

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada ANÁLISIS COMPARATIVO DEL SECRETOMA DEL HALÓFILO *Aspergillus sydowii*: ESTRATEGIAS DE HALOFILIA Y BIOPROSPECCIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS EN CONDICIONES DE HIPERSALINIDAD que presenta el alumno **Omar Jasiel Quintero García (10012811)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara CCG-UNAM	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB-UAEM	APROBADO	
Dra. Marcela Ayala Aceves IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

**RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2021-01-11 14:13:41 | Firmante**

OblLdWQ4axN9XSJM4jnsRg0XoUvOVlGmdNqCS2jJOAF98EmQtMcnecS18JPQKJX7dTmuacjus41DpkrEYRcj2P1U6jCzby7N8yp6zftZGa1FWEsn4hr8GnQiod703+FmMRJC vEAZary8k8/8OBBwTAUoE6za6fwGogKs5M8QHlxXse43sdQQ13Y77SqX6maYX+JYIM+uROgl0kvGr78dGs6/JSrscB4zjvngCCwhWobHmfduOHdqBJar6tKIEBv8VvRfvzla8BFJk OBaVl6pEWrh04eDikSa/wpYkyYg/q4JB+2p/5h7S+ov4imtp3Hm3IGM8QwPycgTh1Znd8w==

**SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA | Fecha:2021-01-11 15:20:16 | Firmante**

XThUo6fYG48VRTL1Wg8llEWkY8LVv4h7qav1WCikTKO0x5cNvrmUwpdhWza6TaG3XB0TCllnxycmKAwDEgw1WG3c7C35ClIJPbCSotWl3oRjn9QyUI4GESGy4RZeqU8Oe OfolCgijC5vhh6hTc4HCx/7GY1s7llzwl8TveGutOyFXCRQqbDJlvpFhwMI1wqbuY34T78DdaScxPslshnY0xePaFLlsgQjaRnauguijyGuigpg9yA45oPRIJU12AioATxhOdyC382/ 1t5lMqicOGMikvmb0l0brPTg5e8pQa5Qg/YlFaXq0VBmmHNdOwEXqOpyEt6l5hNSrg==

**JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2021-01-11 18:17:03 | Firmante**

e4EQkWyK+gKxGCRwNwb/XG6zfmfswX4G0xImdT0TDyCTGAGG8P0Z/QAUw0EOLgW/gFNNqaBouq+BMalhvv6viWV2CkvdE7aZg9Ls+kykSho2Yvc4hb6ZiyJl6o3Av6cgzdogi CSSx1TugKwq4a/NWaeatePK2x3Jq5URrvOA1jszhdN0fzppn+vtOa+oXlz7YqZyvkGJ0gFqoiOVnoCil86tufcUoT6q86ZOTDXH+1/URZbCkd2mw5yqS6p0e99mVsQGSLSzFsBe2 bLl0cONoBpBHB1/khXrWl/RdQu9vYOpilSrel1ukZqaxmlBY7uGgkCoZebmJN2Gq9/5eF1w==

**MARCELA AYALA ACEVES | Fecha:2021-01-11 19:13:11 | Firmante**

GxzteJ22OS4YAjXa48ZS0yxaeDev6rBB0sBOouXPS9SpjG6/rRbqoQhM+sUpYOobELObXyG0nN0tSjajpYrQpYMU7qHpToP2O8y0puFFj69FDYvaFdfVbT7eDqB0knHlyoOLx6n DclAgPQIE3F2CFZIMQJiabWgKEDWlGfd3gxCGI2Kkyq1Dnkzua6dmuXSEQRJcd5e7lxZmhPkv57s8qDn311SXlTyGsXJ1BZkct4ARER9xZb8JY457b1Dygm6MgnFxfJDN4E 5cpgsWlI9K/d4pvxM1H1WYth6XZopX1A9enn6KoELzVkv5P/XN7Br4Hs8OXlGfITV3GoBQ==

**SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2021-01-11 19:52:41 | Firmante**

J/uPmBHh/Ily6rika8KV7q9xwpsmdQBmImUelWQltpTqL3p66e22oSK6bwynrO6m08HBrzUkLustyrHGEAMizLSrVR5otxubQabUV1lkPdL+HHvQ8gevo/rTp0YWgkVK8o74saA +ZcRQdn3xaS9I70BgTNRHbnF6JIA2EQR1+oysHyfQLADI3zjpfFSs0TJSszoVdes/7NdH/8sfYXlqr5ChYuh1ImQvd7BkMcMXkkB6zkrFgtB8Bzn7OnVA05UHTxH0PmuaeER9 mkw83uW+W5U2yCeclp8W09rhD0rC2FdOQXRW5z2qL6kuwcvXY9FTQpZD8U0eSIFQQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

hwi6CT

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kxr9db5WIGY1ORbSrVzi5S6cXIPWJz7i>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR*

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL SECRETOMA DEL  
HALÓFILO *Aspergillus sydowii*: ESTRATEGIAS DE HALOFILIA  
Y BIOPROSPECCIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS  
EN CONDICIONES DE HIPERSALINIDAD**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

***MAESTRO*** EN CIENCIAS

PRESENTA

***QUINTERO GARCÍA OMAR JASIEL***

DIRECTOR DE TESIS

***Dr. BATISTA GARCÍA RAMÓN ALBERTO***

CUERNAVACA, MORELOS

*ENERO-2021*

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1. RESERVAS DE PETRÓLEO. ....	5
2.2. BIOCOMBUSTIBLES COMO UNA ALTERNATIVA ENERGÉTICA. ....	5
2.3. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA. ....	7
(i) <i>Celulosa</i> .....	7
(ii) <i>Hemicelulosa</i> .....	8
(iii) <i>Lignina</i> .....	9
2.4. SACARIFICACIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA. ....	10
2.4.1. MÉTODOS FÍSICOS.....	11
2.4.2. MÉTODOS QUÍMICOS .....	11
2.4.3. MÉTODOS BIOLÓGICOS. ....	13
2.5. ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS.....	15
2.5.1. <i>Celulasas</i> .....	15
2.5.2. <i>Xilanasas</i> .....	15
2.5.3. <i>Lacasas</i> .....	16
2.5.4. <i>Peroxidasas</i> .....	17
2.5.5. <i>Esterasas</i> .....	17
2.4.5. <i>Organismos Extremófilos (Halófilos) y Aplicaciones Biotecnológicas</i> .....	18
2.6. LA PROTEÓMICA COMO UNA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS EN LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS.....	19
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>23</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN. ....</b>	<b>25</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>26</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
7.1. <i>Crecimiento de Aspergillus sydowii en medio sólido</i> .....	27
7.2. <i>Cultivo de Aspergillus sydowii H1 sobre paja de trigo en presencia y ausencia de 1 M NaCl</i> .....	27
7.3. <i>Obtención del secretoma</i> .....	28
7.4. <i>Cuantificación de proteína por SDS-PAGE y densitometría</i> .....	28
7.5. <i>Identificación de proteínas</i> .....	29
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
8.1. <i>Crecimiento de Aspergillus sydowii H1 en presencia y ausencia de 1M de NaCl y paja de trigo como única fuente de carbono</i> .....	31
8.2. <i>Análisis del secretoma mediante electroforesis SDS-PAG</i> .....	35
8.3. <i>Cuantificación y análisis de expresión diferencial del secretoma de A. sydowii H1</i> .....	40
8.4. <i>Anotación de Enzimas Activas de Carbohidratos (CAZY) del secretoma de Aspergillus sydowii H1 en presencia y ausencia de NaCl y paja de trigo</i> .....	46

8.5. <i>Análisis estadístico de los niveles de expresión en cada una de las enzimas del secretoma CAZY</i> .....	54
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>61</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>62</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>63</b>

Quiero agradecer a mi madre Ruth García Palacios, por darme todo para que mis hermanos y yo seamos personas exitosas, gracias por ese coraje con el cual nos llevas siempre adelante, por la dedicación, y tu esfuerzo, gracias por mostrarme a salir de las situaciones difíciles, por tu cariño y tu inmenso amor.

