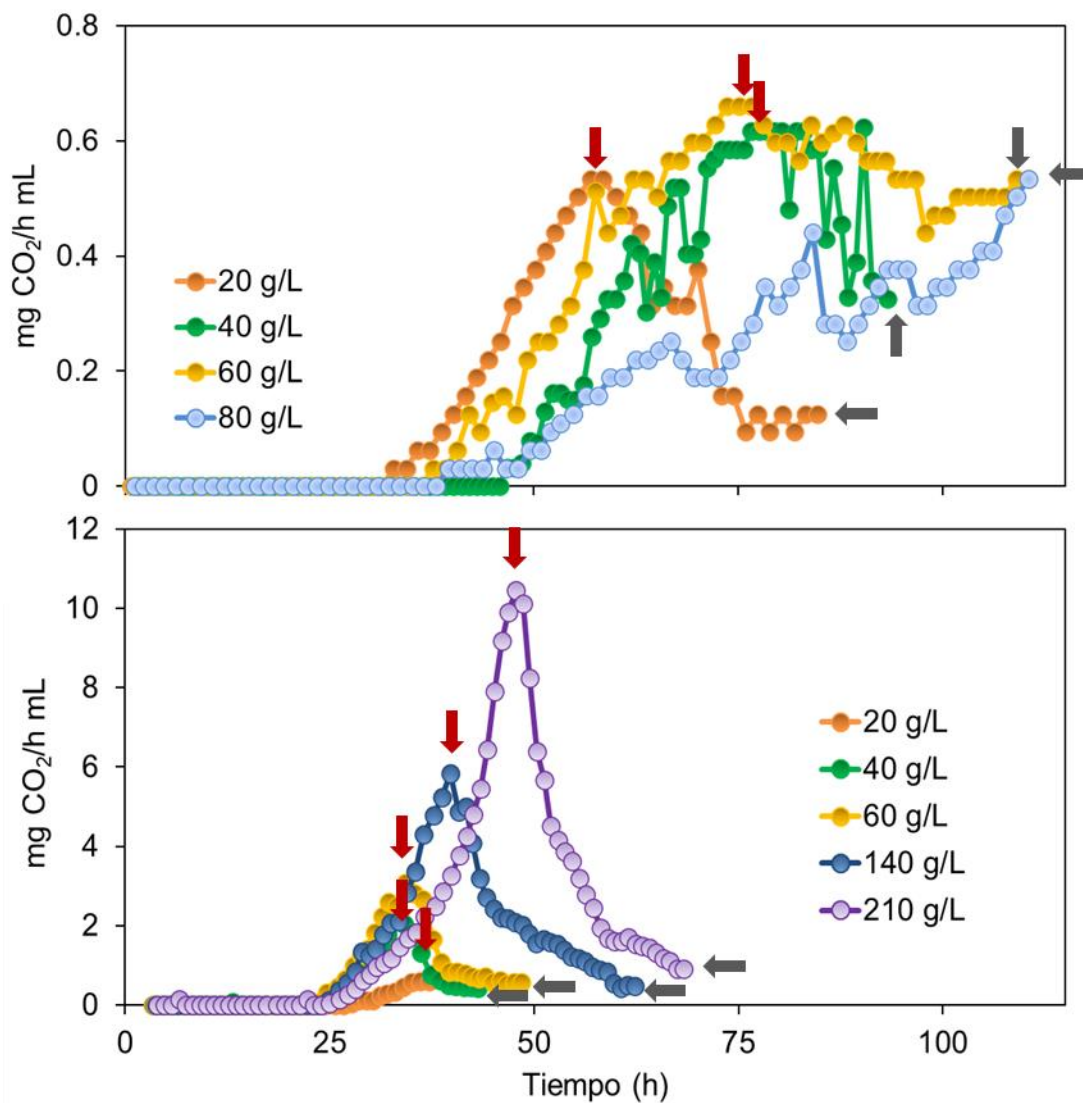


Figura A2. Tasa de producción de CO₂ de *A. brasiliensis* cultivado en CMS y CML. Las flechas rojas son el indicador del tiempo en el que se alcanza la tasa de máxima de producción de CO₂ en cada sistema de cultivo (tiempo de muestreo en cultivos para análisis del proteoma). Las flechas grises son el indicador del tiempo final del cultivo (tiempo de muestreo en cultivos para caracterizar el crecimiento de *A. brasiliensis* y la producción de inulinasa e invertasa en CMS y CML).

13.3. Anexo 3

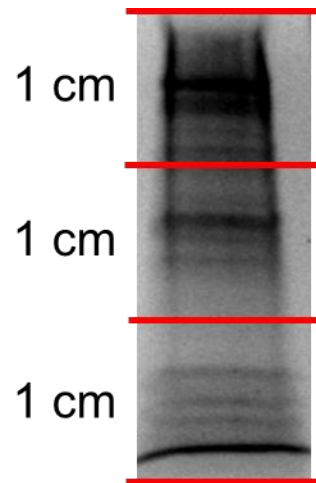


Figura A3. Ejemplo de corte de cada carril de los geles SDS-PAGE previo a su digestión trípica.

13.4. Anexo 4

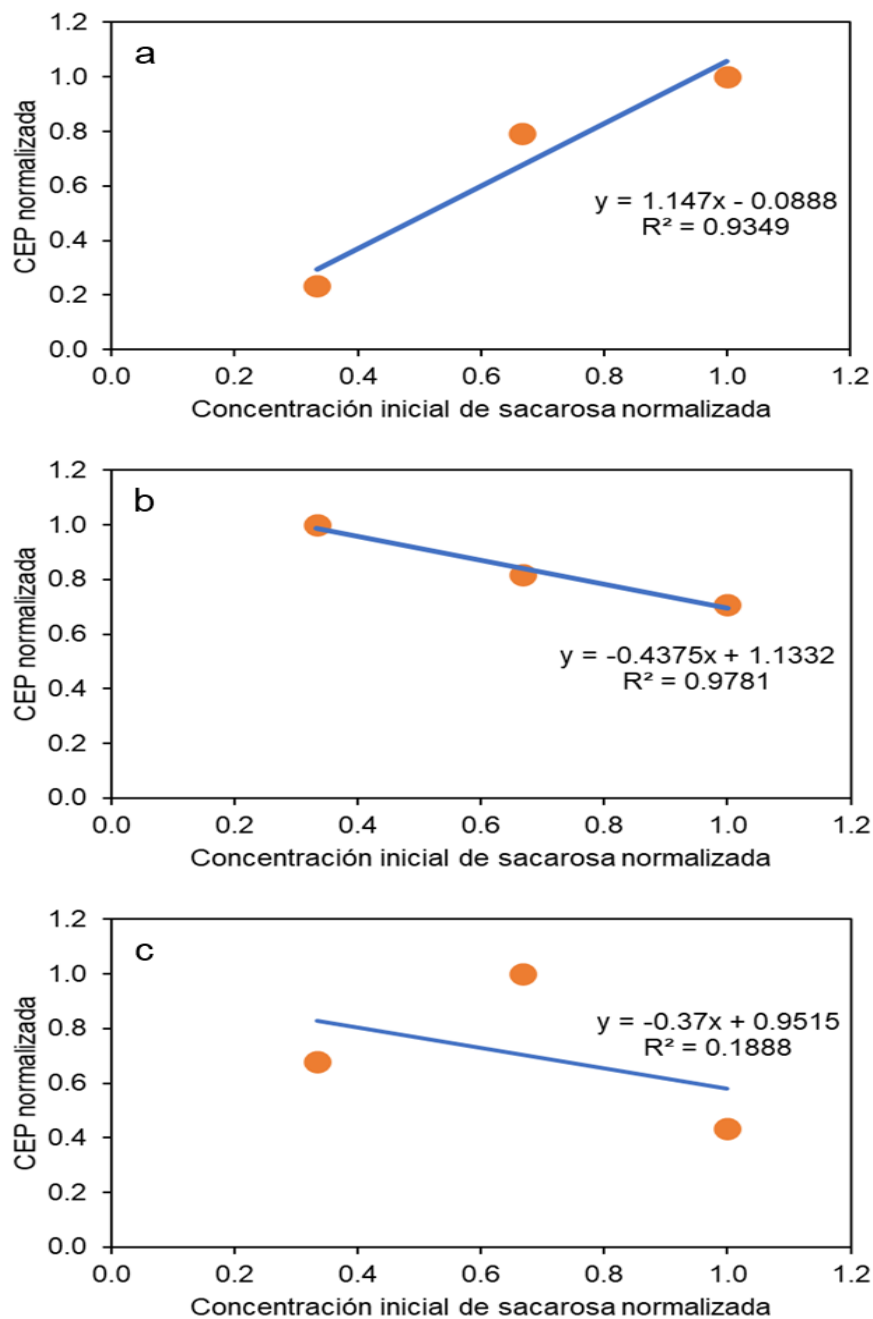


Figura A4. Ejemplo del procedimiento seguido para identificar la regulación y el nivel de regulación de las proteínas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS y CML. a) Invertasa, R^2 0.93; pendiente 1.14. Como $R^2 > 0.75$ y la pendiente es positiva, la invertasa está sobre-regulada. b) α -L-arabinofuranosidasa B, R^2 0.97; pendiente -0.43. Como $R^2 > 0.75$ y la pendiente es negativa, la α -L-arabinofuranosidasa B está bajo-regulada. c) Proteína con dominio de unión a quitina tipo 1, como $R^2 < 0.75$, entonces no está regulada.

13.5. Anexo 5

Tabla A5. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas extracelulares (20 g/L)											
Proteína que contiene un dominio similar a la flavodoxina	OJJ74942	ANI_1_2538014	Redox	OA	-	-	-	E	AA6	1.6.5.2	34.04
Proteína no caracterizada	OJJ66775	-	-	-	PS	-	Extra	-	-	-	32.90
Tirosinasa *	OJJ70280	ANI_1_82184	Síntesis de pigmentos	OA	PS	-	Extra	E	-	-	31.03
Glicosil hidrolasa de pared celular YteR *	OJJ77241	ANI_1_738124	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH105	-	24.74
Proteína no caracterizada	OJJ78081	-	-	-	PS	-	Extra	-	-	-	21.90
Hidrofobina	OJJ72436	ANI_1_412064	-	SMA	PS	CE	Extra	-	-	-	20.81
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ77054	ANI_1_1304124	Redox	OA	PS	CE	-	E	AA7	-	19.45
Proteína que contiene el dominio EF	OJJ70482	ANI_1_388164	Unión a iones de calcio	-	PS	CE	-	-	-	-	17.36
Proteína de la familia dedos de zinc de tipo C3HC4 *	OJJ67940	ANI_1_1376034	PCP	-	PS	CE	Extra	-	-	-	12.75
Alfa-1,3-glucanasa / mutanasa extracelular *	OJJ73318	ANI_1_1304074	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH71	-	7.43
Proteínas extracelulares (40 g/L)											
Proteína que contiene el dominio Cupin_2	OJJ67868	ANI_1_192174	Regula patogenicidad en hongos de plantas (quercetinas a)	-	-	-	-	-	-	-	41.71
Proteína no caracterizada	OJJ72271	ANI_1_160064	-	-	PS	CE	-	-	-	-	24.68
Alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22)	OJJ73063	ANI_1_6054	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH27	3.2.1.22	14.50
Proteína que contiene el dominio NACHT	OJJ66926	ANI_1_1698134	RBP	PhA	-	-	-	-	-	-	9.35
Proteínas extracelulares (60 g/L)											
Metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina *	OJJ72618	ANI_1_1822064	-	TrA	-	-	-	-	-	-	137.50
Proteína que contiene el dominio de barril A/B de respuesta al estrés	OJJ76704	-	RS	-	-	-	-	-	-	-	62.70
Proteína de unión a microtúbulos HOOK3 *	OJJ73027	ANI_1_1290064	Adhesión celular	PB	PS	CE	Extra	-	-	-	46.44

Tabla A5. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína de unión a IgE *	OJJ74863	ANI_1_810014	Patogénesis	PB	PS	CE	Extra	-	-	-	42.87
Proteína de la superfamilia facilitadora principal *	OJJ69686	-	Tr	TraA	PS	-	Extra	-	-	-	34.55
Proteína que contiene el dominio ACB	OJJ76458	ANI_1_400024	ST/RBP	TrA	-	-	Cito	-	-	-	29.03
Proteína que contiene el dominio de tipo 4 que se une a la quitina	OJJ74340	ANI_1_3184014	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	AA16	-	27.96
Proteína no caracterizada (fragmento)	OJJ71776	-	-	-	-	-	Mito	-	-	-	26.46
Proteína que contiene el dominio SGNH_hydro	OJJ67146	ANI_1_1388184	LMP	HA	PS	CE	Extra	E	CE12	-	24.21
Proteína que contiene el dominio piridox_oxase_2	OJJ76984	ANI_1_358124	VMP	OA	-	-	Mito	-	-	-	24.12
Proteína que contiene el dominio Sod_Cu	OJJ73793	ANI_1_1888074	RS	OA	PS	CE	Extra	-	-	-	22.35
Factor de elongación de traslación subunidad gamma eEF-1B *	OJJ74574	ANI_1_1304014	CPMP	TRA	-	-	Mito	-	-	-	19.09
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ75349	ANI_1_2110014	Redox	OA	PS	CE	Extra	E	AA7	-	15.69
Proteína que contiene dominio VOC	OJJ72168	ANI_1_166144	Respuesta a antibióticos	-	-	-	Mito	-	-	-	15.14
Proteína que contiene el dominio DUF953	OJJ78129	ANI_1_2334094	-	-	-	-	Mito	-	-	-	13.66
Proteína que contiene el dominio PKS_ER	OJJ68644	ANI_1_76154	CAAMP	OA	-	-	Cito	-	-	-	12.15
Proteína que contiene el dominio Lipasa_GDSL	OJJ67907	-	LMP	HA	PS	-	Extra	E	CE16	-	11.74
Proteína que contiene el dominio CBM1	OJJ77008	ANI_1_1252124	CMP	-	PS	CE	Extra	E	AA9	-	10.32
Endoglucanasa *	OJJ69424	ANI_1_634084	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	AA11	-	10.1
Proteína que contiene el dominio WSC	OJJ66131	ANI_1_924034	RS/OO	-	PS	CE	Extra	-	-	-	9.33
Proteína que contiene el dominio Amy	OJJ67685	ANI_1_1524104	CMP	HA	PS	CMC	Extra	E	GH13_1	-	7.61
Proteínas intracelulares (20 g/L)											
Proteína que contiene el dominio WD_REPEATS_REGION	OJJ71475	ANI_1_162184	OO/RBP/V MT/Tr	SMA	-	-	Cito	-	-	-	55.82
Anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) (Carbonato deshidratasa)	OJJ68512	ANI_1_1308034	-	LyA	-	-	Mito	E	-	4.2.1.1	47.90
ATP sintasa subunidad f *	OJJ78222	ANI_1_1176094	EM	-	-	-	Mito	-	-	-	40.52
Dihidroxiácido deshidratasa *	OJJ70575	ANI_1_546164	CAAMP	LyA	-	-	Cito	E	-	4.2.1.9	31.61
Deshidrogenasa de cadena corta *	OJJ69454	ANI_1_592084	LMP	OA	-	-	Cito	E	-	-	26.43
Arginasa (EC 3.5.3.1)	OJJ76100	ANI_1_998024	CAAMP	HA	-	-	-	E	-	3.5.3.1	24.88
Transportadora de fosfato *	OJJ72117	ANI_1_254144	Tr	-	-	-	-	-	-	-	23.21

Tabla A5. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
ATP sintasa subunidad d, mitocondrial	OJJ69086	ANI 1_292134	EM	TraA	-	-	Mito	-	-	-	21.50
Proteína que contiene el dominio HABP4_PAIRBP1	OJJ76144	ANI 1_920024	-	RB	-	-	Nucl	E	GH13_25	-	18.60
Proteína que contiene el dominio S10_pectina	OJJ73219	ANI 1_238054	-	RB	-	-	Mito	-	-	-	17.92
ATP sintasa mitocondrial subunidad 4 *	OJJ71686	ANI 1_962144	EM	TrA	-	-	Mito	-	-	-	17.79
Proteína ribosomal 60S L36	OJJ71330	ANI 1_384184	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	17.71
Glutaredoxina	OJJ71492	ANI 1_136184	RBP/CH	OA	-	-	Mito	-	-	-	16.32
Proteína que contiene el dominio PKS_ER	OJJ75401	ANI 1_2078024	-	OA	-	-	-	-	-	-	16.61
Proteína que contiene el dominio AlcB	OJJ68494	ANI 1_1290034	patogénesis	TrA	-	-	Pero	-	-	-	13.90
Proteínas intracelulares (40 g/L)											
Proteína que contiene el dominio SBDS	OJJ73284	ANI 1_1336074	RMP	-	-	-	-	-	-	-	26.55
Subunidad alfa de la proteína protectora F actina	OJJ77910	ANI 1_722094	RBP	PB	-	-	-	-	-	-	19.64
Proteínas intracelulares (60 g/L)											
Cadena ligera de dineína	OJJ75068	ANI 1_500014	DMP	HA/MA	-	-	-	-	-	-	62.93
Proteína relacionada con la autofagia	OJJ73023	ANI 1_1284064	OO	-	-	-	Nucl	-	-	-	57.29
Peptidilprolil isomerasa (EC 5.2.1.8)	OJJ76831	ANI 1_146124	CPMP	IA	-	-	-	E	-	5.2.1.8	44.47
Proteína ribosómica 40S S6 *	OJJ70964	ANI 1_960184	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	28.97
Proteína que contiene el dominio de homología de espiral en espiral V-SNARE	OJJ70013	ANI 1_906104	VMT/Tr	-	-	-	-	-	-	-	18.57
Glutación peroxidasa	OJJ76007	ANI 1_1152024	RS	OA	-	-	Cito	E	-	1.11.1.15	17.51
Proteína que contiene el dominio 4HBT	OJJ66669	-	LMP	-	-	-	Mito	-	-	-	17.32
Proteína del dominio R3H *	OJJ72119	ANI 1_250144	-	RB	-	-	Nucl	-	-	-	16.73
Proteína que contiene el dominio peptidasa_M24	OJJ66387	ANI 1_992084	PCP	PeA	-	-	Nucl	-	-	-	14.70
V-SNARE/proteína de fusión de proteína A de membrana peroxisomal *	OJJ67163	ANI 1_1364184	-	-	-	-	-	-	-	-	14.70
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 20 g/L de sacarosa de forma extracelular)											
Glioxilato reductasa *	OJJ74804	ANI 1_924014	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.1.1.26	632.24
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ71865	ANI 1_680144	-	OA	-	-	Pero	E	-	-	479.40
Glutación S-transferasa *	OJJ65896	ANI 1_134064	SR	TrA	-	-	Mito	E	-	2.5.1.18	282.16

Tabla A5. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Aril-alcohol deshidrogenasa *	OJJ70406	ANI_1_268114	-	OA	-	-	-	E	AA3_2	-	262.20
Componente proteasoma PRE2 *	OJJ77579	ANI_1_246094	PCP	HA/PeA	-	-	-	E	-	3.4.25.1	129.75
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 40 g/L de sacarosa de forma extracelular)											
Proteína relacionada con Ras rab-11A *	OJJ74881	ANI_1_780014	RBP	HA	-	-	-	E	-	-	470.00
Lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5)	OJJ66342	ANI_1_126084	LM	HA/LiA	PS	CMC	Extra	E	-	3.1.1.5	261.79
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 60 g/L de sacarosa de forma extracelular)											
Nucleósido difosfato quinasa (EC 2.7.4.6)	OJJ69367	ANI_1_746084	DMP	TrA/PKA	-	NCE	-	E	-	2.7.4.6	4254.18
Chaperona molecular Hsp70 *	OJJ73019	ANI_1_2182064	PF/VMT/RS	PB/HA	PS	CE	Cito	-	-	-	1243.16
Proteína de choque térmico 60, mitocondrial *	OJJ67308	ANI_1_642104	PF	HA	-	-	Mito	-	-	-	1122.44
Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)	OJJ71046	ANI_1_840184	-	OA	-	-	Mito	E	-	1.15.1.1	359.87
Proteína que contiene el dominio de unión al hemo del citocromo b5	OJJ77823	ANI_1_596094	-	-	-	CMC	-	-	-	-	330.76
Proteína que contiene el dominio Aha1_N	OJJ71021	ANI_1_880184	RS	ERA/PB	-	-	-	-	-	-	274.73
Proteína que contiene el dominio FAA_hidrolasa	OJJ75701	ANI_1_1620024	CAAMP	HA	-	NCE	Mito	E	-	-	225.22
Proteína de la familia similar a GLE1 *	OJJ73815	ANI_1_506074	RBP	PB	-	-	Cito	-	-	-	224.50
Subunidad reguladora de proteína quinasa dependiente de AMPc	OJJ71961	ANI_1_524144	RBP	ERA	-	-	-	-	-	-	208.63
Proteína que contiene dominio nitroreductasa	OJJ77397	ANI_1_972124	RC/RS	OA	-	-	-	-	-	-	202.30
Subunidad alfa del componente piruvato deshidrogenasa E1 (EC 1.2.4.1)	OJJ72971	ANI_1_1206064	CMP	Acetil TrA	-	-	Mito	E	-	1.2.4.1	200.14
Proteína que contiene el dominio DLH	OJJ69906	-	Degradación de hidrocarburos	HA	-	-	Mito	-	-	-	178.92
Rab GTPasa monomérica pequeña Rab7, putativo *	OJJ68194	ANI_1_264164	VMT	HA	-	-	-	E	-	-	143.40
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 20 g/L de sacarosa de forma intracelular)											
Endo-arabinasa *	OJJ68942	ANI_1_1374134	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH43_30	-	845.40
Proteína que contiene el dominio NmrA	OJJ69032	ANI_1_1284134	CPMP/RBP	PB	-	-	-	-	-	-	353.55
Proteína de la familia nuclear YL1 *	OJJ75468	ANI_1_1954024	TDT	DB	-	-	-	-	-	-	124.21

Tabla A5. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 40 g/L de sacarosa de forma intracelular)											
Xilanasa D *	OJJ77705	ANI_1_432094	CMP	HA	PS	CE	-	E	GH43_34	-	274.35
Proteína de dominio F5 / 8 tipo C *	OJJ65941	ANI_1_1404064	CMP	-	PS	CE	Extra	E	CE14	-	146.62
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ65770	ANI_1_772034	VMP	OA	PS	CE	Pero	E	AA7	-	113.77

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidorreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en "Pipeline computacional" de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas.