Quiero extender mis agradecimientos al Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, que formó parte muy importante en mi desarrollo profesional. Agradezco por el gran apoyo que me ha brindado para realizar de la mejor manera este trabajo, gracias por cada una de las recomendaciones, por brindarme su laboratorio, y lo más importante sus conocimientos y recursos humanos que me fueron de gran apoyo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Agradezco infinitamente al Biol. Ángel Gabriel Martínez Batallar. Por la disponibilidad y las ganas de compartir siempre sus conocimientos, es un gusto aprender de ti, siempre fuiste y seguirás siendo una pieza muy importante en este proyecto, me has apoyado desde que iniciamos y contigo salieron todas las dificultades, en hora buena es un placer conocerte eres una excelente persona, amigo y maestro, te deseo siempre lo mejor en la vida.

Gracias al Dr. Maikel Fernández López, un gran amigo que siempre nos exhorta a hacer las cosas bien y seguir sin rendirnos. Gracias por el apoyo y las recomendaciones, por prestar un poco de tu tiempo para poder continuar con el proyecto. Es verdaderamente un gusto conocerte y aprender de ti.

Agradezco a mi tutor Dr. Ramón Alberto Batista García, por darme la oportunidad de trabajar junto a él y su equipo de laboratorio, así mismo por confiarme este proyecto, por las correcciones y la disponibilidad para estructurar este trabajo.

Quiero dar también mis agradecimientos a la Dra. Ma. del Rayo Sánchez Carbente. Por permitirme trabajar en su laboratorio, pero lo más importante por siempre estar dispuesta a escucharme y brindarme sus conocimientos y apoyo. Es muy gratificante conocerla, en hora buena le deseo mucho todo lo mejor en esta vida.

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol. Por permitirme trabajar en su laboratorio, por formar parte de mi desarrollo académico. Y por cada una de las observaciones que nos hace, las cuales nos ayudan a crecer como personas y profesionistas. Mil gracias por todo lo que nos brinda.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves. Por brindarme su tiempo y sus valiosos comentarios hacia mi trabajo, es un gusto haber trabajado con usted. Le deseo siempre lo mejor en cada una de sus actividades.

A la Dra. Sonia Dávila Ramos. Por su apoyo y la disponibilidad para realizar los comentarios pertinentes hacia mi trabajo. Es un gusto conocerla y trabajar con usted. En hora buena le deseo mucho éxito.

Gracias a los miembros del Posgrado en Ciencias por su apoyo en todo momento  
En especial gracias a la Lic. María Cristina Aranda Soberanes y Lic. Dulce Verónica Sánchez León, que siempre están pendiente que llevemos nuestras actividades y tramites de la mejor manera, agradezco su atención y disponibilidad que dedican para evitarnos las dificultades en los procesos del posgrado. En hora buena es muy grato contar siempre con ustedes y les deseo siempre lo mejor en sus vidas.

Gracias a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, al Centro de Investigación en Biotecnología, y al centro de Investigación en Ciencia Genómicas de la UNAM. Al CONACYT, institución que nos brinda su apoyo para que los estudiantes podamos realizar nuestros estudios de posgrado.

Agradezco a mis amigos, compañeros del posgrado y del laboratorio, siempre se aprende mucho de cada uno de ellos.

## 1.RESUMEN

La energía que se consume en el planeta en su mayoría proviene de fuentes no renovables como los combustibles fósiles, los cuales actualmente reflejan un notable descenso en sus reservas. La Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) en el 2018 estimó que el consumo diario de crudo oscila 1,59 millones de barriles por día, y prevé que la demanda para este año aumentará hasta 60,000 millones de barriles diarios. Este consumo refleja la demanda de la población mundial para transformar recursos naturales en productos de bienes y consumo, los cuales puedan satisfacer la creciente población actual estimada en 7,350 millones de habitantes (Erken, 2019). Es por ello, que se deben buscar nuevas alternativas de energía que para sostener las demandas de la población, sin generar consecuencias negativas al medio ambiente (UNFPA, 2017).