13.6. Anexo 6

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas extracelulares (60 g/L)											
Metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina *	OJJ72618	ANI 1 1822064	-	TrA	-	-	-	-	-	-	137.50
Proteína no caracterizada	OJJ73064	-	-	-	PS	-	Extra	-	-	-	80.38
Proteína que contiene el dominio HEME_HALOPEROXIDASE	OJJ73116	ANI 1 422054	Redox	OA	PS	CE	Extra	-	-	-	55.63
Proteína de unión a IgE *	OJJ74863	ANI 1 810014	Patogenesis	PB	PS	CE	Extra	-	-	-	42.87
Proteínas extracelulares (120 g/L)											
Proteína que contiene el dominio EthD	OJJ75993	ANI 1 1182024	Degradación del etil terc-butil éter	OA	-	-	-	E	-	-	136.10
Proteína no caracterizada	OJJ65714	-	-	-	-	-	Cito	-	-	-	127.18
Proteína que contiene el dominio desaminasa de tipo CMP / dCMP	OJJ75037	ANI 1 544014	-	-	-	-	Cito	E	-	3.5.4.1 3.5.4.21	75.41
Glucósido hidrolasa *	OJJ68513	ANI 1 444034	CMP	HA	-	-	-	E	GH1	3.2.1.21	53.80
Proteínas extracelulares (180 g/L)											
Proteína no caracterizada	OJJ66434	-	-	-	PS	-	Extra	-	-	-	205.51
Proteína que contiene el dominio ACB	OJJ73307	ANI 1 1084034	ST/RBP	TrA	-	-	-	-	-	-	155.88
Proteína que contiene el dominio del citocromo c	OJJ76544	ANI 1 250024	-	OA	-	-	-	-	-	-	124.42
Proteína que contiene un dominio similar a la flavodoxina	OJJ74942	ANI 1 2538014	Redox	OA	-	-	-	E	AA6	1.6.5.2	112.62
Proteína que contiene el dominio EF-hand	OJJ76965	ANI 1 324124	Unión a iones de calcio	-	-	-	Nucl	-	-	-	100.49
Proteína de la familia de la prolina deshidrogenasa *	OJJ68162	-	CAAMP	OA	PS	-	-	-	-	-	93.32
Ribonucleoproteína nuclear pequeña Sm D1 (proteína del núcleo snRNP D1)	OJJ77865	ANI 1 666094	RMP	-	-	-	-	-	-	-	74.96
Arabinogalactano endo-beta-1,4-galactanasa (EC 3.2.1.89)	OJJ70722	ANI 1 798164	CMP	HA	PS	CE	Extra	-	GH53	3.2.1.89	52.26
Proteína no caracterizada	OJJ77419	ANI 1 1454134	-	-	-	-	-	-	-	-	51.38
Proteína con dominio de la familia del factor de transcripción específico de hongos *	OJJ75261	ANI 1 2280014	TDT	-	PS	CE	Extra	-	-	-	48.90
Proteína de la familia del dominio tipo GroES de alcohol deshidrogenasa *	OJJ72107	ANI 1 274144	Redox	OA	-	-	Cito	-	-	-	43.97
Glutatión S-transferasa *	OJJ72356	ANI 1 294064	RS/Redox	TrA	-	-	-	-	-	-	41.38

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas intracelulares (60 g/L)											
Proteína no caracterizada	OJJ74906	ANI_1_748014	-	-	-	-	-	-	-	-	71.61
Malato sintasa (EC 2.3.3.9)	OJJ69071	ANI_1_320134	CMP	TrA	-	-	Pero	E	-	2.3.3.9	68.60
Proteína que contiene el dominio GMC_OxRdtase_N	OJJ70676	ANI_1_712164	-	OA	-	-	Pero	E	AA3_3	1.1.3.13	64.61
Acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial *	OJJ74299	ANI_1_1752014	-	OA	-	-	Mito	E	-	-	61.74
Proteína relacionada con la autofagia	OJJ73023	ANI_1_1284064	Diferenciación celular	-	-	-	Nucl	-	-	-	57.29
Histona H3	OJJ73516	ANI_1_976074	-	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	55.92
Proteína de biogénesis de la pared celular *	OJJ76962	ANI_1_322124	-	-	PS	CMC	Extra	-	-	-	53.56
Proteína de unión al ARN del dominio KH *	OJJ77844	ANI_1_1970094	TDT	RB	-	-	-	-	-	-	51.21
Proteína de unión a puntos calientes de recombinación *	OJJ76006	ANI_1_1150024	RMP	DB/RB	-	-	-	-	-	-	50.34
Subunidad épsilon del coatómero	OJJ73585	ANI_1_886074	VMT/Tr	SMA	-	-	-	E	GT41	-	45.83
Peptidilprolil isomerasa (EC 5.2.1.8)	OJJ76831	ANI_1_146124	CPMP	IA	-	-	-	E	-	5.2.1.8	44.47
Coronina	OJJ76609	ANI_1_148024	VMT/Tr	PB	-	-	Mito	-	-	-	41.18
Proteína que contiene el dominio de unión al hemo del citocromo b5	OJJ71894	ANI_1_1726144	-	-	-	-	-	-	-	-	38.16
Proteína que contiene el dominio PKS_AT	OJJ75389	ANI_1_2056014	LMP	OA/HA/TrA	-	-	-	E	-	2.3.1.86	38.04
Pantoato - beta-alanina ligasa *	OJJ68212	ANI_1_232164	VMP	LigA	-	-	Mito	E	-	6.3.2.1	34.82
Proteína que contiene el dominio carn_acyltransf	OJJ73684	ANI_1_724074	LMP	TrA	-	-	-	E	-	2.3.1.7	33.80
Proteína que contiene el dominio amidohidro-rel	OJJ77366	ANI_1_926124	-	HA/LyA	-	-	-	E	-	-	33.09
Proteína que contiene el dominio MSP	OJJ71384	ANI_1_292184	-	-	-	-	-	-	-	-	32.50
Proteína que contiene el dominio DUF2433	OJJ78109	ANI_1_1024094	-	-	-	-	-	-	-	-	32.45
Subunidad de 21 kDa de NADH-ubiquinona oxidoreductasa *	OJJ76758	ANI_1_12124	-	OA	-	-	-	-	-	-	31.46
SET proteína que contiene dominio	OJJ69166	ANI_1_1148134	CPMP	TrA	-	-	-	E	-	2.1.1.-	29.38
Proteína que contiene el dominio Thioredox_DsbH	OJJ73682	ANI_1_728074	CMP	-	-	-	-	E	GH9	-	29.10
TENÍA superfamilia hidrolasa *	OJJ77493	ANI_1_1572094	CAAMP	HA	-	-	-	E	-	3.1.3.96	28.94
Fn3_like proteína que contiene dominio	OJJ77452	ANI_1_24094	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH3	3.2.1.21	28.72
Subunidad 5 del factor de especificidad de escisión y poliadenilación	OJJ72112	ANI_1_1518144	RMP	RB	-	-	Cito	-	-	-	27.45

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPlasa) (EC 5.2.1.8)	OJJ69935	ANI_1_1046104	PF/CPMP	IA	-	-	Cis	E	-	5.2.1.8	26.08
Proteína de dominio La de unión a ARN *	OJJ73667	ANI_1_752074	RMP	RB	-	-	-	-	-	-	25.54
Carboxipeptidasa *	OJJ74092	ANI_1_44074	CPMP	TrA	-	-	Cis	E	-	-	23.92
Succinato-semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.16)	OJJ71251	ANI_1_530184	CAAMP	OA	-	-	Cito	E	-	1.2.1.16 1.2.1.79 1.2.1.20	23.85
Subunidad catalítica de acetiltransferasa N-terminal Nat1 *	OJJ74788	ANI_1_952014	CPMP	TrA	-	-	-	E	GT41	-	23.33
Proteína que contiene el dominio PNP_phzG_C	OJJ77140	ANI_1_580124	VMP	OA	-	-	Plas	E	-	1.4.3.5	22.84
Proteína que contiene el dominio Thiamine_BP	OJJ70849	ANI_1_2024184	Tr	PB	-	-	-	-	-	-	22.43
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPlasa) (EC 5.2.1.8)	OJJ66589	ANI_1_64104	CPMP	IA/RB	-	-	Nucl	E	-	5.2.1.8	21.85
Proteína de homeostasis de fosfato de piridoxal (proteína de homeostasis PLP)	OJJ76803	ANI_1_1044124	CH	-	-	-	Mito	-	-	-	21.67
Proteína que contiene el dominio acetilCoA_hyd_C	OJJ71701	ANI_1_938144	CMP	HA/TrA	-	-	Mito	E	-	3.1.2.1	20.92
Dihidroxiácido y 6-fosfogluconato deshidratasa *	OJJ66921	ANI_1_908134	-	-	-	-	-	E	-	4.2.1.9	20.74
Proteína que contiene el dominio IU_nuc_hydro	OJJ73784	ANI_1_580074	-	HA	-	-	Cito	E	-	-	20.07
Proteína que contiene el dominio suf	OJJ76140	ANI_1_2636024	RMP	-	-	-	-	-	-	-	19.88
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ73575	ANI_1_906074	-	OA	-	-	Pero	-	-	-	19.31
Proteína que contiene el dominio CinA	OJJ67476	ANI_1_54044	DMP	HA	-	-	Mito	E	-	-	19.20
Proteína quinasa activada por mitógenos (EC 2.7.11.24)	OJJ73234	ANI_1_1432074	ST/RBP/CPMP	PKA/TrA	-	-	Nucl	E	-	2.7.11.24	19.10
Omitina aminotransferasa (EC 2.6.1.13)	OJJ71111	ANI_1_746184	CAAMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.6.1.13	18.41
Proteína que contiene el dominio de N-acetiltransferasa	OJJ74019	ANI_1_180074	Resistencia a antibióticos/DM	TrA	-	-	Cis	E	-	2.3.1.255	18.37
Proteína que contiene el dominio W2	OJJ67336	ANI_1_590104	T/RBP	RB	-	-	-	-	-	-	17.89
Complejo de transcripción CCR4-NOT, subunidad 3 *	OJJ72651	ANI_1_738064	RBP/TDT	-	-	-	-	-	-	-	17.86
Proteína spliceosomal DIB1	OJJ76005	ANI_1_1148024	RMP	-	-	-	-	-	-	-	17.73
Proteína que contiene el dominio SurE	OJJ70562	ANI_1_524164	RS	HA	-	NCE	Cito	-	-	-	17.71
Módulo Surp *	OJJ78278	ANI_1_2520094	RMP	RB	-	-	Mito	-	-	-	17.63
Proteína que contiene el dominio UBIQUITIN_CONJUGAT_2	OJJ68613	ANI_1_24154	-	TrA	-	-	-	E	-	2.3.2.23	17.17

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Metilentetrahidrofolato reductasa (EC 1.5.1.20)	OJJ69369	ANI_1_1512084	CAAMP	OA	-	-	-	E	-	1.5.1.20	16.92
Proteína del dominio R3H *	OJJ72119	ANI_1_250144	-	RB	-	-	Nucl	-	-	-	16.73
Proteína que contiene dominio de hemeritrina	OJJ75596	ANI_1_1768024	CH	-	-	-	-	-	-	-	16.70
Proteína que contiene el dominio Flavín_Reduct	OJJ74243	ANI_1_1842014	Redox	OA	-	-	-	-	-	-	16.19
Cistationina beta-sintasa (EC 4.2.1.22)	OJJ67492	ANI_1_354044	CAAMP	LyA	-	-	Cito	E	-	4.2.1.22	15.88
Proteína SEY1 (EC 3.6.5.-)	OJJ73730	ANI_1_652074	OO	HA	-	-	-	E	-	3.6.5.-	15.76
Hidrolasa de ubiquitina carboxilo terminal (EC 3.4.19.12)	OJJ74456	ANI_1_1506014	CPMP	HA/PeA	-	-	Cis	E	-	3.4.19.12	15.70
Proteína que contiene el dominio PCI	OJJ73230	ANI_1_1440074	PCP/ST/RBP	-	-	-	-	-	-	-	15.52
Dihidroxiacetona quinasa *	OJJ77344	ANI_1_890124	CMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.7.1.28 2.7.1.29 4.6.1.15	15.21
Proteína que contiene dominio AAA	OJJ76769	ANI_1_32124	RBP/PCP	HA	-	-	-	-	-	-	15.21
Proteína que contiene dominio AAA	OJJ70754	ANI_1_826164	RBP/PCP	HA	-	-	-	-	-	-	15.05
Factor de elongación de la transcripción SPT5 *	OJJ71186	ANI_1_632184	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	14.96
Proteína que contiene el dominio peptidasa_M24	OJJ66387	ANI_1_992084	-	PeA	-	-	Nucl	E	-	-	14.70
Proteína que contiene dominio MUERTO *	OJJ78390	ANI_1_2604094	DMP	HA/DB	-	-	Nucl	E	-	-	14.40
Proteína que contiene el dominio DUF1750 *	OJJ77577	ANI_1_242094	-	-	-	-	-	-	-	-	13.98
Proteína de degradación de fusión de ubiquitina Ufd1 *	OJJ74911	ANI_1_740014	PCP	-	-	-	-	-	-	-	13.85
Proteína que contiene dominio G de tipo septin	OJJ75500	ANI_1_1898024	Citocinesis	-	-	-	-	-	-	-	13.83
Triptófanil-tRNA sintetasa *	OJJ69524	ANI_1_1374084	CAAMP/RMP/T	LigA	-	-	-	E	-	6.1.1.2	13.63
Proteína que contiene dominio AAA	OJJ75610	ANI_1_1748024	RBP/PCP	HA	-	-	-	-	-	-	13.47
Proteína que contiene el dominio SGNH_hydro	OJJ67340	ANI_1_582104	LMP	-	-	-	-	E	CE12	-	13.00
Proteínas intracelulares (120 g/L)											
Citocromo c oxidasa chaperona de cobre Cox17 *	OJJ75616	ANI_1_3162024	Tr	-	-	-	-	-	-	-	122.30
Proteína que contiene el dominio CHCH	OJJ72383	ANI_1_1618064	Tr	OA	-	-	Mito	-	-	-	65.31
Proteína de dominio UBX *	OJJ71385	ANI_1_290184	CPMP	PB	-	-	Nucl	-	-	-	26.53
Subunidad 7 del complejo del citocromo b-c1	OJJ71396	ANI_1_274184	-	-	-	-	-	-	-	-	14.84

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína ribosomal 50S L12 *	OJJ70834	ANI_1_1168184	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	14.68
Proteínas intracelulares (180 g/L)											
Anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) (Carbonato deshidratasa)	OJJ68512	ANI_1_1308034	-	LyA	-	-	Mito	E	-	4.2.1.1	149.53
Proteína similar a PRTasa *	OJJ69866	ANI_1_2240104	-	-	-	-	Cito	E	-	2.4.2.9	70.70
Proteína de fusión de citosina desaminasa-uracilfosforribosiltransferasa *	OJJ68797	ANI_1_356154	-	-	-	-	-	E	-	2.4.2.9	57.78
Proteína que contiene el dominio dUTPasa	OJJ74975	ANI_1_640014	-	HA	-	-	Cito	E	-	3.6.1.23	55.80
SMP-30 / Gluconolacnasa / proteína de la familia de la región similar a LRE *	OJJ74082	ANI_1_60074	CH/RS/RC	-	-	-	-	E	-	-	50.80
Proteína ribosómica 60S L35a *	OJJ75660	ANI_1_1684024	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	47.71
Receptor de importación de proteínas MAS20 *	OJJ73485	ANI_1_1036074	Tr	-	PS	CE	-	-	-	-	43.59
Péptido hidrolasa (EC 3.4.-.-)	OJJ68625	ANI_1_46154	PCP	HA/PeA	PS	CE	-	E	-	-	40.27
Proteína que contiene el dominio KOW	OJJ78189	ANI_1_1142094	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	40.00
Subunidad de 299 kDa de NADH-ubiquinona oxidoreductasa *	OJJ76214	ANI_1_810024	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	39.49
Proteína Cap20 * asociada a patogenicidad	OJJ70643	ANI_1_658164	-	-	-	-	Cito	-	-	-	38.72
Factor de iniciación de la traducción eucariota 5A (eIF-5A)	OJJ75149	ANI_1_366014	RBP/T	T/RB	-	-	-	-	-	-	35.97
Proteína que contiene el dominio DAO	OJJ71941	ANI_1_552144	-	OA	PS	CE	Extra	E	AA3_2	1.5.3.1 1.5.3.7	35.37
Proteína que contiene el dominio de la cadena E de la ATP sintasa *	OJJ71579	ANI_1_1146144	Tr	TraA	-	-	Mito	-	-	-	33.91
Proenzima S-adenosilmetionina descarboxilasa *	OJJ69351	ANI_1_778084	-	LyA	-	-	-	E	-	4.1.1.50	32.30
Subunidad reguladora de quinasas dependientes de ciclina	OJJ71512	ANI_1_1258144	RBP	ERA	-	-	Nucl	-	-	-	31.93
Calmodulina *	OJJ70863	ANI_1_1116184	ST/RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	31.41
Proteína ribosómica S19 *	OJJ71852	ANI_1_702144	T	SMA/RB	-	-	-	-	-	-	30.59
Proteína ribosomal 60S L36	OJJ71330	ANI_1_384184	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	29.71
Proteína ribosómica 60S L11 *	OJJ71297	ANI_1_446184	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	29.55
Proteína que contiene dominio de tiorredoxina	OJJ78073	ANI_1_984094	RBP/CH	OA	-	-	Mito	E	-	1.11.1.15	29.32
Subunidad alfa de la proteína que capsula F-actina	OJJ77910	ANI_1_722094	RBP	PB	-	-	-	-	-	-	28.36
Proteína que contiene el dominio HMA	OJJ71810	ANI_1_766144	Tr	-	-	-	Cis	-	-	-	27.37

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene un dominio similar a SnoL	OJJ70824	ANI_1_540074	-	-	-	-	Extra	-	-	-	26.33
NADH-ubiquinona oxidoreductasa 21 kDa subunidad mitocondrial *	OJJ78221	ANI_1_1174094	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	26.12
Aldehído reductasa *	OJJ72775	ANI_1_1986064	CMP	OA	-	-	Pero	-	-	-	25.82
GTPasa relacionada con la secreción *	OJJ76753	ANI_1_124	VMT/Tr	HA	-	-	-	-	-	-	25.62
Ribonucleósido-difosfato reductasa de cadena pequeña *	OJJ77376	ANI_1_944124	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.17.4.1	22.32
Nicotinamida-nucleótido adenililtransferasa (EC 2.7.7.1)	OJJ77990	ANI_1_870094	-	TrA/NA	-	-	-	E	-	2.7.7.1 2.7.7.18	22.21
Proteína que contiene el dominio de hidrolasa de Nudix	OJJ68566	ANI_1_1348034	-	HA	-	-	Mito	-	-	-	21.88
Glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15)	OJJ73357	ANI_1_1216074	CAAMP	LyA	-	-	-	E	-	4.1.1.15	21.20
Proteína no caracterizada	OJJ73914	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.01
Proteína de respuesta a antibióticos similar a CipC *	OJJ72464	ANI_1_450064	Patogenesis	-	-	-	-	-	-	-	20.47
Hidantoína racemasa *	OJJ73574	ANI_1_908074	CAAMP	-	-	-	-	E	-	-	19.46
Agmatinasa *	OJJ75464	ANI_1_1960024	-	HA	PS	-	-	E	-	3.5.3.11	18.48
Proteína que contiene el dominio SBDS	OJJ73284	ANI_1_1336074	RMP	-	-	-	-	-	-	-	18.41
Subunidad de ATP sintasa f *	OJJ78222	ANI_1_1176094	Tr	-	-	-	Mito	-	-	-	16.99
Proteína que contiene el dominio 4HBT	OJJ76797	ANI_1_88124	LMP	HA	-	-	Mito	E	-	3.1.2.-	16.25
Proteína de dominio IdgA *	OJJ75436	ANI_1_3344024	-	HA/TrA	-	-	Mito	E	-	4.2.1.70 2.7.1.83	15.98
Homólogo de proteína GrpE	OJJ76551	ANI_1_238024	PF	ERA/PB	-	-	Mito	-	-	-	15.17
Proteína que contiene dominio de caja HMG	OJJ76086	ANI_1_1024024	T/RBP	DB	-	-	Nucl	-	-	-	15.15
Proteína que contiene el dominio de Rhodanasa	OJJ71814	ANI_1_760144	-	TrA	-	-	-	E	-	3.1.3.48 1.20.4.1	14.75
Proteína que contiene el dominio de la cadena épsilon de ATP sintasa mitocondrial *	OJJ67307	ANI_1_644104	Tr	TraA/TrA	-	-	Mito	-	-	-	14.05
Proteína ribosómica 60S L38 *	OJJ71284	ANI_1_472184	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	13.87
Proteína que contiene el dominio ribosomal_L28e	OJJ69249	ANI_1_14134	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	13.59
NADH-ubiquinona oxidoreductasa subunidad GRIM-19 *	OJJ72089	ANI_1_304144	-	TraA	-	-	-	-	-	-	13.11
Proteína que contiene el dominio TPR_REGION	OJJ74771	ANI_1_986014	RBP	-	-	-	-	E	GT41	-	13.03
Proteína que contiene el dominio SGNH_hydro	OJJ73996	ANI_1_1680074	LMP	-	-	-	-	E	CE3	-	13.00

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Glicosil hidrolasa *	OJJ72091	ANI 1 300144	CMP	HA	-	-	-	E	GH5_1 2	-	12.97
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 60 g/L de sacarosa de forma extracelular)											
Proteína que contiene el dominio ADF-H	OJJ77148	ANI 1 596124	CPMP	PB	-	-	Cito	-	-	-	367.00
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 120 g/L de sacarosa de forma extracelular)											
Proteína que contiene un dominio similar a la ubiquitina	OJJ76119	ANI 1 964024	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	1051.95
Proteína no caracterizada	OJJ73826	ANI 1 488074	-	TRA/RB	-	-	Cito	-	-	-	1030.67
Proteína que contiene el dominio G de tipo Tr	OJJ76227	ANI 1 790024	T	HA	-	-	Cito	-	-	-	762.67
Peptidil-proilil cis-trans isomerasa (PPIasa) (EC 5.2.1.8)	OJJ72859	ANI 1 1026064	PF/CPMP	IA	-	-	Cito	E	-	5.2.1.8	756.32
Proteína que contiene un dominio similar a la guanilato quinasa	OJJ74104	ANI 1 1580074	-	TrA	-	-	Mito	E	-	2.7.4.8	411.45
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ71865	ANI 1 680144	-	OA	-	-	Pero	E	-	-	311.08
Proteína que contiene el dominio de unión a CoA	OJJ77481	ANI 1 76094	-	TrA	-	-	-	E	-	2.3.3.8	208.37
Glutación S-transferasa *	OJJ65896	ANI 1 134064	RS	TrA	-	-	Mito	E	-	2.5.1.18	202.73
Proteína que contiene el dominio EHN	OJJ72085	ANI 1 312144	Degradación de éteres de hidrocarburos	HA	-	-	Mito	E	-	3.3.2.9	192.45
Proteína que contiene el dominio de pibosiltrano	OJJ67239	ANI 1 2124184	-	TrA	-	-	-	E	-	2.4.2.10	189.39
Subunidad beta del proteasoma (EC 3.4.25.1)	OJJ66751	ANI 1 174114	PCP	HA/PeA	-	-	-	E	-	3.4.25.1	185.24
Proteína que contiene el dominio HIT	OJJ73221	ANI 1 242054	-	HA	-	-	Pero	E	PL6	-	185.15
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 180 g/L de sacarosa de forma extracelular)											
Proteína que contiene el dominio de unión al hemo del citocromo b5	OJJ71458	ANI 1 186184	-	-	-	-	-	-	-	-	542.03
Tipo de subunidad alfa del proteasoma (EC 3.4.25.1)	OJJ76116	ANI 1 970024	PCP	HA/PeA	-	-	-	E	-	3.4.25.1	466.25
Tipo de subunidad alfa del proteasoma (EC 3.4.25.1)	OJJ72326	ANI 1 246064	PCP	HA/PeA	-	-	-	E	-	3.4.25.1	408.04
Proteína similar a HAD *	OJJ66415	ANI 1 952084	CAAMP/RC	HA	-	-	-	-	-	-	376.48
Proteína ribosómica S13 *	OJJ73363	ANI 1 1206074	T	SMA/RB	-	-	Mito	-	-	-	347.42
Proteína de la familia NAP *	OJJ69449	ANI 1 600084	OO	-	-	-	-	-	-	-	321.91
Anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) (Carbonato deshidratasa)	OJJ69632	ANI 1 1282084	-	LyA	-	-	Mito	E	-	4.2.1.1	257.01

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene el dominio ADF-H	OJJ75191	ANI_1_302014	RBP	PB	-	-	Nucl	-	-	-	177.34
Acetil-coenzima A sintetasa (EC 6.2.1.1)	OJJ70986	ANI_1_924184	MCP	LigA	-	-	Cito	E	-	6.2.1.1	172.13
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 60 g/L de sacarosa de forma intracelular)											
Proteína que contiene el dominio GH26	OJJ67015	ANI_1_1806134	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH26	3.2.1.78	1180.46
Tiorredoxina	OJJ75173	ANI_1_326014	RBP/CH	OA	-	-	Cito	-	-	-	955.53
Proteína que contiene el dominio EthD	OJJ66283	ANI_1_8064	Degradación del etil terc-butil éter	OA	-	-	-	-	-	-	607.38
Proteína que contiene el dominio NTF2	OJJ71897	ANI_1_626144	Tr	HA	-	-	-	-	-	-	422.15
Proteína de dominio DUF1348 *	OJJ69948	ANI_1_1020104	-	-	-	-	-	-	-	-	387.79
Desaminasa de porfobilinógeno *	OJJ70469	ANI_1_364164	CPMP	TrA	-	-	Mito	E	-	2.5.1.61	368.21
Nucleófilo aminohidrolasa N-terminal *	OJJ70791	ANI_1_896164	PCP	HA/PeA	-	-	-	E	-	3.4.25.1	360.55
Proteína de dominio DUF967 *	OJJ77808	ANI_1_1932094	-	-	-	-	Pero	-	-	-	356.51
Proteína hidrolasa dependiente de metales *	OJJ74089	ANI_1_50074	CMP/CAAMP/PCP/LM/NM	HA	-	-	Mito	E	-	-	341.31
Proteína que contiene el dominio EHN	OJJ69918	ANI_1_1072104	Degradación de éteres de hidrocarburos	HA	-	-	Cito	E	-	-	315.68
Proteína que contiene el dominio peptidasa_M3	OJJ72322	ANI_1_240064	PCP	HA/PeA	-	-	Cito	E	-	3.4.24.-	290.15
Aldosa 1-epimerasa *	OJJ78365	ANI_1_2584094	CMP	IA	-	-	-	E	-	5.1.3.3	244.77
Leucotrieno A (4) hidrolasa (LTA-4 hidrolasa) (EC 3.3.2.10) (EC 3.4.11.-)	OJJ67501	ANI_1_10044	PCP	HA/PeA	-	-	Mito	E	-	3.3.2.6	229.01
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ75281	ANI_1_2250014	-	OA	PS	CE	Extra	E	AAZ	-	223.29
Proteína que contiene el dominio peptidasa_S9	OJJ69656	ANI_1_1246084	PCP	HA/PeA	-	NCE	-	E	CE10	-	198.74
Proteína que contiene el dominio EHN	OJJ72085	ANI_1_312144	Degradación de éteres de hidrocarburos	HA	-	-	Mito	E	-	3.3.2.9	192.45
Proteína que contiene el dominio AB hidrolasa-1	OJJ78030	ANI_1_938094	LM	HA	-	-	-	E	-	-	190.03
Alfa-L-arabinofuranosidasa B *	OJJ69042	ANI_1_372134	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH54	3.2.1.55	178.96
Extra-intra (proteínas que se encuentran en 180 g/L de sacarosa de forma intracelular)											
Inulinasa *	OJJ73755	ANI_1_1796094	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.7	1532.46
Proteína que contiene un dominio similar a la ubiquitina	OJJ76119	ANI_1_964024	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	1051.95

Tabla A6. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene el dominio PepX_C	OJJ76621	ANI_1_2212024	PCP	HA/PeA	-	-	-	E	CE7	-	773.51
Glucósido hidrolasa *	OJJ73817	ANI_1_502074	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH17	3.2.1.58	678.05
Proteína de la familia nuclear YL1 *	OJJ75468	ANI_1_1954024	TDT	DB	-	-	-	-	-	-	593.71
Exo-beta-1,3-glucanasa *	OJJ74339	ANI_1_1686014	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH55	-	491.50
Trisafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)	OJJ76463	ANI_1_392024	CMP	IA	-	NCE	Mito	E	-	5.3.1.1	449.88
Subunidad beta del proteasoma (EC 3.4.25.1)	OJJ70789	ANI_1_890164	PCP	HA/PeA	-	-	-	E	-	3.4.25.1	428.29
Proteína que contiene el dominio DJ-1_Pfpl	OJJ72207	ANI_1_114144	PCP	HA/PeA	-	-	Cito	-	-	-	384.63
Proteína similar a HAD *	OJJ66415	ANI_1_952084	CAAMP/RC	HA	-	-	-	-	-	-	376.48
Proteína que contiene el dominio Semialdehyde_dh	OJJ78234	ANI_1_1194094	CAAMP	OA/PB	-	-	-	E	-	1.2.1.11	360.77
Alfa-1,3-glucanasa *	OJJ68845	ANI_1_1520134	CMP	HA	PS	CE	-	E	GH71	-	323.99
4-nitrofenilfosfatasa (PNPPasa) (EC 3.1.3.41)	OJJ75673	ANI_1_3104024	RC	Pha/HA	-	-	-	E	-	-	315.13
Uroporfirinógeno descarboxilasa (EC 4.1.1.37)	OJJ75038	ANI_1_542014	-	LyA	-	-	-	E	-	4.1.1.37	280.50
Manitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa *	OJJ76220	ANI_1_802024	CMP	OA	-	-	-	E	-	1.1.1.17	196.56

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidorreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en "Pipeline computacional" de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas.

13.7. Anexo 7

Tabla A7. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas extracelulares 20-60 g/L											
Endoglucanasa A *	OJJ77019	ANI_1_398124	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH12	3.2.1.151	1594.08
Proteína no caracterizada (fragmento)	OJJ71409	-	-	-	-	-	Cito	-	-	-	1012.07
Proteína no caracterizada	OJJ72114	ANI_1_260144	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	706.97
Proteína que contiene el dominio de celulasa	OJJ70569	ANI_1_534164	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH5_9	3.2.1.58	586.24
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ67831	ANI_1_144174	Redox	OA	PS	CE	Extra	E	AA7	-	469.64
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ66136	ANI_1_16034	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	445.07
Beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)	OJJ67369	ANI_1_106034	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH10	3.2.1.8	334.17
Proteína no caracterizada	OJJ69038	ANI_1_378134	-	-	PS	CE	Extra	E	AA11	-	255.93
Proteína no caracterizada	OJJ73062	ANI_1_4054	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	247.99
Proteína con dominio SUN *	OJJ72381	ANI_1_330064	-	PB/DB	PS	CE	Extra	E	GH132	3.2.1.-	247.17
Proteínas intracelulares 20-60 g/L											
Malato deshidrogenasa *	OJJ69250	ANI_1_12134	CMP	OA	-	-	Cito	E	GH4	1.1.1.37	3199.50
Poliubiquitina *	OJJ70905	ANI_1_1056184	PCP	-	-	-	Cito/nuc	-	-	-	1913.34
Oxalacetato acetil hidrolasa *	OJJ67883	ANI_1_92174	CMP	HA	-	-	Cis	E	-	-	573.77
Sulfato adenililtransferasa (EC 2.7.7.4) (ATP-sulfurilasa) (Sulfato adenilato transferasa) (SAT)	OJJ78267	ANI_1_1260094	CAAMP	TrA/NA	-	-	-	E	-	2.7.7.4	554.36
UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (EC 2.7.7.9)	OJJ66556	ANI_1_120104	CMP	TrA/NA	-	CMC	-	E	-	2.7.7.9	549.45
NADH-citocromo b5 reductasa (EC 1.6.2.2)	OJJ75084	ANI_1_468014	LMP/RS	OA	-	-	-	E	-	1.6.2.2	457.73
Proteína de la familia de la dihidrodipicolinato sintetasa *	OJJ71649	ANI_1_1986144	-	LyA	-	-	-	E	-	4.1.3.16	407.02
ADP/ATP translocasa	OJJ70582	ANI_1_558164	Tr	TraA	-	CMC	Mito	-	-	-	349.12
Factor de elongación 1-alfa	OJJ70636	ANI_1_648164	-	HA/T/RB	-	-	Cito	-	-	-	336.60
Proteína que contiene dominio de tiorredoxina	OJJ71180	ANI_1_644184	RBP/CH	OA	-	-	-	E	-	-	296.53
Fosfotransferasa (EC 2.7.1.-)	OJJ75448	ANI_1_1984024	CMP/CH	TrA	-	-	-	E	-	2.7.1.1	291.45

Tabla A7. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Adenilil-sulfato quinasa (EC 2.7.1.25)	OJJ73863	ANI_1_422074	CAAMP	TrA	-	-	Mito	E	-	2.7.1.25	289.27
Proteína ribosomal 60S L20	OJJ75083	ANI_1_470014	T	SMA	-	-	-	-	-	-	277.74
Proteína ribosómica 60S L9-B *	OJJ74075	ANI_1_74074	T	SMA/RB	-	-	Mito	-	-	-	271.46
Proteína que contiene el dominio MGS	OJJ71303	ANI_1_436184	-	HA/TrA	-	-	Cito	E	-	2.1.2.3 3.5.4.10	269.76
Proteína que contiene el dominio hemo de unión a citocromo b5	OJJ71697	ANI_1_944144	-	-	-	-	Cito	-	-	-	267.19
Subunidad de 34 kDa del complejo Arp2/3	OJJ74930	ANI_1_700014	RBP	PB	-	-	-	-	-	-	263.53
Proteína que contiene el dominio de epimerasa	OJJ71871	ANI_1_1740144	-	OA	PS	-	Cito	-	-	-	257.32
Proteína que contiene el dominio RRM	OJJ75650	ANI_1_1702024	-	RB	-	-	-	-	-	-	255.13
Proteína EB1 *	OJJ76059	ANI_1_1074024	Citocinesis	PB	-	-	-	-	-	-	254.84
Proteína que contiene el dominio CRAL-TRIO (fragmento)	OJJ71974	ANI_1_502144	Tr	-	-	-	-	-	-	-	245.03
Proteína que contiene el dominio de proteína quinasa	OJJ71623	ANI_1_1076144	CPMP	PKA/TrA	-	-	-	E	-	2.7.11.1	245.03
Proteína que contiene el dominio Polysacc_synt_4	OJJ71151	ANI_1_682184	-	TrA	-	-	-	-	-	-	231.78
Proteína de resistencia al cobre Crd2 *	OJJ76801	ANI_1_96124	ST	-	-	-	-	-	-	-	219.00
Piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1)	OJJ71300	ANI_1_440184	CMP	LigA	-	-	-	E	-	6.4.1.1	216.38
Histona H2B	OJJ78399	ANI_1_1488094	-	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	198.79
Proteína que contiene dominio de tipo FR de unión a FAD	OJJ77995	ANI_1_880094	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.8.1.2	189.27
Adenilato quinasa (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transfosforilasa) (ATP: AMP fosfotransferasa) (Adenilato quinasa citosólica y mitocondrial) (Adenilato monofosfato quinasa)	OJJ73031	ANI_1_1296064	CH	TrA	-	-	-	E	-	2.7.4.3	184.13
Factor 3 de iniciación de la traducción eucariota subunidad F (eIF3f)	OJJ74049	ANI_1_120074	T	T/PB/RB	-	-	Pero	-	-	-	176.59
Proteína de fisión mitocondrial 1	OJJ76521	ANI_1_292024	OO	-	-	-	-	-	-	-	172.16
Proteína ribosómica 60S L27	OJJ70645	ANI_1_660164	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	171.55
Proteína de la familia de la enoil-CoA hidratasa/isomerasa *	OJJ76473	ANI_1_378024	LMP	-	-	-	Mito	E	-	4.2.1.17	167.96
Proteína LSm8 similar a Sm asociada a ARNsn U6	OJJ73789	ANI_1_572074	RMP	RB	-	-	-	-	-	-	167.30
3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa *	OJJ73437	ANI_1_1106074	-	OA	-	-	Mito	E	-	1.1.1.31	165.67
Proteína ribosómica 40S S1	OJJ68799	-	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	165.23
Proteína ribosómica 40S S16 *	OJJ76200	ANI_1_830024	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	164.69