La biomasa es un residuo agrícola o forestal que constituye una fuente vegetal con un alto potencial de aprovechamiento de azúcares con miras a la producción de bioetanol lignocelulósico (Montes et al., 2012). Es importante mencionar que países en vías en desarrollo, como por ejemplo Brasil, India y México, se enfocan en el manejo de este tipo de materia prima, por lo cual la producción de etanol no compromete la alimentación básica de la población (Álvarez, 2009).

El manejo de rastrojos agrícolas para la obtención de bioetanol implica el pretratamiento o sacarificación de la biomasa mediante métodos físicos (presión, pirólisis, trituración), químicos (ácidos fuertes, hidróxido de sodio, cloruro de calcio, etc.) y biológicos, o en muchas ocasiones mediante la combinación de varios de estos métodos (Giraldo, 2012).

La problemática en el uso del técnicas químicas o físicas radica en la generación de residuos contaminantes como CO<sub>2</sub> e hidroximetilfurfural, este ultimo tóxico para levaduras, microorganismos que realizan posteriormente la fermentación para la obtención de etanol (Viñals, 2012). Además, estos métodos frecuentemente demandan altas temperaturas, que oscilan en el rango de 100 a 700°C (Oliva, 2003)



lo cual impone un alto costo energético y declina sustancialmente su valor ambiental (Giraldo, 2012).

Por su parte, los métodos biológicos generalmente no generan costo elevados por que no requieren la aplicación de altas temperaturas, y tampoco producen residuos contaminantes. Habitualmente estas herramientas son aplicadas mediante el uso de bacterias y hongos (García et al., 2014). Estos microorganismos han tomado una gran importancia debido a la fácil accesibilidad de sus cultivos, y también se caracterizan por tener excelentes propiedades como productores de enzimas degradadoras de lignocelulosa (Batista et al., 2014). Por ejemplo, los hongos ascomicetos se caracterizan por llevar a cabo la “degradación blanca” de la biomasa vegetal, mineralizando la lignina e hidrolizando la celulosa y hemicelulosa en monómeros simples que servirán como materia prima para las biorefinerías (Morales de la rosa, 2015).

Con base en lo anterior se pueden proponer diferentes métodos de sacarificación, donde se combinen los métodos biológicos con un sistema de pretratamiento físico para lograr mayores rendimientos de azúcares fermentables. En muchas ocasiones los métodos físicos y químicos emplean sales o hidróxidos de metales con actividad caotrópica, como por ejemplo, cloruro de sodio (NaCl), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), clorito de sodio ( $\text{NaClO}_2$ ) entre otros, para el pretratamiento de la biomasa (Palomar et al., 2015). Generalmente estos compuestos que coordinan átomos de Na son aplicadas en concentraciones que oscilan entre 1 y 20%, para facilitar la hidrólisis química de la hemicelulosa y celulosa en una extensión mayor al 80%, lo cual genera modificaciones en la estructura cristalina de estos polímeros rompiendo las interacciones mediante puentes de hidrógeno y las interacciones covalentes inter e intracatenarias (Guarnizo et al., 2009). Debido a la aplicación de estos compuestos un inconveniente de los procesos químicos es que pueden generar como producto final, sustratos lignocelulósicos con valores ácidos de pH, y elevados residuos de salinidad (>20% Na), lo cual puede resultar en la inhibición de la actividad de