Tabla A7. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Inhibidor de la disociación de Rab GDP	OJJ76448	ANI_1_418024	ST/RBP/Tr	ERA	-	-	-	-	-	-	162.09
Proteína que contiene el dominio ribosomal_L16	OJJ67318	ANI_1_628104	T	SMA	-	-	-	-	-	-	151.37
Cadena ligera de dineína *	OJJ74024	ANI_1_170074	DMP	HA/MA	-	-	Cito	-	-	-	150.42
Proteína de unión a puntos de acceso de recombinación *	OJJ76006	ANI_1_1150024	RMP	DB/RB	-	-	-	-	-	-	148.81
Cadena ligera reguladora de miosina cdc4 *	OJJ72299	ANI_1_204064	Citocinesis	Unión a iones de Ca	-	-	-	-	-	-	147.07
Uridilato quinasa (UK) (EC 2.7.4.14) (ATP: UMP fosfotransferasa) (Deoxicitidilato quinasa) (CK) (dCMP quinasa) (Uridina monofosfato quinasa) (UMP quinasa) (UMPK)	OJJ66672	ANI_1_534114	-	TrA	-	-	-	E	-	2.7.4.14	146.50
Extra-intra 20-60 g/L (proteínas que son abundantes no reguladas de forma extracelular)											
Proteína que contiene el dominio 14_3_3	OJJ72815	ANI_1_962064	ST	PB	-	-	Cito	-	-	-	14551.00
Proteína que contiene el dominio 14_3_3	OJJ70757	ANI_1_832164	ST	PB	-	-	-	-	-	-	7758.77
Transaldolasa (EC 2.2.1.2)	OJJ72476	ANI_1_472064	CMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.2.1.2	4261.31
Metionina sintasa independiente de cobalamina *	OJJ71337	ANI_1_372184	CAAMP	TrA	-	-	-	E	-	2.1.1.14	3525.11
Proteína que contiene el dominio NMT1	OJJ75817	ANI_1_1450024	VMP	-	-	-	Cito	-	-	-	2891.42
Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)	OJJ72339	ANI_1_268064	CMP	OA	-	-	Cito	E	GH4	1.1.1.37	2782.57
Proteína que contiene el dominio ABM *	OJJ66778	ANI_1_222114	Biosíntesis de antibióticos	OA	-	-	Nucl	-	-	-	2715.93
Glucosa oxidasa *	OJJ74152	ANI_1_1992014	-	OA	PS	-	Nucl	E	AA3_2	-	2706.21
Glutación S-transferasa *	OJJ67066	ANI_1_330164	RS	TrA	-	-	-	E	-	-	2443.42
Alfa/beta-hidrolasa *	OJJ72111	ANI_1_266144	LMP	HA	PS	CMC	Extra	E	-	-	2219.75
Difosfatasa inorgánica *	OJJ75670	ANI_1_1668024	-	HA	-	-	Cito	E	-	3.6.1.1	2179.72
Glutamato deshidrogenasa	OJJ71413	ANI_1_248184	CAAMP	OA	-	-	Cito	E	-	1.4.1.4	2144.82
Glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9)	OJJ71817	ANI_1_754144	CMP	IA	-	NCE	Cito	E	-	5.3.1.9	1872.30
Metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina *	OJJ72617	ANI_1_1822064	-	TrA	-	-	Cito	E	-	-	1566.91
Terpenoide sintasa *	OJJ75814	ANI_1_1456024	LMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.5.1.1	1411.71
Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1)	OJJ70915	ANI_1_1044184	CAAMP	TrA	-	-	Mito	E	-	2.6.1.1	1351.75
Proteína que contiene el dominio PABS	OJJ73563	ANI_1_924074	-	TrA	-	-	Nucl	E	-	2.5.1.16	1197.32

Tabla A7. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene el dominio de la peptidasa A1	OJJ76103	ANI_1_994024	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.23.25	1062.07
Extra-intra 20-60 g/L (proteínas que son abundantes no reguladas de forma intracelular)											
Proteína que contiene el dominio 14_3_3	OJJ72815	ANI_1_962064	ST	PB	-	-	Cito	-	-	-	14551.00
Proteína que contiene el dominio 14_3_3	OJJ70757	ANI_1_832164	ST	PB	-	-	-	-	-	-	7758.77
Transaldolasa (EC 2.2.1.2)	OJJ72476	ANI_1_472064	CMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.2.1.2	4261.31
Nucleósido difosfato quinasa (EC 2.7.4.6)	OJJ69367	ANI_1_746084	-	TrA/ATPbidi ng/quinasa	-	NCE	-	E	-	2.7.4.6	4254.18
Metionina sintasa independiente de cobalamina *	OJJ71337	ANI_1_372184	CAAMP	TrA	-	-	-	E	-	2.1.1.14	3525.11
Proteína que contiene el dominio NMT1	OJJ75817	ANI_1_1450024	VMP	-	-	-	Cito	-	-	-	2891.42
Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)	OJJ72339	ANI_1_268064	CMP	OA	-	-	Cito	E	GH4	1.1.1.37	2782.57
Proteína que contiene el dominio ABM *	OJJ66778	ANI_1_222114	Biosíntesis de antibióticos	OA	-	-	Nucl	-	-	-	2715.93
Glucosa oxidasa *	OJJ74152	ANI_1_1992014	-	OA	PS	-	Nucl	E	AA3_2	-	2706.21
Glutación S-transferasa *	OJJ67066	ANI_1_330164	RS	TrA	-	-	-	E	-	-	2443.42
Alfa/beta-hidrolasa *	OJJ72111	ANI_1_266144	LMP	HA	PS	CMC	Extra	E	-	-	2219.75
Difosfatasa inorgánica *	OJJ75670	ANI_1_1668024	-	HA	-	-	Cito	E	-	3.6.1.1	2179.72
Glutamato deshidrogenasa	OJJ71413	ANI_1_248184	CAAMP	OA	-	-	Cito	E	-	1.4.1.4	2144.82
Glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9)	OJJ71817	ANI_1_754144	CMP	IA	-	NCE	Cito	E	-	5.3.1.9	1872.30
Proteína que contiene el dominio Aldedh	OJJ73491	ANI_1_1024074	-	OA	-	NCE	Cito	E	-	1.2.1.3	1712.57
Metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina *	OJJ72617	ANI_1_1822064	-	TrA	-	-	Cito	-	-	-	1566.91
Terpenoide sintasa *	OJJ75814	ANI_1_1456024	LMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.5.1.1	1411.71
Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1)	OJJ70915	ANI_1_1044184	CAAMP	TrA	-	-	Mito	E	-	2.6.1.1	1351.75
Glutación S-transferasa *	OJJ67066	ANI_1_330164	RS	TrA	-	-	-	E	-	-	2443.42
Adenosil homocisteinasa (EC 3.3.1.1)	OJJ73949	ANI_1_302074	CAAMP	HA	-	-	Cito	E	-	3.3.1.1	1198.60
Proteína que contiene el dominio PABS	OJJ73563	ANI_1_924074	-	TrA	-	-	Nucl	E	-	2.5.1.16	1197.32
Proteína de choque térmico 60, mitocondrial *	OJJ67308	ANI_1_642104	PF	ATPasa	-	-	Mito	-	-	-	1122.44
Proteína que contiene el dominio de la peptidasa A1	OJJ76103	ANI_1_994024	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.23.25	1062.07

Tabla A7. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Tipo de subunidad alfa del proteasoma (EC 3.4.25.1)	OJJ78001	ANI_1_888094	PCP	HA/PA	-	-	Mito	E	-	3.4.25.1	1042.92

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidorreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en "Pipeline computacional" de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas.

13.8. Anexo 8

Tabla A8. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas extracelulares 60-180 g/L											
Proteína que contiene el dominio hidrolasa_4	OJJ67062	ANI_1_1218164	-	HA	PS	NCE	Extra	E	-	-	8538.74
Endo-1,4-beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)	OJJ75322	ANI_1_94014	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH11	3.2.1.8	6941.64
Proteína de la pared celular PhiA *	OJJ76937	ANI_1_280124	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	5093.61
Proteína que contiene el dominio CVNH	OJJ74889	ANI_1_766014	Actividad virucida	Unión a carbohidratos	-	-	-	-	-	-	4546.19
Proteína de la familia del dominio del factor de transcripción específico de hongos *	OJJ66777	ANI_1_220114	TDT	-	PS	CE	Extra	-	-	-	1644.06
Proteína no caracterizada (fragmento)	OJJ71409	-	-	-	-	-	Cito	-	-	-	1563.59
Proteína que contiene el dominio Amy	OJJ69630	ANI_1_362084	CMP	HA	PS	CMC	Extra	E	GH13_1	3.2.1.1	1223.21
Proteína no caracterizada	OJJ76575	ANI_1_198024	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	936.85
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ67831	ANI_1_144174	Redox	OA	PS	CE	Extra	E	AA7	-	720.45
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ66136	ANI_1_16034	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	553.34
Proteína que contiene el dominio CBM1	OJJ71721	ANI_1_916144	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH5_5	3.2.1.4	539.52
Proteína que contiene el dominio de celulasa	OJJ70569	ANI_1_534164	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH5_9	3.2.1.58	483.01
Proteína de unión a microtúbulos HOOK3 *	OJJ73027	ANI_1_1290064	Adhesión celular	PB	PS	CE	Extra	-	-	-	478.72
Proteína que contiene el dominio NmrA	OJJ65939	ANI_1_1408064	CPMP	PB	-	-	Cis	-	-	-	425.23
Proteína que contiene el dominio ACB	OJJ76458	ANI_1_400024	ST/RBP	TrA	-	-	Cito	-	-	-	414.38
Proteínas intracelulares 60-180 g/L											
Poliubiquitina *	OJJ70905	ANI_1_1056184	PCP	PB	-	-	Cito/nucl	-	-	-	1864.89
Malato deshidrogenasa *	OJJ69250	ANI_1_12134	CMP	OA	-	-	Cito	E	GH4	1.1.1.37	1279.30
Proteína disulfuro-isomerasa (EC 5.3.4.1)	OJJ75417	ANI_1_2048024	RBP/CH	IA	PS	-	-	E	-	5.3.4.1	651.53
Proteína de choque térmico 70 *	OJJ71843	ANI_1_720144	PF/RS/TR	PB	-	NCE	-	-	-	-	562.48

Tabla A8. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína reguladora SUAPRGA1 *	OJJ72054	ANI_1_370144	RBP	RB	-	-	Mito	-	-	-	460.66
Proteína de choque térmico 70 *	OJJ71513	ANI_1_1254144	PF/RS/TR	-	-	NCE	Cito	-	-	-	440.33
Proteína que contiene el dominio NAP *	OJJ68789	ANI_1_340154	OO	-	-	-	Nucl	-	-	-	383.15
Monooxigenasa de unión a flavina *	OJJ73792	-	Degradación de hidrocarburos	OA	-	-	-	E	AA3_1	-	373.89
Isomerasa disulfuro *	OJJ68207	ANI_1_240164	RBP/CH	IA	PS	-	-	E	-	5.3.4.1	358.29
Factor de alargamiento 1-alfa	OJJ70636	ANI_1_648164	-	HA/TRA/RB	-	-	Cito	-	-	-	347.80
Reticulo endoplásmico chaperón BiP	OJJ77809	ANI_1_578094	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	345.33
Proteína que contiene el dominio de unión al ARN *	OJJ66596	ANI_1_54104	RMP	RB	-	-	-	-	-	-	335.06
Translocasa ADP / ATP	OJJ70582	ANI_1_558164	Tr	TraA	-	CMC	Mito	-	-	-	334.70
Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2 * Proteína central del complejo ubiquinol-citocromo C reductasa 2 *	OJJ69297	ANI_1_872084	-	-	-	-	Mito	-	-	-	320.07
Histona H4	OJJ73517	ANI_1_974074	RMP	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	316.80
Sulfato adenililtransferasa (EC 2.7.7.4) (ATP-sulfurilasa) (Sulfato adenilato transferasa) (SAT)	OJJ78267	ANI_1_1260094	CAAMP	TrA/NA	-	-	-	E	-	2.7.7.4	315.16
Proteína que contiene el dominio de unión al ARN S4	OJJ75495	ANI_1_1908024	T	SMA/RB	-	-	Mito	-	-	-	302.77
Proteína que contiene dominio de tiorredoxina	OJJ71180	ANI_1_644184	RBP/CH	OA	-	-	-	E	-	-	295.63
Proteína ribosómica 60S L9-B *	OJJ74075	ANI_1_74074	T	SMA/RB	-	-	Mito	-	-	-	284.38
Proteína ribosomal 60S L20	OJJ75083	ANI_1_470014	T	SMA	-	-	-	-	-	-	269.69
Transcetolasa (EC 2.2.1.1)	OJJ73562	ANI_1_926074	-	TrA	-	-	Cito	E	-	2.2.1.1	268.03
Subunidad de ATP citrato liasa *	OJJ77483	ANI_1_78094	-	-	-	-	Cito	E	CBM27	2.3.3.8	252.29
Proteína EB1 *	OJJ76059	ANI_1_1074024	Citocinesis	PB	-	-	-	-	-	-	248.67
Ribosa / galactosa isomerasa *	OJJ76461	ANI_1_394024	CMP	IA	-	-	Cito	E	-	5.3.1.6	248.12
Proteína que contiene el dominio PH	OJJ74726	ANI_1_1054014	ST	-	-	-	-	-	-	-	234.94
Proteína UPF0662 *	OJJ70713	ANI_1_1440164	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	229.11
Subunidad beta de ATP sintasa (EC 7.1.2.2)	OJJ77150	-	Tr	TraA/TrA	-	-	Pero	E	-	7.1.2.2	219.18

Tabla A8. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Fosfotransferasa (EC 2.7.1.-)	OJJ75448	ANI_1_1984024	CMP/CH	TrA	-	-	-	E	-	2.7.1.-	208.48
ATP sintasa subunidad alfa	OJJ71674	ANI_1_984144	Tr	TraA/TrA	PS	CE	Cis	-	-	-	202.55
Proteína ribosómica 60S L27	OJJ70645	ANI_1_660164	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	201.40
Dioxigenasa de óxido nítrico	OJJ76992	ANI_1_366124	RS/Tr	TraA/OA	-	-	-	-	-	-	196.02
Proteína que contiene el dominio ribosomal_S7	OJJ74282	ANI_1_1784014	T	SMA/RB	-	-	-	-	-	-	195.51
Proteína que contiene el dominio KH tipo 2	OJJ70500	ANI_1_422164	T	SMA/RB	-	-	Mito	-	-	-	194.66
Proteína de la familia de la dihidrodipicolinato sintetasa *	OJJ71649	ANI_1_1986144	-	LyA	-	-	-	E	-	4.1.3.16	193.72
Proteína ribosómica 40S S16 *	OJJ76200	ANI_1_830024	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	188.18
proteína que contiene el dominio de homología de la bobina en espiral t-SNARE	OJJ66520	ANI_1_180104	VMT/Tr	-	-	-	-	-	-	-	185.56
Actina, gamma *	OJJ69199	ANI_1_106134	-	MA	-	-	Cis	-	-	-	179.39
Citocromo c oxidasa polipéptido VI mitocondrial *	OJJ75857	ANI_1_1402024	Tr	TraA/OA	-	-	Mito	-	-	-	178.13
Superfamilia ARF / SAR *	OJJ73804	ANI_1_528074	VMT/Tr/Cito cinesis y adhesión celular	HA	-	-	-	-	-	-	176.48
Subunidad de isocitrato deshidrogenasa [NAD], mitocondrial	OJJ73640	ANI_1_798074	-	OA	-	-	Mito	E	-	1.1.1.41	175.12
Proteína que contiene el dominio RRM	OJJ75650	ANI_1_1702024	-	RB	-	-	-	-	-	-	174.44
Histona H2B	OJJ78399	ANI_1_1488094	-	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	171.71
Cadena ligera reguladora de miosina cdc4 *	OJJ72299	ANI_1_204064	Citocinesis	Union a iones de Ca	-	-	-	-	-	-	171.13
Proteína que contiene el dominio CS	OJJ72956	ANI_1_1196064	Patogénesis	PB	-	-	-	-	-	-	169.59
Proteína ribosómica 40S S1	OJJ68799	-	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	169.49
Proteína que contiene el dominio Polysacc_synt_4	OJJ71151	ANI_1_682184	-	-	-	-	-	E	-	-	168.83
Piruvato quinasa (EC 2.7.1.40)	OJJ72920	ANI_1_1126064	CMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.7.1.40	163.54
Proteína que contiene el dominio ribosomal_L16	OJJ67318	ANI_1_628104	T	SMA	-	-	-	-	-	-	162.94
Proteína que contiene el dominio DUF1000 *	OJJ71119	ANI_1_732184	RBP/CH	OA	-	-	-	-	-	-	162.11
Proteína ribosomal 60S L6 *	OJJ73832	ANI_1_476074	T	SMA	-	-	-	-	-	-	160.52
Probable proteína ribosómica L35	OJJ73907	ANI_1_1772074	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	158.89

Tabla A8. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Subunidad de 34 kDa del complejo Arp2 / 3	OJJ74930	ANI_1_700014	RBP	PB	-	-	-	-	-	-	158.39
Proteína que contiene el dominio Ribosomal_L7Ae	OJJ67319	ANI_1_626104	-	RB	-	-	Mito	-	-	-	158.07
Homoserina deshidrogenasa (HDH) (EC 1.1.1.3)	OJJ76083	ANI_1_1030024	CAAMP	OA	PS	CE	Extra	E	-	1.1.1.3	157.76
Proteína ribosómica 60S L12 *	OJJ74995	ANI_1_614014	T	SMA	-	-	Cito	-	-	-	147.96
S-adenosilmetionina sintasa (EC 2.5.1.6)	OJJ73890	ANI_1_390074	CAAMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.5.1.6	146.84
Proteína YOP1	OJJ68705	ANI_1_196154	-	-	-	-	-	-	-	-	146.83
Proteína portadora de acilo	OJJ70695	ANI_1_744164	LMP	-	-	-	Mito	-	-	-	145.60
Subunidad del complejo citocromo b-c1 de Rieske, mitocondrial (EC 7.1.1.8)	OJJ77143	ANI_1_588124	-	OA	PS	-	Mito	E	-	7.1.1.8	145.23
Cistationina beta-sintasa *	OJJ75665	ANI_1_1676024	CAAMP	LyA	-	-	Nucl	E	-	-	139.08
Proteína que contiene el dominio de unión al ARNt	OJJ66878	ANI_1_846134	CPMP	RB	-	-	Cito	-	-	-	135.48
Adenilil-sulfato quinasa (EC 2.7.1.25)	OJJ73863	ANI_1_422074	CAAAMP	TrA	-	-	Mito	E	-	2.7.1.25	134.00
Proteína ribosómica S28e *	OJJ66734	ANI_1_152114	T	SMA	-	-	-	-	-	-	133.08
Subunidad F de ATPasa de protones de tipo V	OJJ76428	ANI_1_448024	Tr	TraA	-	-	-	E	-	-	129.48
Extra-intra 60-180 g/L(proteínas que son abundantes no reguladas de forma extracelular)											
Isomerasa putativa YbhE *	OJJ74153	ANI_1_1990014	-	IA	PS	CE	Extra	E	-	-	15311.43
Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	OJJ72473	ANI_1_470064	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.15.1.1	13398.31
Exo-inulinasa *	OJJ69961	ANI_1_2146104	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.80	10155.72
Proteína de organización de la pared celular anclada a GPI Ecm33 *	OJJ71393	ANI_1_278184	Adhesión/morfogénesis/patogénesis	-	PS	CMC	Extra	-	-	-	8857.59
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ67851	ANI_1_40174	-	TrA	PS	CMC	Extra	E	GH72	2.4.1.-	6235.11
Metionina sintasa independiente de cobalamina *	OJJ71337	ANI_1_372184	CAAMP	TrA	-	-	-	E	-	2.1.1.14	4272.23
Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)	OJJ72339	ANI_1_268064	CMP	OA	-	-	Cito	E	GH4	1.1.1.37	3691.14
Proteína que contiene el dominio NMT1	OJJ75817	ANI_1_1450024	VMP	-	-	-	Cito	-	-	-	3633.89
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ77799	ANI_1_554094	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	3501.03
Proteína que contiene el dominio ABM *	OJJ66778	ANI_1_222114	Biosíntesis de antibióticos	OA	-	-	Nucl	-	-	-	3488.50