enzimas de organismos que fermentan los azúcares producto de la hidrólisis, así como la inhibición del crecimiento de muchos microorganismos (Folch et al., 2004). En la actualidad la caracterización fisiológica y molecular de organismos halotolerantes, en particular de sus proteínas haloestables ha ganado gran importancia en la búsqueda de enzimas con potencialidades de operación en ambientes hipersalinos, con concentraciones de NaCl superiores a 0.5 M (salinidad del agua de mar) (Hernández et al., 2002). *Aspergillus sydowii* H1 fue aislado en el laboratorio de Biología Molecular de Hongos en el año 2014 por Batista y colaboradores. Este organismo fue definido como un hongo halófilo, y fue aislado de bagazo de caña suplementado con 2 M de NaCl. Como parte de la caracterización de esta cepa, se examinó su crecimiento en diferentes condiciones concentraciones de NaCl (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M) observando que la velocidad específica de crecimiento resultó óptima entre 0.5 y 1.5 M de NaCl. Esta cepa fue capaz de crecer sobre un amplio rango de sustratos lignocelulósicos como paja de trigo, rastrojo de olote, fibras de agave y aserrín, entre otros (Batista et al., 2014).

Una primera caracterización de sus enzimas lignocelulolíticas demostró su potencialidad para la producir celulasas, xilanasas y peroxidasas, sobre diferentes sustratos lignocelulósicos como bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz, fibra de agave, paja de arroz, y paja de trigo, siendo este último identificado como el mejor sustrato para la producción de las enzimas mencionadas anteriormente (Batista et al., 2014).

Aunque hay un interés creciente en el estudio de la biodiversidad de los microorganismos extremófilos, y en particular de las potencialidades de estos microorganismos para la producción de enzimas de interés industrial (como las enzimas ligninolíticas), pocos estudios centran su atención en caracterizar la producción de estas enzimas como resultado de las condiciones de extremofilia. En este contexto, la comprensión de como las sales como el NaCl afectan la producción de enzimas lignocelulolíticas en hongos resulta sumamente interesante como

conocimiento que permita optimizar tratamientos fúngicos de sustratos lignocelulósicos en condiciones de hipersalinidad.

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo tiene como objetivo analizar el secretoma de *Aspergillus sydowii* H1 por cuantificación relativa empleando marcaje peptídico asistido por isótopos isobáricos estables (iTRAQ). El análisis se realizó a partir de las proteínas extracelulares producidas por *Aspergillus sydowii* H1 creciendo en presencia de paja de trigo (1%) como única fuente de carbono, y en presencia o ausencia de 1 M de NaCl. Estos análisis contribuirán a profundizar el conocimiento sobre la degradación de lignocelulosa en condiciones de hipersalinidad, temática pobremente abordada en la actualidad desde sus bases moleculares y celulares desde una perspectiva de estudios globales ómicos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Reservas de petróleo.

Uno de los recursos energéticos más recurrentes y con mayor margen de explotación en el mundo es el petróleo, del cual podemos obtener diferentes combustibles que son utilizados en diversas actividades, tales como, la producción alimentaria, industrial, el transporte, entre otras (Iñesta *et al.*, 2002). La OPEP para el 2019 reporta una demanda de crudo a nivel mundial de 101,01 millones de barriles por día (mdb), así mismo para el año 2020 se informó una disminución en el consumo que osciló en 92,82 mdb. En promedio entre los años 2019 y 2020 el consumo se perfila en 96,4 mdb. Este incremento en el consumo causa consecuencias negativas en la vida media de los recursos petroleros, la cual se ha pronosticado para un rendimiento de 40 años a nivel global (OPEP, 2018).

La disminución en las reservas de hidrocarburos es un fiel reflejo de la demanda diaria de recursos, sostenida principalmente por el incremento poblacional. Es por ello que generar nuevas alternativas de combustibles que satisfagan las necesidades energéticas, económicas y sociales de la población, resulta crucial no solo para satisfacer los crecientes gastos de combustibles, sino también para disminuir la huella de carbono que genera un impacto ambiental devastador (Valdivia *et al.*, 2008).