Tabla A8. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Glucósido hidrolasa *	OJJ67987	ANI_1_668034	CMP	HA	PS	CMC	Extra	E	GH17	3.2.1.39	3171.37
Nucleósido difosfato quinasa (EC 2.7.4.6)	OJJ69367	ANI_1_746084	-	TrA	-	NCE	-	E	-	2.7.4.6	3129.05
Proteína que contiene el dominio tirosinasa_Cu-bd	OJJ74607	ANI_1_1250014	CAAMP	OA	PS	CE	Extra	E	GH5_22	1.14.18.1	2429.67
Trisafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)	OJJ77205	ANI_1_682124	CMP	IA	-	-	Pero	E	-	5.3.1.1	2338.27
Glutación S-transferasa *	OJJ67066	ANI_1_330164	RS	TrA	-	-	-	E	-	-	2268.91
Proteína que contiene el dominio GMC_OxRdtase_N	OJJ65853	ANI_1_1398064	-	OA	PS	CE	Extra	E	AA3_2	-	1979.85
Lactoilglutación liasa (EC 4.4.1.5) (Glioxalasa I)	OJJ77683	ANI_1_402094	CMP	LyA	-	-	-	E	-	4.4.1.5	1511.41
Terpenoide sintasa *	OJJ75814	ANI_1_1456024	LMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.5.1.1 2.5.1.10	1478.67
Proteína fijadora de ácidos nucleicos *	OJJ68532	ANI_1_472034	DMP	DB	-	-	Mito	-	-	-	1372.60
Extra-intra 60-180 g/L (proteínas que son abundantes no reguladas de forma intracelular)											
Isomerasa putativa YbhE *	OJJ74153	ANI_1_1990014	-	IA	PS	CE	Extra	E	-	-	15311.43
Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	OJJ72473	ANI_1_470064	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.15.1.1	13398.31
Exo-inulinasa *	OJJ69961	ANI_1_2146104	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.80	10155.72
Proteína de organización de la pared celular anclada a GPI Ecm33 *	OJJ71393	ANI_1_278184	Adhesión/m orfogénesis/ patogénesis	-	PS	CMC	Extra	-	-	-	8857.59
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ67851	ANI_1_40174	-	TrA	PS	CMC	Extra	E	GH72	2.4.1.-	6235.11
Metionina sintasa independiente de cobalamina *	OJJ71337	ANI_1_372184	CAAMP	TrA	-	-	-	E	-	2.1.1.14	4272.23
Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)	OJJ72339	ANI_1_268064	CMP	OA	-	-	Cito	E	GH4	1.1.1.37	3691.14
Proteína que contiene el dominio NMT1	OJJ75817	ANI_1_1450024	VMP	-	-	-	Cito	-	-	-	3633.89
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ77799	ANI_1_554094	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	3501.03
Proteína que contiene el dominio ABM *	OJJ66778	ANI_1_222114	Biosíntesis de antibióticos	OA	-	-	Nucl	-	-	-	3488.50
Glucósido hidrolasa *	OJJ67987	ANI_1_668034	CMP	HA	PS	CMC	Extra	E	GH17	3.2.1.39	3171.37
Nucleósido difosfato quinasa (EC 2.7.4.6)	OJJ69367	ANI_1_746084	-	TrA	-	NCE	-	E	-	2.7.4.6	3129.05
Proteína que contiene el dominio tirosinasa_Cu-bd	OJJ74607	ANI_1_1250014	CAAMP	OA	PS	CE	Extra	E	GH5_22	1.14.18.1	2429.67
Trisafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)	OJJ77205	ANI_1_682124	CMP	IA	-	-	Pero	E	-	5.3.1.1	2338.27

Tabla A8. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Glutación S-transferasa *	OJJ67066	ANI_1_330164	RS	TrA	-	-	-	E	-	-	2268.91
Proteína que contiene el dominio GMC_OxRdtase_N	OJJ65853	ANI_1_1398064	-	OA	PS	CE	Extra	E	AA3_2	-	1979.85
Lactoilglutación liasa (EC 4.4.1.5) (Glioxalasa I)	OJJ77683	ANI_1_402094	CMP	LyA	-	-	-	E	-	4.4.1.5	1511.41
Terpenoide sintasa *	OJJ75814	ANI_1_1456024	LMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.5.1.1 2.5.1.10	1478.67
Proteína fijadora de ácidos nucleicos *	OJJ68532	ANI_1_472034	DMP	DB	-	-	Mito	-	-	-	1372.60

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidorreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en "Pipeline computacional" de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas.

13.9. Anexo 9

Tabla A9. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend ⁱ	R ² ^j
Proteínas extracelulares 20-60 g/L													
Proteína que contiene el dominio hidrolasa_4	OJJ67062	ANI_1_1218164	-	HA	PS	NCE	Extra	E	-	-	5656.84	-0.48	0.99
Endo-1,4-beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)	OJJ75322	ANI_1_94014	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH11	3.2.1.8	3957.32	0.65	0.91
Proteína de la familia del dominio del factor de transcripción específico de hongos *	OJJ66777	ANI_1_220114	TDT	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2170.28	1.09	0.93
Proteína de la pared celular PhiA *	OJJ76937	ANI_1_280124	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2056.68	0.34	0.98
Beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)	OJJ68396	ANI_1_106034	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH10	3.2.1.8	1485.27	0.91	1.00
1,4-beta-D-arabinoxilano arabinofuranohidrolasa axhA *	OJJ68397	ANI_1_108034	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH62	-	971.67	0.55	1.00
Proteína no caracterizada	OJJ76575	ANI_1_198024	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	910.67	0.93	0.98
Proteína que contiene el dominio CVNH	OJJ74889	ANI_1_766014	Actividad viricida	Unión a carbohidratos	-	-	-	-	-	-	814.55	0.33	1.00
Proteína que contiene el dominio Aamy	OJJ69630	ANI_1_362084	CMP	HA	PS	CMC	Extra	E	GH13_1	3.2.1.1	730.89	0.98	0.90
Proteína no caracterizada	OJJ66074	ANI_1_2094	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	609.08	-0.64	0.99
Proteína que contiene el dominio de tipo 1 que se une a la quitina	OJJ75520	ANI_1_3276024	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH18	-	429.79	0.98	0.82
Proteína quinasa activada por mitógenos hog1 *	OJJ72482	ANI_1_482064	ST/RBP/C PMP	PKA/TrA	PS	CE	Extra	E	-	-	267.32	0.37	0.95
Proteínas intracelulares 20-60 g/L													
Arginina succinato liasa *	OJJ74840	ANI_1_850014	CAAMP	LyA	-	-	-	E	-	4.3.2.1	988.63	0.92	0.82
Proteína disulfuro-isomerasa (EC 5.3.4.1)	OJJ75417	ANI_1_2048024	RBP/CH	IA	PS	-	-	E	-	5.3.4.1	969.48	1.38	0.89
Proteína que contiene el dominio SOR_SNZ	OJJ68552	ANI_1_504034	VMP	-	-	-	-	E	-	4.3.3.6	819.39	1.50	0.77
Chaperona BiP de retículo endoplásmico	OJJ71843	ANI_1_720144	PF	PB	-	NCE	-	-	-	-	783.21	0.74	0.95
Proteína reguladora SUAPRGA1 *	OJJ72054	ANI_1_370144	RBP	RB	-	-	Mito	-	-	-	587.69	1.14	0.97
Monooxigenasa de unión a flavina *	OJJ73792	-	degradación de hidrocarburos	OA	-	-	-	E	AA3_1	-	546.63	-1.27	0.99

Tabla A9. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend ⁱ	R ² ^j
Chaperona molecular de tipo DnaK bipA *	OJJ77809	ANI_1_578094	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	496.67	1.38	0.93
Proteína que contiene dominio de unión al ARN *	OJJ66596	ANI_1_54104	RMP	RB	-	-	-	-	-	-	449.01	0.64	1.00
Proteína de choque térmico 70 *	OJJ71513	ANI_1_1254144	PF	PB	-	NCE	Cito	-	-	-	431.16	0.98	1.00
Histona H4	OJJ73517	ANI_1_974074	RMP	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	423.59	0.74	0.79
Proteína central del complejo ubiquinol-citocromo C reductasa 2 *	OJJ69297	ANI_1_872084	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	415.37	-1.40	0.81
Subunidad de ATP citrato liasa *	OJJ77483	ANI_1_78094	CMP	LyA	-	-	Cito	E	CBM2 Z	2.3.3.8	337.49	1.17	0.97
Disulfuro isomerasa *	OJJ68207	ANI_1_240164	RBP/CH	IA	PS	-	-	E	-	5.3.4.1	322.96	0.50	0.99
Proteína UPF0662 *	OJJ70713	ANI_1_1440164	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	313.80	0.95	1.00
Dioxigenasa de óxido nítrico	OJJ76992	ANI_1_366124	RS	TraA/OA	-	-	-	E	-	-	312.69	0.54	0.92
Proteína que contiene el dominio PH	OJJ74726	ANI_1_1054014	ST	-	-	-	-	-	-	-	301.25	0.61	1.00
Proteína que contiene el dominio de unión al ARN S4	OJJ75495	ANI_1_1908024	T	SMA/RB	-	-	Mito	-	-	-	281.22	0.65	0.80
Subunidad 4 del complejo de proteína 2/3 relacionada con la actina	OJJ69954	ANI_1_1012104	RBP	PB	-	-	Mito	-	-	-	275.92	1.20	0.91
Proteína que contiene el dominio CS	OJJ72956	ANI_1_1196064	patogénesis	PB	-	-	-	-	-	-	247.16	1.22	0.99
Proteína que contiene el dominio NAP *	OJJ68789	ANI_1_340154	OO	-	-	-	Nucl	-	-	-	242.54	1.42	0.94
Adenilo succinato liasa (ASL) (EC 4.3.2.2) (Adenilo succinasa)	OJJ76364	ANI_1_548024	-	LyA	-	-	-	E	-	4.3.2.2	229.81	0.82	1.00
Ribosa/galactosa isomerasa *	OJJ76461	ANI_1_394024	CMP	IA	-	-	Cito	E	-	5.3.1.6	211.79	0.99	1.00
Subunidad zeta de Coatomer	OJJ67321	ANI_1_622104	VMT/Tr	-	-	-	Cito	-	-	-	210.60	1.05	0.96
Transcetolasa (EC 2.2.1.1)	OJJ73562	ANI_1_926074	-	TrA	-	-	Cito	E	-	2.2.1.1	205.79	1.34	0.97
Proteína portadora de acilo	OJJ70695	ANI_1_744164	LMP	-	-	-	Mito	-	-	-	202.29	0.43	0.80
Subunidad Rieske del complejo citocromo b-c1, mitocondrial (EC 7.1.1.8)	OJJ77143	ANI_1_588124	-	OA	-	-	Mito	E	-	7.1.1.8	199.29	1.30	0.96
Subunidad F de ATPasa de protones de tipo V	OJJ76428	ANI_1_448024	Tr	TraA	-	-	-	-	-	-	197.54	1.47	0.82
Proteína que contiene el dominio iso_dh	OJJ69024	ANI_1_398134	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.1.1.87	195.12	1.11	0.99
Acetil-CoA acetiltransferasa *	OJJ71519	ANI_1_1242144	-	TrA	-	-	-	E	-	2.3.1.9	193.08	0.63	0.98

Tabla A9. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend ⁱ	R ² ^j
Proteína no caracterizada	OJJ73907	ANI_1_1772074	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	191.25	0.99	0.79
Subunidad de isocitrato deshidrogenasa [NAD], mitocondrial	OJJ73640	ANI_1_798074	-	OA	-	-	Mito	E	-	1.1.1.41	189.84	1.35	1.00
Tropomiosina *	OJJ66704	ANI_1_102114	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	182.92	0.73	0.90
Proteína que contiene el dominio de homología de la bobina en espiral t-SNARE	OJJ66520	ANI_1_180104	VMT/Tr	-	-	-	-	-	-	-	177.75	0.62	0.99
Proteína que contiene el dominio ATPasa similar a la actina *	OJJ72715	ANI_1_810064	OO	PB	-	-	Cito	-	-	-	171.20	1.36	0.87
Proteína que contiene el dominio CRAL-TRIO	OJJ77319	ANI_1_852124	Tr	-	-	-	-	-	-	-	149.24	0.65	1.00
Proteína que contiene el dominio conjugador de ubiquitina E2	OJJ78018	ANI_1_920094	-	TrA	-	-	-	E	-	2.3.2.23	146.85	1.25	1.00
Cistationina beta-sintasa *	OJJ75665	ANI_1_1676024	CAAMP	LyA	-	-	Nucl	E	-	-	146.68	0.63	0.98
Corismato mutasa *	OJJ77300	ANI_1_824124	CAAMP	IA	-	-	-	E	-	5.4.99.5	144.11	0.41	0.99
Proteína de fusión vesicular Sec17 *	OJJ76572	ANI_1_206024	Tr	PB	-	-	Nucl	E	GT41	-	143.72	0.56	0.77
Extra-intra 20-60 g/L (proteínas que son abundantes y reguladas de forma extracelular)													
Isomerasa putativa YbhE *	OJJ74153	ANI_1_1990014	-	-	PS	CE	Extra	E	-	-	11015.58	-0.51	0.99
Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	OJJ72473	ANI_1_470064	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.15.1.1	8939.42	0.86	0.99
Exo-inulinasa *	OJJ69961	ANI_1_2146104	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.80	8680.95	0.80	1.00
Peroxiredoxina (EC 1.11.1.15)	OJJ69946	ANI_1_1024104	RBP/CH	OA	-	-	Cito	E	-	1.11.1.15	5420.18	0.86	0.81
Proteína Ecm33 de organización de la pared celular anclada a GPI *	OJJ71393	ANI_1_278184	adhesión/morfogénesis/patogénesis	-	PS	CMC	Extra	-	-	-	5172.96	0.86	0.80
Proteína que contiene el dominio Pyr_redox_2	OJJ69362	ANI_1_1516084	síntesis de micotoxinas	OA	PS	CMC	Extra	E	AA3_1	-	4493.79	0.56	0.85
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ67851	ANI_1_40174	-	TrA	PS	CMC	Extra	E	GH72	2.4.1.-	4202.91	0.20	1.00
Triosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)	OJJ77205	ANI_1_682124	CMP	IA	-	-	Pero	E	-	5.3.1.1	3757.11	0.73	1.00
Proteína que contiene el dominio peptidasa S53	OJJ76993	ANI_1_368124	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.14.9	2959.33	0.43	0.99
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ77535	ANI_1_172094	CMP	OA	-	NCE	Cito	E	-	1.1.1.372	2721.32	0.34	1.00
Purina nucleósido permeasa *	OJJ67881	ANI_1_220174	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2102.16	0.74	0.97

Tabla A9. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend ⁱ	R ² ^j
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ74808	ANI_1_910014	CMP	OA	-	-	Cito	E	-	-	2008.00	0.80	0.99
Proteína que contiene el dominio GMC_OxRdtase_N	OJJ65853	ANI_1_1398064	-	OA	PS	CE	Extra	E	AA3_2	-	1742.89	1.07	0.99
Proteína similar a YjgF *	OJJ66611	ANI_1_1302104	Metabolismo de enamina	HA	-	-	Cito	E	-	-	1674.64	0.42	1.00
Proteína que contiene el dominio tirosinasa_Cu-bd	OJJ74607	ANI_1_1250014	CAAMP	OA	PS	CE	Extra	E	GH5_2	1.14.18.1	1527.55	0.80	0.99
Enolasa *	OJJ70755	ANI_1_828164	CMP	LyA	-	-	Cito	E	-	4.2.1.11	1499.75	0.33	0.97
Proteína que contiene el dominio GH26	OJJ67015	ANI_1_1806134	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH26	3.2.1.78	1217.54	0.24	0.94
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ77799	ANI_1_554094	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	1158.88	0.78	0.97
Invertasa extracelular *	OJJ67564	ANI_1_2508074	CMP	HA	-	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.26	1033.80	0.61	0.89
Extra-intra 20-60 g/L (proteínas que son abundantes y reguladas de forma intracelular)													
Isomerasa putativa YbhE *	OJJ74153	ANI_1_1990014	-	-	PS	CE	Extra	E	-	-	11015.58	-0.51	0.99
Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	OJJ72473	ANI_1_470064	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.15.1.1	8939.42	0.86	0.99
Exo-inulinasa *	OJJ69961	ANI_1_2146104	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.80	8680.95	1.11	1.00
Peroxiredoxina (EC 1.11.1.15)	OJJ69946	ANI_1_1024104	RBP/CH	OA	-	-	Cito	E	-	1.11.1.15	5420.18	0.75	0.81
Proteína Ecm33de organización de la pared celular anclada a GPI *	OJJ71393	ANI_1_278184	adhesión/morfogénesis/patogénesis	-	PS	CMC	Extra	-	-	-	5172.96	0.80	0.80
Proteína que contiene el dominio Pyr_redox_2	OJJ69362	ANI_1_1516084	síntesis de micotoxinas	OA	PS	CMC	Extra	E	AA3_1	-	4493.79	0.89	0.85
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ67851	ANI_1_40174	-	TrA	PS	CMC	Extra	E	GH72	2.4.1.-	4202.91	1.32	1.00
Triosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)	OJJ77205	ANI_1_682124	CMP	IA	-	-	Pero	E	-	5.3.1.1	3757.11	0.86	1.00
Proteína que contiene el dominio peptidasa S53	OJJ76993	ANI_1_368124	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.14.9	2959.33	0.86	0.99
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ77535	ANI_1_172094	CMP	OA	-	NCE	Cito	E	-	1.1.1.372	2721.32	0.56	1.00
Purina nucleósido permeasa *	OJJ67881	ANI_1_220174	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2102.16	0.20	0.97
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ74808	ANI_1_910014	CMP	OA	-	-	Cito	E	-	-	2008.00	0.73	0.99
Proteína que contiene el dominio GMC_OxRdtase_N	OJJ65853	ANI_1_1398064	-	OA	PS	CE	Extra	E	AA3_2	-	1742.89	0.43	0.99

Tabla A9. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend ⁱ	R ² ^j
Proteína similar a YjgF *	OJJ66611	ANI_1_1302104	metabolismo de enamina	HA	-	-	Cito	E	-	-	1674.64	0.34	1.00
Proteína que contiene el dominio tirosinasa_Cu-bd	OJJ74607	ANI_1_1250014	CAAMP	OA	PS	CE	Extra	E	GH5_2_2	1.14.18.1	1527.55	0.74	0.99
Enolasa *	OJJ70755	ANI_1_828164	CMP	LyA	-	-	Cito	E	-	4.2.1.11	1499.75	0.80	0.97
Peptidil-prolil cis-trans-isomerasa (PPIasa) (EC 5.2.1.8)	OJJ71308	ANI_1_428184	PF/CPMP	IA	PS	-	-	E	-	5.2.1.8	1376.58	1.07	0.87
Chaperona molecular Hsp70 *	OJJ73019	ANI_1_2182064	PF/VMT/R S	HA/PB	PS	CE	Cito	-	-	-	1243.16	0.42	1.00
Proteína que contiene el dominio GH26	OJJ67015	ANI_1_1806134	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH26	3.2.1.78	1217.54	0.80	0.94
Proteína que contiene el dominio HATPase_c	OJJ69302	ANI_1_860084	PF	PB	-	-	-	-	-	-	1194.31	0.33	0.84
Proteína no caracterizada	OJJ73826	ANI_1_488074	-	TRA/RB	-	-	Cito	-	-	-	1181.50	0.24	0.87
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ77799	ANI_1_554094	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	1158.88	0.78	0.97
Invertasa extracelular *	OJJ67564	ANI_1_2508074	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.26	1033.80	0.61	0.89

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidoreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en "Pipeline computacional" de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas. ⁱ Pend= pendiente resultante de graficar los valores normalizados de la CEP en función de la concentración de sacarosa, (-) bajo-regulación y (+) sobre-regulación. ^j R²= coeficiente de determinación, (R²>0.75) proteínas son reguladas.

13.10. Anexo 10

Tabla A10. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend _i	R ² _j
Proteínas extracelulares 60-180 g/L													
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ78207	ANI_1_766034	-	TrA	PS	CMC	Extra	E	GH72	2.4.1.-	1940.27	1.36	0.83
Beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)	OJJ68396	ANI_1_106034	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH10	3.2.1.8	1147.01	-1.23	0.86
Endoglucanasa A *	OJJ77019	ANI_1_398124	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH12	3.2.1.151	981.67	-1.50	0.98
1,4-beta-D-arabinosilano arabinofuranohidrolasa axhA *	OJJ68397	ANI_1_108034	CMP	HA	-	CE	Extra	E	GH62	-	967.26	-0.97	0.99
Proteína no caracterizada	OJJ68408	ANI_1_1314024	CMP	IA	PS	CE	Extra	E	-	5.1.3.3	823.56	1.36	0.95
Proteína no caracterizada	OJJ66074	ANI_1_2094	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	751.49	-0.77	0.99
Proteína no caracterizada	OJJ72114	ANI_1_260144	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	502.13	-1.50	0.98
Proteínas intracelulares 60-180 g/L													
Proteína que contiene el dominio SOR_SNZ	OJJ68552	ANI_1_504034	VMP	-	-	-	-	E	-	4.3.3.6	492.61	-1.38	0.86
Argininosuccinato liasa *	OJJ74840	ANI_1_850014	CAAMP	LyA	-	-	-	E	-	4.3.2.1	437.46	-1.50	0.76
Tropomiosina *	OJJ66704	ANI_1_102114	OO	-	-	-	Nucl	-	-	-	352.30	0.88	0.93
Proteína que contiene el dominio ribosomal_L23eN	OJJ68779	ANI_1_322154	T	SMA	-	-	-	-	-	-	319.64	1.50	0.89
Subunidad 4 del complejo de proteína 2/3 relacionada con la actina	OJJ69954	ANI_1_1012104	RBP	PB	-	-	Mito	-	-	-	233.52	-1.25	0.94
Oxalacetato acetilhidrolasa *	OJJ67883	ANI_1_92174	CMP	HA	-	-	Cis	E	-	-	232.18	-1.46	0.85
NADH-citocromo b5 reductasa (EC 1.6.2.2)	OJJ75084	ANI_1_468014	LMP/RS	OA	-	-	-	E	-	1.6.2.2	229.24	-1.50	0.80
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12)	OJJ72116	ANI_1_256144	CMP	OA	-	-	Cito	E	-	1.2.1.12	222.49	1.201	0.99
UTP - glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (EC 2.7.7.9)	OJJ66556	ANI_1_120104	CMP	TrA/NA	-	CMC	-	E	-	2.7.7.9	212.08	-1.41	0.81
Proteína de resistencia al cobre Crd2 *	OJJ76801	ANI_1_96124	ST	-	-	-	-	-	-	-	198.05	-1.50	0.87
Proteína que contiene el dominio ribosomal_S13_N	OJJ72401	ANI_1_354064	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	183.51	0.55	0.84
Proteína que contiene el dominio TPR_REGION	OJJ66560	ANI_1_116104	RBP	-	-	-	-	E	GT41	-	176.98	-0.91	0.88
Proteína ribosómica ácida 60S P0	OJJ75039	ANI_1_540014	-	-	-	-	-	-	-	-	175.11	0.65	0.97

Tabla A10. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend _i	R ² _j
Corismato mutasa *	OJJ77300	ANI 1_824124	CAAMP	IA	-	-	-	E	-	5.4.99.5	145.12	-1.23	0.90
Adenilosuccinato liasa (ASL) (EC 4.3.2.2) (Adenilosuccinasa)	OJJ76364	ANI 1_548024	-	LyA	-	-	-	E	-	4.3.2.2	137.20	-1.50	0.82
Proteína que contiene el dominio iso_dh	OJJ69024	ANI 1_398134	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.1.1.87	134.89	-1.44	0.91
Extra-intra 60-180 g/L (proteínas que son abundantes y reguladas de forma extracelular)													
Peroxi-redoxina (EC 1.11.1.15)	OJJ69946	ANI 1_1024104	RBP/CH	OA	-	-	Cito	E	-	1.11.1.15	15390.39	1.16	0.99
Transaldolasa (EC 2.2.1.2)	OJJ72476	ANI 1_472064	CMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.2.1.2	12622.51	1.20	0.90
Glucosa oxidasa *	OJJ74152	ANI 1_1992014	-	OA	PS	-	Nucl	E	AA3_2	-	10727.95	1.32	0.99
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ77535	ANI 1_172094	-	OA	-	NCE	Cito	E	-	1.1.1.372	8602.97	1.12	0.87
14_3_3 proteína que contiene el dominio	OJJ72815	ANI 1_962064	ST	PB	-	-	Cito	-	-	-	8327.80	-1.26	0.76
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ74808	ANI 1_910014	-	OA	-	-	Cito	E	-	-	7259.65	1.18	0.99
Glutamato deshidrogenasa	OJJ71413	ANI 1_248184	CAAMP	OA	-	-	Cito	E	-	1.4.1.4	5084.18	1.27	0.94
Proteína que contiene el dominio Pyr_redox_2	OJJ69362	ANI 1_1516084	Producción de micotoxinas	OA	PS	CMC	Extra	E	AA3_1	-	4856.81	-0.12	0.94
14_3_3 proteína que contiene el dominio	OJJ70757	ANI 1_832164	ST	PB	-	-	-	-	-	-	4706.30	-1.35	0.89
Tiorredoxina reductasa (EC 1.8.1.9)	OJJ74669	ANI 1_1148014	-	OA	-	-	Cito	E	AA3	1.8.1.9	4599.67	1.47	0.86
Proteína similar a YjgF *	OJJ66611	ANI 1_1302104	Metabolismo de enamina	HA	-	-	Cito	E	-	-	4513.81	1.04	0.99
Proteína similar a YjgF *	OJJ66611	ANI 1_1302104	Metabolismo de enamina	HA	-	-	Cito	E	-	-	4513.81	1.04	0.99
Difosfatasa inorgánica *	OJJ75670	ANI 1_1668024	-	HA	-	-	Cito	E	-	3.6.1.1	3991.93	0.70	0.76
Catalasa (EC 1.11.1.6)	OJJ75244	ANI 1_2296014	RS	OA	PS	CE	Extra	E	-	1.11.1.6	3582.74	1.27	1.00
Proteína que contiene el dominio de la peptidasa A1	OJJ76103	ANI 1_994024	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.23.25	3054.40	1.10	0.84
Proteína que contiene el dominio PABS	OJJ73563	ANI 1_924074	-	TrA	-	-	Nucl	E	-	2.5.1.16	2874.51	1.09	0.84
Proteína que contiene el dominio peptidasa S53	OJJ76993	ANI 1_368124	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.14.9	2692.65	-0.91	0.98
Purina nucleósido permeasa *	OJJ67881	ANI 1_220174	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2159.41	-0.34	0.90
Serina proteinasa *	OJJ72478	ANI 1_476064	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.21.48	2157.52	1.27	1.00

Tabla A10. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend _i	R ² _j
Proteína que contiene el dominio de unión a FAD / NAD (P) *	OJJ75961	ANI_1_1240024	-	IA	-	-	Mito	E	-	-	2130.32	1.37	0.91
Proteína que contiene el dominio Inos-1-P_synth	OJJ67865	ANI_1_60174	CMP/LMP	IA	-	-	-	E	-	5.5.1.4	1946.95	1.11	0.99
Proteína que contiene el dominio ML	OJJ76427	ANI_1_450024	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	1609.96	0.31	0.94
Endo-inulinasa *	OJJ73755	ANI_1_1796094	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.7	1532.46	1.11	1.00
Ribosa 5-fosfato isomerasa A *	OJJ77477	ANI_1_68094	-	IA	-	-	Cito	E	-	5.3.1.6	1484.81	1.04	0.94
Alfa/beta-hidrolasa *	OJJ72111	ANI_1_266144	LMP	HA	PS	CMC	Extra	E	-	-	1401.22	-1.18	0.86
Catalasa (EC 1.11.1.6)	OJJ75269	ANI_1_2270014	RS	OA	PS	CE	Extra	E	-	1.11.1.6	1363.01	1.22	0.88
Enolasa *	OJJ70755	ANI_1_828164	CMP	LyA	-	-	Cito	E	-	4.2.1.11	1352.47	-1.39	0.91
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ72358	ANI_1_298064	Redox	OA	PS	CE	Extra	E	AA7	-	1321.36	1.19	0.90
Extra-intra 60-180 g/L (proteínas que se son abundantes y reguladas de forma intracelular)													
Peroxiredoxina (EC 1.11.1.15)	OJJ69946	ANI_1_1024104	RBP/CH	OA	-	-	Cito	E	-	1.11.1.15	15390.39	1.16	0.99
Transaldolasa (EC 2.2.1.2)	OJJ72476	ANI_1_472064	CMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.2.1.2	12622.51	1.20	0.90
Glucosa oxidasa *	OJJ74152	ANI_1_1992014	-	OA	PS	-	Nucl	E	AA3_2	-	10727.95	1.32	0.99
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ77535	ANI_1_172094	-	OA	-	NCE	Cito	E	-	1.1.1.372	8602.97	1.120	0.87
14_3_3 proteína que contiene el dominio	OJJ72815	ANI_1_962064	ST	PB	-	-	Cito	-	-	-	8327.80	-1.26	0.76
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ74808	ANI_1_910014	-	OA	-	-	Cito	E	-	-	7259.65	1.14	0.99
Glutamato deshidrogenasa	OJJ71413	ANI_1_248184	CAAMP	OA	-	-	Cito	E	-	1.4.1.4	5084.18	1.27	0.94
Proteína que contiene el dominio Pyr_redox_2	OJJ69362	ANI_1_1516084	Producción de micotoxinas	OA	PS	CMC	Extra	E	AA3_1	-	4856.81	-0.12	0.94
14_3_3 proteína que contiene el dominio	OJJ70757	ANI_1_832164	ST	PB	-	-	-	-	-	-	4706.30	-1.35	0.89
Tiorredoxina reductasa (EC 1.8.1.9)	OJJ74669	ANI_1_1148014	-	OA	-	-	Cito	E	AA3	1.8.1.9	4599.67	1.47	0.86
Proteína similar a YjgF *	OJJ66611	ANI_1_1302104	Metabolismo de enamina	HA	-	-	Cito	E	-	-	4513.81	1.04	0.99
Difosfatasa inorgánica *	OJJ75670	ANI_1_1668024	-	HA	-	-	Cito	E	-	3.6.1.1	3991.93	0.70	0.76
Catalasa (EC 1.11.1.6)	OJJ75244	ANI_1_2296014	RS	OA	PS	CE	Extra	E	-	1.11.1.6	3582.74	1.27	1.00

Tabla A10. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CMS con 60 a 180 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend ⁱ	R ² ^j
Proteína que contiene el dominio de la peptidasa A1	OJJ76103	ANI_1_994024	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.23.25	3054.40	1.10	0.84
Proteína que contiene el dominio PABS	OJJ73563	ANI_1_924074	-	TrA	-	-	Nucl	E	-	2.5.1.16	2874.51	1.09	0.84
Proteína que contiene el dominio peptidasa S53	OJJ76993	ANI_1_368124	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.14.9	2692.65	-0.91	0.98
Purina nucleósido permeasa *	OJJ67881	ANI_1_220174	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2159.41	-0.34	0.90
Serina proteinasa *	OJJ72478	ANI_1_476064	PCP	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.21.48	2157.52	1.27	1.00
Proteína que contiene el dominio de unión a FAD / NAD (P) *	OJJ75961	ANI_1_1240024	-	IA	-	-	Mito	E	-	-	2130.32	1.37	0.91
Proteína que contiene el dominio Inos-1-P _{synth}	OJJ67865	ANI_1_60174	CMP/LMP	IA	-	-	-	E	-	5.5.1.4	1946.95	1.11	0.99
Proteína que contiene el dominio ML	OJJ76427	ANI_1_450024	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	1609.96	0.31	0.94
Ribosa 5-fosfato isomerasa A *	OJJ77477	ANI_1_68094	-	IA	-	-	Cito	E	-	5.3.1.6	1484.81	1.04	0.94
Alfa / beta-hidrolasa *	OJJ72111	ANI_1_266144	LMP	HA	PS	CMC	Extra	E	-	-	1401.22	-1.18	0.86
Catalasa (EC 1.11.1.6)	OJJ75269	ANI_1_2270014	RS	OA	PS	CE	Extra	E	-	1.11.1.6	1363.01	1.22	0.88
Enolasa *	OJJ70755	ANI_1_828164	CMP	LyA	-	-	Cito	E	-	4.2.1.11	1352.47	-1.39	0.91
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ72358	ANI_1_298064	Redox	OA	PS	CE	Extra	E	AA7	-	1321.36	1.19	0.90

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidorreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en "Pipeline computacional" de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas. ⁱ Pend= pendiente resultante de graficar los valores normalizados de la CEP en función de la concentración de sacarosa, (-) bajo-regulación y (+) sobre-regulación. ^j R²= coeficiente de determinación, (R²>0.75) proteínas son reguladas.

13.11. Anexo 11

Tabla A11. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas únicas extracelulares (40 g/L)											
Dioxigenasa del catabolismo de la Taurina (TauD), proteína de la familia TfdA*	OJJ68132	-	RS	OA	PS	-	Extra	-	-	-	9.12
Proteína no caracterizada	OJJ73064	-	-	-	PS	-	Extra	-	-	-	6.21
Proteína no caracterizada	OJJ72114	ANI 1_260144	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2.78
Proteína que contiene el dominio Sod_Cu	OJJ73793	ANI 1_1888074	RS	OA	PS	CE	Extra	-	-	-	2.30
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ75915	ANI 1_2862024	-	TrA	PS	-	Plas	E	GH72	-	2.19
Endopoligalacturonasa A *	OJJ74131	ANI 1_3416014	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	-	-	2.17
Enzima lactonizante 3-carboxi-cis, cis-muconato *	OJJ74833	ANI 1_2640014	Hidrocarburos	IA	PS	CE	Extra	E	-	-	2.16
Proteína que contiene el dominio F5 / 8 tipo C	OJJ68130	ANI 1_330114	CMP	-	PS	CE	Extra	E	GH142	-	1.27
Proteína que contiene el dominio DUF1793 *	OJJ75506	ANI 1_3296024	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	1.25
Proteína que contiene el dominio Glyco_hydro_18	OJJ69363	ANI 1_1514084	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH18	3.2.1.14	1.20
Proteína que contiene un dominio similar a la flavodoxina	OJJ74942	ANI 1_2538014	-	OA	-	-	-	E	AA6	1.6.5.2	1.06
Proteínas únicas extracelulares (60 g/L)											
Tiorredoxina	OJJ75173	ANI 1_326014	RBP/CH	OA	-	-	Cito	-	-	-	3.46
Proteína de la familia nuclear YL1 *	OJJ75468	ANI 1_1954024	TDT	DB	-	-	-	-	-	-	2.86
Proteína no caracterizada	OJJ67898	ANI 1_242174	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	2.49
Proteína que contiene el dominio lipasa_3	OJJ67370	ANI 1_4084	LMP	HA	PS	CE	Extra	E	-	3.1.1.73	1.99
Proteína que contiene el dominio de unión a FAD / NAD (P) *	OJJ75961	ANI 1_1240024	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	1.75
Glutación reductasa (EC 1.8.1.7)	OJJ68507	ANI 1_432034	RBP/CH	OA	-	NCE	Mito	E	AA3_1	1.8.1.7	1.67
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ77799	ANI 1_554094	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	1.48
Proteína que contiene el dominio amb_all	OJJ77163	ANI 1_624124	CMP	LyA	PS	CE	Extra	E	PL1_4	4.2.2.10	1.48
Proteína que contiene el dominio DLH	OJJ69906	-	-	HA	-	-	Mito	-	-	-	1.30
Proteína que contiene el dominio PABS	OJJ73563	ANI 1_924074	CAAMP	TrA	-	-	Nucl	E	-	2.5.1.16	1.27
Proteína de la familia de la deshidratasa *	OJJ70578	ANI 1_552164	CAAMP	-	-	-	-	E	-	-	1.24

Tabla A11. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene el dominio alfa-L-AF_C	OJJ68574	ANI_1_1010084	CMP	HA	PS	NCE	Extra	E	GH51	3.2.1.55	1.19
Proteína de dominio DUF1348 *	OJJ69948	ANI_1_1020104	-	-	-	-	-	-	-	-	1.19
Proteína de la familia Duo1 de la subunidad del complejo DASH *	OJJ71902	ANI_1_622144	-	-	-	CMC	Plas	-	-	-	1.05
Glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa (EC 2.3.1.4)	OJJ69988	ANI_1_2130104	NM	TrA	-	NCE	Cis	E	-	2.3.1.4	1.04
Tiorredoxina reductasa (EC 1.8.1.9)	OJJ74669	ANI_1_1148014	-	OA	-	-	Cito	E	AA3	1.8.1.9	1.02
Proteínas únicas intracelulares (20 g/L)											
Proteína que contiene un dominio similar a la ubiquitina	OJJ76119	ANI_1_964024	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	99.30
Proteína ribosomal L27 de subunidad 60S	OJJ70645	ANI_1_660164	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	53.10
Proteína que contiene el dominio ribosomal_L16	OJJ67318	ANI_1_628104	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	24.30
Proteína ribosomal L19	OJJ67463	ANI_1_72044	T	SMA/RB	-	-	Ribo	-	-	-	23.50
Proteína del dominio BAP31 *	OJJ74305	ANI_1_1740014	Tr	-	-	CMC	Plas	-	-	-	19.50
proteína YOP1	OJJ68705	ANI_1_196154	-	-	-	-	Plas	-	-	-	15.10
Proteína que contiene el dominio ribosomal_S10	OJJ72734	ANI_1_1944064	T	SMA/RB	-	-	Ribo	-	-	-	13.70
Ribonucleoproteína nuclear pequeña Sm D3 (Sm-D3) (proteína del núcleo snRNP D3)	OJJ70892	ANI_1_1076184	RMP	-	-	-	Nucl	-	-	-	13.70
Subunidad 4 del complejo de proteína 2/3 relacionada con la actina	OJJ69954	ANI_1_1012104	RBP	PB	PS	-	Cis	-	-	-	13.20
Subunidad mitocondrial F1F0-ATP sintasa g *	OJJ74477	ANI_1_1468014	Tr	TraA	-	-	-	-	-	-	11.60
Adenosilhomocisteinasa (EC 3.3.1.1)	OJJ73949	ANI_1_302074	CAAMP	HA	-	-	Cito	E	-	3.3.1.1	11.40
Proteína no caracterizada	OJJ74906	ANI_1_748014	-	-	-	-	-	-	-	-	10.80
Proteína que contiene el dominio MPN	OJJ73032	ANI_1_2184064	CPMP	HA/PeA	-	-	-	-	-	-	10.70
Proteína ribosomal 60S L20	OJJ75083	ANI_1_470014	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	10.70
Proteína no caracterizada	OJJ74342	ANI_1_1680014	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	10.40
V-SNARE / proteína de fusión de proteína A de membrana peroxisomal *	OJJ67163	ANI_1_1364184	-	-	-	-	Plas	-	-	-	9.70
Tiamina tiazol sintasa (enzima biosintética de tiazol) (EC 2.4.2.60)	OJJ77571	ANI_1_228094	VMP	TrA	-	-	Nucl/ Cito	E	AA3	2.4.2.60	9.63
Proteína ribosomal L15	OJJ75095	ANI_1_448014	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	9.42
Proteína que contiene el dominio Sm	OJJ74350	ANI_1_1664014	RMP/RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	9.37

Tabla A11. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Cornichon *	OJJ72936	ANI_1_1154064	VMT/Tr	-	-	CMC	Plas	-	-	-	9.23
Transportadora de fosfato *	OJJ72117	ANI_1_254144	Tr	-	-	-	Plas	-	-	-	8.52
Proteína que contiene el dominio GMC_OxRdtase_N	OJJ77767	ANI_1_908034	-	OA	-	-	-	E	AA3_2	-	8.34
Proteína ribosomal S19 *	OJJ71852	ANI_1_702144	T	SMA/RB	-	-	Ribo	-	-	-	8.33
NADH-ubiquinona oxidoreductasa subunidad GRIM-19 *	OJJ72089	ANI_1_304144	-	-	-	-	Plas	-	-	-	8.03
Subunidad del complejo de ribonucleoproteína H / ACA	OJJ74587	ANI_1_1280014	RMP	RB	-	-	Nucl	-	-	-	8.01
Isocitrato deshidrogenasa [NADP] (EC 1.1.1.42)	OJJ75634	ANI_1_3136024	CMP	OA	-	-	Pero	E	-	1.1.1.42	7.31
Proteína que contiene el dominio iso_dh	OJJ69024	ANI_1_398134	CAAMP	OA	-	-	Cito	E	-	1.1.1.87	7.06
Proteína que contiene repeticiones ARM *	OJJ73249	ANI_1_1402074	ST/adhesión	-	-	-	-	-	-	-	6.73
Proteína que contiene el dominio AB hidrolasa-1	OJJ74907	ANI_1_746014	-	HA	-	-	Mito	E	CE1	-	6.46
Proteína ribosomal rpl16 *	OJJ70542	ANI_1_490164	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	6.37
Proteína que contiene el dominio G de tipo Tr	OJJ75154	ANI_1_354014	-	HA	-	-	-	-	-	-	6.29
6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilante (EC 1.1.1.44)	OJJ77603	ANI_1_282094	CMP	OA	-	-	-	E	-	1.1.1.44	6.27
Subunidad beta de ATP sintasa (EC 7.1.2.2)	OJJ77150	-	Tr	TraA/TrA	-	-	Pero	E	-	-	6.15
Subunidad de 178 kDa de NADH-ubiquinona oxidoreductasa *	OJJ71559	ANI_1_1176144	-	-	-	-	Mito	-	-	-	5.56
UTP - glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (EC 2.7.7.9)	OJJ66556	ANI_1_120104	CMP	TrA/NA	-	CMC	-	E	-	2.7.7.9	5.50
Proteína que contiene el dominio Ribosomal_L7Ae	OJJ73553	ANI_1_942074	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	5.45
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ73970	ANI_1_262074	-	OA	-	-	-	-	-	-	5.19
Proteína de choque térmico 70 *	OJJ71513	ANI_1_1254144	PF/RS/Tr	-	-	NCE	Cito	-	-	-	5.19
Proteína que contiene el dominio BHLH	OJJ76996	ANI_1_372124	-	PB	-	-	-	-	-	-	5.11
Subunidad de 21 kDa de NADH-ubiquinona oxidoreductasa *	OJJ76758	ANI_1_12124	-	-	-	-	Plas	-	-	-	5.08
Proteína que contiene dominio G de tipo septin	OJJ69415	ANI_1_648084	-VMT	-	-	-	Nucl	-	-	-	4.99
Subunidad de isocitrato deshidrogenasa [NAD], mitocondrial	OJJ70797	ANI_1_906164	CMP	-	-	-	Mito	E	-	1.1.1.41	4.97
NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 subunidad del sub complejo alfa	OJJ68683	ANI_1_152154	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	4.69
Proteína ribosomal L3 de subunidad 60S *	OJJ76372	ANI_1_536024	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	4.58

Tabla A11. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene el dominio Paf1 *	OJJ76465	ANI_1_2376024	RMP/CPMP	-	-	-	-	-	-	-	4.52
ARN helicasa dependiente de ATP eIF4A *	OJJ75699	ANI_1_1622024	-	HA	-	-	Nucl	-	-	-	4.38
Proteína que contiene el dominio RRM	OJJ67327	ANI_1_608104	RMP	RB	-	-	-	-	-	-	4.33
Proteína que contiene el dominio de homología de la bobina en espiral t-SNARE	OJJ70955	ANI_1_978184	VMT/Tr	-	-	-	Plas	-	-	-	4.27
Proteína de vesícula SurF4 / Erv29 recubierta de COPII *	OJJ73786	ANI_1_576074	-	-	-	CMC	Plas	-	-	-	4.21
Glutatión S-transferasa *	OJJ67066	ANI_1_330164	RS	TrA	-	-	-	E	-	-	4.19
Proteína que contiene el dominio NAP *	OJJ68789	ANI_1_340154	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	3.96
Ribonucleoproteína nuclear pequeña U4 / U6 *	OJJ73510	ANI_1_988074	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	3.94
Proteína no caracterizada	OJJ71159	ANI_1_1760184	-	-	-	-	-	-	-	-	3.82
UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa *	OJJ66590	ANI_1_62104	CMP	TrA/NA	-	-	Cito	E	-	2.7.7.23 2.7.7.83	3.77
Dihidrolipoil deshidrogenasa (EC 1.8.1.4)	OJJ72740	ANI_1_852064	RBP/CH	OA	-	-	Mito	E	<u>AA3</u>	1.8.1.4	3.72
Proteína que contiene el dominio AAA	OJJ75610	ANI_1_1748024	RBP/PCP	HA	-	-	-	-	-	-	3.63
Proteína que contiene el dominio DUF2433	OJJ78109	ANI_1_1024094	-	-	-	-	-	-	-	-	3.63
5' / 3'-nucleotidasa SurE *	OJJ70568	ANI_1_532164	DMP/RMP	-	-	-	Nucl	-	-	-	3.49
Argininosuccinato liasa *	OJJ74840	ANI_1_850014	CAAMP	LyA	-	-	-	E	-	4.3.2.1	3.43
Proteína que contiene el dominio MFAP1	OJJ77340	ANI_1_1600124	RMP	-	-	-	Nucl	-	-	-	3.40
Proteínas únicas intracelulares (40 g/L)											
Proteína que contiene el dominio de glutaredoxina	OJJ70631	ANI_1_640164	RBP/CH	OA	-	-	Mito	-	-	-	45.50
Proteína ribosomal L38 de subunidad 60S *	OJJ71284	ANI_1_472184	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	38.80
Proteína de la familia del dominio PWI *	OJJ71799	-	RMP	RB/DB	PS	-	Nucl	-	-	-	24.90
37S proteína ribosomal mrp10, mitocondrial *	OJJ75113	ANI_1_420014	T	SMA	-	-	Ribo/ Mito	-	-	-	15.20
Proteína similar a la tiorredoxina (fragmento) *	OJJ70000	ANI_1_926104	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	12.90
Maquinaria de traducción asociada TMA7 *	OJJ71892	ANI_1_636144	T	-	-	-	Nucl	-	-	-	10.70
Proteína de biogénesis de subunidad ribosomal 60S Nop16 *	OJJ67956	ANI_1_620034	OO	-	-	-	Nucl	-	-	-	7.54
Proteína que contiene el dominio YCII	OJJ71388	-	TDT	-	-	-	Cito	-	-	-	6.73

Tabla A11. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Biotina sintasa *	OJJ69056	ANI 1_1238134	VMP	TrA	-	-	Mito	E	-	2.8.1.6	6.65
Proteína que contiene el dominio ATP-Synt_DE_N	OJJ74983	ANI 1_628014	Tr	TraA/TrA	-	-	Mito	-	-	-	6.61
Mediador de la subunidad 9 de transcripción de la ARN polimerasa II (subunidad 9 del complejo mediador)	OJJ72021	ANI 1_1614144	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	6.23
Proteína de la familia PAP2 *	OJJ72407	ANI 1_362064	-	PhA/HA	-	-	-	E	-	-	5.55
Proteína que contiene el dominio Fe-S_biosyn	OJJ70947	ANI 1_986184	-	SMA	-	-	Mito	-	-	-	4.74
Proteína que contiene el dominio de hidrolasa de Nudix	OJJ76547	ANI 1_244024	-	HA	-	-	-	E	-	3.6.1.52	4.49
Cadena ligera de clatrina	OJJ70860	-	VMT/Tr	SMA	-	-	Nucl/ Cito	-	-	-	4.38
Proteína que contiene el dominio SRP9-21	OJJ77377	ANI 1_946124	Tr	-	-	-	-	-	-	-	4.38
Subunidad 4 de ADN polimerasa delta *	OJJ77502	ANI 1_112094	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	3.69
Proteínas únicas intracelulares (60 g/L)											
Proteína de la familia SNF7 *	OJJ70672	ANI 1_704164	Tr	-	-	-	-	-	-	-	16.20
Dominio de la familia de proteínas motoras de la kinesina *	OJJ75924	ANI 1_1298024	-	-	-	-	Plas	-	-	-	7.97
Proteína de la familia reguladora mitocondrial unida a la membrana interna *	OJJ70504	ANI 1_432164	CH	-	-	-	Mito	-	-	-	7.12
Proteína similar a la glutarredoxina	OJJ73808	-	-	OA	-	-	-	E	-	-	6.36
Proteína no caracterizada	OJJ74676	ANI 1_1136014	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	5.55
Proteína ribosomal 37S YMR-31, mitocondrial *	OJJ70748	ANI 1_814164	RMP	-	-	-	Ribo/ Mito	-	-	-	5.51
Proteína no caracterizada	OJJ74069	ANI 1_1608074	-	-	-	-	-	-	-	-	4.43
Subunidad Rieske del complejo del citocromo b-c1, mitocondrial (EC 7.1.1.8)	OJJ77143	ANI 1_588124	-	OA	PS	-	Mito	E	-	7.1.1.8	4.13
Proteínas únicas "Extra-Intra" (20 g/L)											
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ67851	ANI 1_40174	-	TrA	PS	CMC	Plas	E	GH72	2.4.1.-	61.70
Transaldolasa (EC 2.2.1.2)	OJJ72476	ANI 1_472064	CMP	TrA	-	-	Cito	E	-	2.2.1.2	16.30
Proteína que contiene el dominio aldo_ket_red	OJJ77535	ANI 1_172094	CMP	OA	-	NCE	Cito	E	-	1.1.1.372	14.60
Catalasa (EC 1.11.1.6)	OJJ75269	ANI 1_2270014	RS	OA	PS	CE	Extra	E	-	1.11.1.6	12.50

Tabla A11. Clasificación de proteínas únicas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas únicas “Extra-Intra” (40 g/L)											
Proteína que contiene el dominio RRM	OJJ71848	ANI_1_708144	-	RB	-	-	Nucl	-	-	-	156.00
Proteína que contiene el dominio ML	OJJ76427	ANI_1_450024	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	109.00
Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)	OJJ72339	ANI_1_268064	CMP	OA	-	-	Cito	E	GH4	1.1.1.37	39.90
Glucosa oxidasa *	OJJ74152	ANI_1_1992014	-	OA	PS	-	Cito	E	AA3_2	-	286.00
Purina nucleósido permeasa *	OJJ67881	ANI_1_220174	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	33.80
Proteína que contiene dominio de tipo PCMH de unión a FAD	OJJ66105	ANI_1_52034	-	OA	PS	CE	Extra	E	AA7	-	20.60
Proteína que contiene el dominio EG45 similar a la expansina	OJJ68547	-	OO	-	PS	-	Cell wall	E	CBM63	-	13.00
Invertasa extracelular *	OJJ67564	ANI_1_2508074	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.26	12.00
Proteínas únicas “Extra-Intra” (60 g/L)											
Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	OJJ72473	ANI_1_470064	-	OA	-	-	Cito	E	-	1.15.1.1	2370.00
Proteína que contiene el dominio del citocromo c	OJJ76544	ANI_1_250024	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	983.00
Proteína que contiene el dominio ABM *	OJJ66778	ANI_1_222114	Antibióticos	OA	-	-	Nucl	-	-	-	375.00
Peroxisredoxina (EC 1.11.1.15)	OJJ69946	ANI_1_1024104	RBP/CH	OA	-	-	Cito	E	-	1.11.1.15	25.00

: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidoreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en “Pipeline computacional” de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc=localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades

auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas.

13.12. Anexo 12

Tabla A12. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas extracelulares											
Proteína de la pared celular PhiA *	OJJ76937	ANI_1_280124	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	1340.00
Exo-inulinasa *	OJJ69961	ANI_1_2146104	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH32	3.2.1.80	336.00
Endo-1,4-beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)	OJJ75322	ANI_1_94014	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH11	3.2.1.8	313.00
Proteína que contiene el dominio hidrolasa_4	OJJ67062	ANI_1_1218164	-	HA	-	NCE	Extra	-	-	-	192.00
Glucósido hidrolasa *	OJJ67987	ANI_1_668034	CMP	HA	PS	CMC	Extra	E	GH17	3.2.1.39	111.00
Dominio de proteína de la familia de factor de transcripción específico de hongos *	OJJ66777	ANI_1_220114	-	TDT	PS	CE	Extra	-	-	-	108.00
Proteína que contiene el dominio peptidasa S53	OJJ76993	ANI_1_368124	-	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.14.9	74.90
Proteína que contiene el dominio CBM1	OJJ71721	ANI_1_916144	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH5_5	3.2.1.4	68.10
1,4-beta-D-arabinosilano arabinofuranohidrolasa axhA *	OJJ68397	ANI_1_108034	CMP	HA	-	CE	Extra	E	GH62	-	62.80
Beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)	OJJ68396	ANI_1_106034	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH10	3.2.1.8	60.30
Endoglucanasa A *	OJJ77019	ANI_1_398124	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH12	3.2.1.151	57.60
Proteína que contiene el dominio GMC_OxRdtase_N	OJJ65853	ANI_1_1398064	-	OA	PS	CE	Extra	E	AA3_2	-	40.60
Proteína que contiene el dominio CBM20	OJJ77724	ANI_1_460094	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH13_1	3.2.1.1	39.40
Proteína no caracterizada	OJJ76575	ANI_1_198024	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	37.30
Proteínas intracelulares											
Proteína de resistencia al cobre Crd2 *	OJJ76801	ANI_1_96124	-	-	-	-	Plas	-	-	-	3010.00
Histona H2A	OJJ78398	ANI_1_1484094	-	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	2550.00
Histona H2B	OJJ78399	ANI_1_1488094	-	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	2510.00
Proteína que contiene el dominio HABP4_PAIRBP1	OJJ76144	ANI_1_920024	-	RB	-	-	Nucl	E	GH13_25	-	2010.00
Proteína ribosomal L6 de subunidad 60S *	OJJ73832	ANI_1_476074	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	1850.00
Poliubiquitina *	OJJ70905	ANI_1_1056184	CPMP	-	-	-	Nucl/ Cito	-	-	-	1760.00

Tabla A12. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene el dominio de la cadena E de la ATP sintasa *	OJJ71579	ANI_1_1146144	Tr	TraA	-	-	Mito	-	-	-	1520.00
Proteína que contiene el dominio PH	OJJ74726	ANI_1_1054014	ST	-	-	-	Cis	-	-	-	1470.00
Proteína que contiene el dominio de la cadena epsilon de ATP sintasa mitocondrial *	OJJ67307	ANI_1_644104	Tr	TraA/TraA	-	-	Mito	-	-	-	1230.00
Proteína que contiene el dominio Ribosomal_L7Ae	OJJ67319	ANI_1_626104	-	RB	-	-	Mito	-	-	-	895.00
Proteína que contiene el dominio de unión hemo del citocromo b5	OJJ71458	ANI_1_186184	-	-	-	-	Mito	-	-	-	824.00
Proteína que contiene el dominio de la caja HMG	OJJ76086	ANI_1_1024024	-	DB	-	-	Nucl	-	-	-	818.00
Proteína que contiene el dominio de unión al ARN *	OJJ68623	ANI_1_42154	-	RB	-	-	-	-	-	-	792.00
Proteína de respuesta a antibióticos similar a CipC *	OJJ72464	ANI_1_450064	Patogenicidad	-	-	-	-	-	-	-	768.00
SMP-30 / Gluconolactonasa / proteína de la familia de la región similar a LRE *	OJJ74082	ANI_1_60074	CH/CAAMP/RS	-	-	-	-	E	-	-	738.00
Proteína ribosomal L31e de subunidad 60S *	OJJ73276	ANI_1_1352074	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	728.00
Proteína que contiene el dominio DUF1014 *	OJJ74238	ANI_1_3276014	-	-	-	-	-	-	-	-	652.00
Subunidad b18 de NADH-ubiquinona oxidoreductasa *	OJJ75866	ANI_1_1388024	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	635.00
Proteína que contiene el dominio NAC-A / B	OJJ69087	ANI_1_290134	Tr	-	-	-	Cito	-	-	-	626.00
Proteína que contiene el dominio zf-CHCC	OJJ75735	ANI_1_1562024	-	DB/PB/RB	-	-	-	-	-	-	594.00
Proteína ribosomal S28e *	OJJ66734	ANI_1_152114	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	565.00
Proteína de segregación nuclear *	OJJ74380	ANI_1_1618014	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	553.00
Acil-CoA tioesterasa II *	OJJ71703	ANI_1_934144	RBP	-	-	-	-	-	-	-	480.00
Subunidad de 21 kDa de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial *	OJJ78221	ANI_1_1174094	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	427.00
Proteína que contiene el dominio piruvato carboxiltransferasa	OJJ70928	ANI_1_1952184	CAAMP	TraA	-	-	Cito	E	-	2.3.3.14	411.00
Proteína ribosomal S30 de subunidad 40S	OJJ77575	ANI_1_236094	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	398.00
NADH-ubiquinona oxidoreductasa	OJJ73688	ANI_1_714074	-	-	-	-	Mito	-	-	-	397.00
Herencia alterada de la proteína mitocondrial 41	OJJ72291	ANI_1_190064	-	LigA	-	-	Mito	-	-	-	388.00
Proteína que contiene el dominio SAP	OJJ76262	ANI_1_738024	TDT	-	-	-	Nucl	-	-	-	381.00
Tropomiosina *	OJJ66704	ANI_1_102114	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	367.00

Tabla A12. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteína que contiene el dominio ANK_REP_REGION	OJJ73884	ANI_1_402074	-	PB	-	-	Cito	-	-	-	364.00
Proteína ribosomal S25 de subunidad 40S (fragmento)	OJJ74492	ANI_1_1440014	-T	-	-	-	Ribo	-	-	-	361.00
Subunidad 7 del complejo citocromo b-c1	OJJ71396	ANI_1_274184	-	-	-	-	Mito	-	-	-	352.00
Subunidad de 21,3 kDa de NADH-ubiquinona oxidoreductasa *	OJJ71496	ANI_1_128184	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	340.00
Proteína que contiene el dominio KOW	OJJ78189	ANI_1_1142094	T	SMA	-	-	Mito	-	-	-	334.00
Proteína que contiene el dominio SUI1	OJJ78298	-	-	TRA/RB	-	-	-	-	-	-	333.00
Factor de transcripción RfeG *	OJJ72504	ANI_1_512064	RBP	DB	-	-	-	-	-	-	323.00
Proteína que contiene el dominio zf-met2	OJJ72167	ANI_1_168144	-	RB/DB	-	-	-	-	-	-	317.00
Proteína de muerte inducida por cafeína Cid2 *	OJJ74787	ANI_1_2704014	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	315.00
Proteína que contiene dominio de tipo HTH cro / C1	OJJ75639	ANI_1_1712024	-	DB	-	-	-	-	-	-	315.00
Proteína que contiene el dominio BZIP	OJJ77049	ANI_1_432124	RBP	-	-	-	Nucl	-	-	-	304.00
Factor de elongación 1-alfa	OJJ70636	ANI_1_648164	-	HA/TRA/RB	-	-	Cito	-	-	-	297.00
Subunidad grande L49 del ribosoma mitocondrial *	OJJ76108	ANI_1_984024	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	277.00
Factor de ensamblaje de citocromo c oxidasa 6 *	OJJ71987	ANI_1_1638144	-	-	-	-	Mito	-	-	-	275.00
Proteína que contiene el dominio CHCH	OJJ72383	ANI_1_1618064	Tr	OA	-	-	Mito	-	-	-	274.00
Subunidad de 12 kDa de NADH-ubiquinona oxidoreductasa, putativo *	OJJ68960	ANI_1_496134	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	253.00
Proteína de caja HMG *	OJJ73962	ANI_1_280074	-	DB	-	-	Nucl	-	-	-	243.00
Proteína que contiene el dominio RRM	OJJ75453	ANI_1_3332024	-	RB	-	-	-	-	-	-	240.00
Proteína que contiene el dominio zf-Tim10_DDP	OJJ68780	-	Tr	-	-	-	Mito	-	-	-	237.00
Proteína YmL19 del ribosoma mitocondrial 54S *	OJJ70463	ANI_1_352164	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	222.00
Proteína ribosomal S19 de subunidad 40S *	OJJ70577	ANI_1_550164	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	210.00
Chaperona A específica de tubulina	OJJ67442	ANI_1_102044	PF	PB	-	-	Cis	-	-	-	198.00
Proteína que contiene el dominio RanBD1	OJJ68200	-	RBP/Tr	-	-	-	Nucl	-	-	-	195.00
Proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina por la ATP sintasa *	OJJ76323	ANI_1_640024	Tr	TraA/TrA	-	-	Mito	-	-	-	189.00

Tabla A12. Clasificación de proteínas abundantes no reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZy ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)
Proteínas “Extra-Intra” abundantes de forma extracelular											
Glucoamilasa (EC 3.2.1.3)	OJJ65991	ANI_1_820034	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH15	3.2.1.3	490.00
Isomerasa putativa YbhE *	OJJ74153	ANI_1_1990014	-	IA	PS	CE	Extra	E	-	-	482.00
Proteínas “Extra-Intra” abundantes de forma intracelular											
Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	OJJ72473	ANI_1_470064	-	OA	-	CE	Cito	E	-	1.15.1.1	2370.00
Glucoamilasa (EC 3.2.1.3)	OJJ65991	ANI_1_820034	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH15	3.2.1.3	490.00
Isomerasa putativa YbhE *	OJJ74153	ANI_1_1990014	-	IA	PS	CE	Extra	E	-	-	482.00

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeóstasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidoreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en “Pipeline computacional” de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas.

13.13. Anexo 13

Tabla A13. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa.

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZ ^g	EC	CEP ^h ×10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend _i	R ² _j
Proteínas extracelulares													
Proteína no caracterizada	OJJ73062	ANI 1_4054	-	-	PS	CE	Extra	-	-	-	187.00	0.95	0.91
Proteína que contiene el dominio de la peptidasa A1	OJJ77191	ANI 1_654124	-	HA/PeA	PS	CE	Extra	E	-	3.4.23.18	55.30	1.31	0.99
Proteína no caracterizada	OJJ66423	-	-	HA/PeA	PS			E	-	-	45.90	1.47	1.00
1,3-beta-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-)	OJJ78207	ANI 1_766034	-	TrA	PS	CMC	Plas	E	GH7_2	2.4.1.-	34.10	1.19	0.78
Catalasa (EC 1.11.1.6)	OJJ75244	ANI 1_2296014	RS	OA	PS	CE	Extra	E	-	1.11.1.6	32.90	0.97	0.81
Proteína no caracterizada	OJJ71409	-	-	-	-		Cito	-	-	-	32.80	1.43	0.96
Proteína pequeña secretada	OJJ75514	ANI 1_1878024	RBP	-	PS	CE	Extra	-	-	-	20.70	1.00	0.76
Proteína no caracterizada	OJJ68408	ANI 1_1314024	CMP	IA	PS	CE	Extra	E	-	5.1.3.3	15.90	1.50	1.00
endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa	OJJ75797	ANI 1_1480024	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH4_3_6	3.2.1.9	13.90	1.21	0.94
Proteína de la familia fosfoglicerato mutasa	OJJ66989	ANI 1_1020134	CMP	TrA	PS	CE	-	E	-	-	12.30	1.26	0.94
Endo-inulinasa	OJJ73755	ANI 1_1796094	CMP	HA	PS	CE	Extra	E	GH3_2	3.2.1.7	11.70	1.15	0.93
Proteínas intracelulares													
Subunidad de citocromo c oxidasa	OJJ76556	ANI 1_232024	-	-	-	-	Mito	-	-	-	2180.00	0.82	0.77
Histona H4	OJJ73517	ANI 1_974074	RMP	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	975.00	-1.40	0.84
Complejo de subunidad beta asociado al polipéptido naciente	OJJ69992	ANI 1_942104	-	-	-	-	Nucl/ Cito	-	-	-	884.00	-0.37	0.85
Ribosa / galactosa isomerasa *	OJJ76461	ANI 1_394024	CMP	IA	-	-	Cito	E	-	5.3.1.6	792.00	-0.68	0.78
Enolasa *	OJJ70755	ANI 1_828164	CMP	LyA	-	-	Cito	E	-	4.2.1.1 1	580.00	0.77	0.94
Histona H2A	OJJ72118	ANI 1_252144	-	DB/PB	-	-	Nucl	-	-	-	557.00	-1.06	0.93
Subunidad 2 de proteína promotora de plegamiento*	OJJ70550	ANI 1_498164	PF	PB	-	-	Nucl	-	-	-	314.00	0.41	0.97
Proteína que contiene el dominio ribosomal_L23eN	OJJ68779	ANI 1_322154	T	SMA	-	-	Ribo	-	-	-	308.00	-0.86	0.92
Purina-citosina permeasa fcyB *	OJJ72780	ANI 1_912064	-	DB	-	-	Nucl	-	-	-	304.00	1.07	0.90

Tabla A13. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZ y ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend _i	R ² _j
Proteína no caracterizada	OJJ73907	ANI_1_1772074	T	SMA	-	-	Nucl	-	-	-	294.00	-0.80	0.93
Proteína que contiene el dominio Rick_17kDa_Anti	OJJ70690	ANI_1_736164	-	-	-	-	Plas	-	-	-	286.00	-0.40	1.00
Proteína que contiene el dominio RRM	OJJ77237	ANI_1_730124	-	RB	-	-		-	-	-	284.00	0.18	0.98
ATP sintasa subunidad d, mitocondrial	OJJ69086	ANI_1_292134	Tr	TraA	-	-	Mito	-	-	-	269.00	-0.70	0.98
Proteína que contiene el dominio Sm	OJJ71296	ANI_1_448184	-	RB	-	-	Mito	-	-	-	267.00	0.45	0.81
Proteína que contiene el dominio 14_3_3	OJJ72815	ANI_1_962064	-	PB	-	-	Cito	-	-	-	265.00	-1.29	0.92
Subunidad G de ATPasa de protones de tipo V	OJJ66575	ANI_1_86104	Tr	TraA	-	-	Nucl	-	-	-	253.00	0.94	0.99
Proteína que contiene el dominio RRM	OJJ66931	ANI_1_1704134	-	RB	-	-		-	-	-	222.00	-0.32	0.98
Adenilato monofosfato quinasa (EC 2.7.4.3)	OJJ73031	ANI_1_1296064	MCV/NM	TrA	-	-	Mito/ Cito	E	-	2.7.4.3	217.00	0.73	0.99
Proteína que contiene el dominio YL1_C	OJJ77064	ANI_1_456124	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	206.00	1.18	0.78
Proteína que contiene el dominio 14_3_3	OJJ70757	ANI_1_832164	-	-	-	-	-	-	-	-	188.71	-1.27	0.88
Proteína de la familia LYR	OJJ78397	ANI_1_1486094	-	-	-	-	Mito	-	-	-	188.40	-0.73	0.77
Proteína ribosomal S19/S15	OJJ70610	ANI_1_600164	-	-	-	-	Mito	-	-	-	176.04	0.50	0.77
Proteína que contiene el dominio de unión a subunidades periféricas (PSBD)	OJJ75680	ANI_1_1648024	-	-	-	-	Mito	E	-	-	170.65	-0.79	0.96
Proteína que contiene el dominio Ribos_L4_asso_C	OJJ69423	ANI_1_1460084	-	-	-	-	-	-	-	-	149.09	-0.92	0.80
Proteína de ensamblaje de citocromo c oxidasa COX19	OJJ73987	ANI_1_1692074	-	-	-	-	Mito	-	-	-	148.46	0.47	0.80
Proteína ribosomal L34	OJJ72787	ANI_1_920064	-	-	-	-	Mito	-	-	-	143.08	-0.34	0.98
Factor de iniciación de la traducción 5A	OJJ75149	ANI_1_366014	-	-	-	-	-	-	-	-	142.99	-0.85	1.00
Proteína ribosómica 40S S14	OJJ72721	ANI_1_822064	-	-	-	-	Mito	-	-	-	139.13	-0.99	0.99
Proteína que contiene dominio similar a C-CAP	OJJ72068	ANI_1_342144	-	-	-	-	Nucl	-	-	-	134.90	-0.34	0.91
Proteína que contiene dominio similar a ubiquitina	OJJ73860	ANI_1_416074	-	-	-	-	-	-	-	-	123.42	0.87	0.81
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	OJJ72116	ANI_1_256144	-	-	-	-	Cito	E	-	1.2.1.1 2	121.14	-0.99	0.89
Proteína que contiene dominio de caja HMG	OJJ75085	ANI_1_466014	-	-	-	-	Mito	-	-	-	120.47	-1.09	0.95

Tabla A13. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZ y ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend _i	R ² _j
Proteína de unión al ADN relacionada con TFAR19	OJJ78281	ANI_1_1284094			-	-	Nucl	-	-	-	111.69	1.06	1.00
Proteína ribosómica 40S S11	OJJ76193	ANI_1_842024			-	-	Mito	-	-	-	103.13	-1.15	0.83
Proteína de fisión mitocondrial 1	OJJ76521	ANI_1_292024			-	-	-	-	-	-	98.53	-0.53	1.00
Proteína que contiene el dominio zf-Tim10_DDP	OJJ75078	ANI_1_478014			-	-	Cito	-	-	-	97.82	-1.50	0.90
Proteína que contiene el dominio MIF4G	OJJ71716	ANI_1_922144			-	-	Mito	-	-	-	96.10	0.17	0.90
Factor de iniciación de la traducción 3 (subunidad J)	OJJ70756	ANI_1_830164			-	-	Nucl	-	-	-	93.55	-0.94	0.92
Proteína que contiene el dominio ribosomal L2_C	OJJ68699	ANI_1_188154			-	-	Mito	-	-	-	93.32	-1.17	0.88
Proteína de la familia de incompatibilidad de heterocariones	OJJ76585	ANI_1_2276024			-	-	Nucl	-	-	-	90.16	0.64	0.94
Fosfoglicerato quinasa	OJJ73926	ANI_1_332074			-	-	Cito	E	-	2.7.2.3	89.16	-1.28	0.92
Proteína ribosómica 40S S24	OJJ66587	ANI_1_68104			-	-	Nucl	-	-	-	87.86	-1.30	0.76
Factor de elongación de transcripción	OJJ75625	ANI_1_1724024			-	-	Nucl	-	-	-	86.10	0.79	0.83
ATP sintasa mitocondrial (subunidad 4)	OJJ71686	ANI_1_962144			-	-	Mito	-	-	-	84.81	-1.50	0.77
Proteína no caracterizada	OJJ68521	ANI_1_454034			-	-	-	-	-	-	84.66	0.95	0.95
Proteína que contiene el dominio ribosomal S7	OJJ74282	ANI_1_1784014			-	-	-	-	-	-	83.22	-1.28	0.79
Proteína ribosómica 39S L53	OJJ75671	ANI_1_1666024			-	-	Mito	-	-	-	82.48	-0.66	0.86
proteína que contiene dominio de unión a S4 RNA	OJJ75495	ANI_1_1908024			-	-	Mito	-	-	-	80.06	-1.36	0.93
Proteína ribosómica 60S L13	OJJ76786	ANI_1_70124			-	-	Nuc	-	-	-	78.49	-0.87	0.98
Proteína no caracterizada	OJJ69183	ANI_1_1126134			-	-	-	-	-	-	75.25	0.89	0.92
Proteína que contiene el dominio PKS_ER	OJJ68713	ANI_1_212154			-	-	Cito	E	-	1.1.1.1	73.75	-1.29	0.97
Proteína de unión a poliadenilato	OJJ75136	ANI_1_384014			-	-	Pero	-	-	-	71.28	-0.93	0.97
Subunidad NOP10 del complejo de ribonucleoproteína H/ACA	OJJ69340	ANI_1_794084			-	-	-	-	-	-	67.72	0.77	0.85
Proteína que contiene el dominio zf-Tim10_DDP	OJJ67862	ANI_1_56174			-	-	Nucl	-	-	-	64.51	1.50	0.92
Proteína no caracterizada	OJJ68063	ANI_1_764034			-	-	Nucl	-	-	-	63.86	1.01	0.89
Inhibidor de ATPasa mitocondrial	OJJ72816	ANI_1_964064			-	-	Mito	-	-	-	61.34	0.77	0.79

Tabla A13. Clasificación de proteínas abundantes reguladas identificadas en el proteoma de *A. brasiliensis* en CML con 20 a 60 g/L de sacarosa (continuación).

Proteína	ID-EF ^a	ID-KEEG ^b	Proceso biológico ^c	Función molecular ^d	Péptido señal	Sec ^e	Loc ^f	Enzima	CAZ y ^g	EC	CEP ^h x10 ⁻³ (Sp/mL)	Pend ⁱ	R ² ^j
Proteína que contiene el dominio LsmAD	OJJ74016	ANI_1_186074			-	-	-	-	-	-	57.84	0.80	0.94
Mucina-7	OJJ72923	ANI_1_2102064			-	-	Mito	-	-	-	57.74	0.92	0.91
Diflavina oxidoreductasa 1 dependiente de NADPH	OJJ68652	ANI_1_90154			-	-	-	E	-	-	57.54	1.01	0.98
Proteína que contiene el dominio WW	OJJ76953	ANI_1_306124			-	-	-	E	-	-	56.08	1.04	0.94
Monooxigenasa de unión a flavina	OJJ73792	-			-	-	-	E	AA3_1	-	55.65	-1.45	1.00
Proteína que contiene el dominio Tudor	OJJ78112	ANI_1_1028094			-	-	Nucl	-	-	-	54.52	0.77	0.83
Proteína de ensamblaje de citocromo c oxidasa	OJJ66574	ANI_1_1328104			-	-	Mito	-	-	-	53.96	1.50	0.87
Proteínas "Extra-Intra"													
Proteína que contiene el dominio del citocromo c	OJJ76544	ANI_1_250024	-	OA	-	-	Mito	-	-	-	983.00	0.74	0.79
Proteína de transferencia de fosfatidilinositol	OJJ76427	ANI_1_450024	Tr	-	PS	CE	Extra	-	-	-	109.00	-1.50	0.85

-: Sin información. ^a Identificador del gen de *A. brasiliensis* en la base de datos EsemblFungi. ^b Identificador del gen de *A. niger* (ortólogo de *A. brasiliensis*), compatible con base de datos KEGG y NCBI. ^c Proceso biológico en el que participan las proteínas, basado en ontología genética (GO): (PF) plegamiento de proteínas, (ST) transducción de señales, (CAAMP) metabolismo de aminoácidos, (RMP) metabolismo de ARN, (OO) organización de organelos, (VMP) metabolismo de vitaminas, (RBP) regulación, (PCP) catabolismo de proteínas, (CMP) metabolismo de carbohidratos, (CPMP) modificación de proteínas, (LMP) metabolismo de lípidos, (RC) respuesta a químicos, (CO) organización del citoesqueleto, (RS) respuesta a estrés, (DMP) metabolismo de ADN, (T) traducción, (VMT) transporte mediado por vesículas, (TDT) transcripción de ADN, (Tr) transporte, (CH) homeostasis celular. ^d función molecular de las proteínas, basado en ontología genética (GO): (TraA) actividad de transporte, (PKA) actividad proteína quinasa, (SMA) actividad estructural, (ERA) regulador de actividad enzimática, (OA) actividad oxidoreductasa, (DB) unión a ADN, (PhA) actividad fosfatasa, (HA) actividad hidrolítica, (MA) actividad motora, (IA) actividad isomerasa, (PeA) actividad peptidasa, (TRA) actividad reguladora de la traducción, (PB) unión a proteínas, (TrA) actividad transferasa, (RB) unión a ARN, (LigA) actividad ligasa, (LiA) actividad lipasa, (LyA) actividad liasa, (NA) actividad nucleotidil transferasa. ^e Sec=Tipo de vía de secreción basado en "Pipeline computacional" de Vivek-Ananth y col. (2018): (CE) secreción clásica extracelular, (NCE) secreción no clásica extracelular, (CMC) secreción clásica membrana celular. ^f Loc= localización celular basada en el algoritmo WoLF PSORT: (Extra) extracelular, (Cito) citosol, (Mito) mitocondria, (Nucl) núcleo, (Plas) membrana plasmática, (Cis) citoesqueleto, (Ribo) ribosoma, (Pero) peroxisoma. ^g CAZy= Familias de enzimas CAZymes: (GH) glicosil hidrolasa, (AA) actividades auxiliares, (CBM) módulos de unión a carbohidratos, (PL) polisacárido liasas, (CE) carbohidrato esterasas. ^h CEP= cuenta espectral ponderada, representa la sumatoria del número de espectros por mL de medio de cultivo de cada proteína en las tres condiciones de concentración de sacarosa estudiadas. ⁱ Pend= pendiente resultante de graficar los valores normalizados de la CEP en función de la concentración de sacarosa, (-) bajo-regulación y (+) sobre-regulación. ^j R²= coeficiente de determinación, (R²>0.75) proteínas son reguladas.

13.14. Anexo 14

Productos obtenidos con el presente trabajo

- Presentación oral titulada "Producción de invertasa, inulinasa y xilanasa por *Aspergillus brasiliensis* en cultivo en medio líquido y sólido" en el congreso nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), 2019.
- Publicación de artículo titulado "Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*" en la revista "Process Biochemistry", 2021.