### 2.2. Biocombustibles como una alternativa energética.

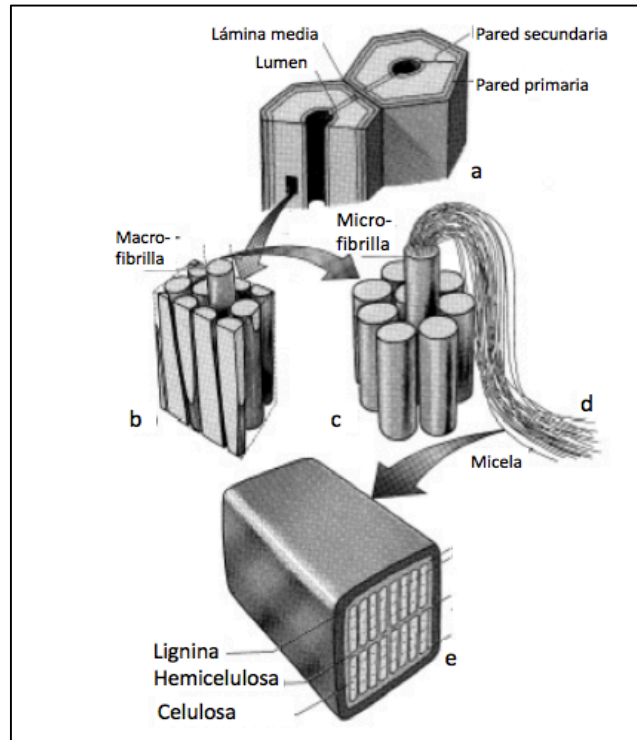
Los biocombustibles son producidos a partir de biomasa vegetal, se consideran recursos renovables y excelentes sustitutos de los combustibles fósiles debido a su valor calórico e impacto medioambiental (Salinas *et al.*, 2009). Actualmente los biocombustibles que se comercializan en el mercado se destinan principalmente al transporte, pero también en menor cantidad a la generación de electricidad, entre otros usos industriales (Álvarez, 2009). Algunos ejemplos de ellos son el biodiesel y los bioalcoholes (bioetanol, biometanol, biobutanol) (Serrano *et al.*, 2011).

Los biocombustibles se encuentran clasificados en tres grupos diferentes dependiendo del material a partir del cual se obtienen. Se clasifican como: de primera generación, segunda generación y tercera generación (Álvarez, 2009; Salinas et al., 2009). Los llamados biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de materias primas como el maíz, caña de azúcar, aceites vegetales y grasas animales, entre otros. Las materias primas anteriores tienen el común denominador de servir como fuentes de alimentos esenciales para muchos países de América Latina, África, Asia y Oceanía. En el mundo la producción de biocombustibles de primera generación tiene varias limitantes, ya que su elaboración representa una seria e injusta amenaza en el suministro alimentario para los países, principalmente en vías de desarrollo (Vivero, 2008; Ramos et al., 2016). Derivado de lo anterior, surgieron los biocombustibles de segunda generación, que son producidos obtenidos a partir de desechos agrícolas, forestales, cultivos no destinados para consumo, y residuos vegetales como, vainas, cáscaras de fruta, entre otros (Blanes et al., 2008). En la actualidad se atiende con especial interés la utilización integral de desechos lignocelulósicos porque son materiales de fácil obtención y de bajo costo, y además no generan compromisos alimentarios (Vivero, 2008).

Por último, los biocombustibles de tercera generación se producen principalmente a partir de microorganismos como algas, bacterias, entre otros, que tienen la capacidad de generar moléculas como triacilglicéridos y ésteres grasos con alto valor calórico (Machado, 2010). También son generados a partir de plantas que producen estos compuestos derivado de su metabolismo, como por ejemplo, ácidos grasos de cadenas entre 18 y 25 átomos de carbono que son transformados en biodiesel (Rondón et al., 2017). Entre las plantas más usadas se encuentran el olivo (*Olea europaea*), higuera (*Ricinus communis*), jatropha (*Jatropha curcas*), palma de aceite (*Elaeis guineensis*) y coco entre otras (Herrera et al., 2020).

### 2.3. Biomasa lignocelulósica.

La biomasa vegetal está constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas de están recubiertas de hemicelulosa y sobre las que se deposita la lignina (Oliva, 2003) (Figura 1). Este material es considerado como un recurso renovable de gran importancia para la producción de energía, principalmente de biocombustibles, como el etanol de segunda generación (Viveros, 2008).

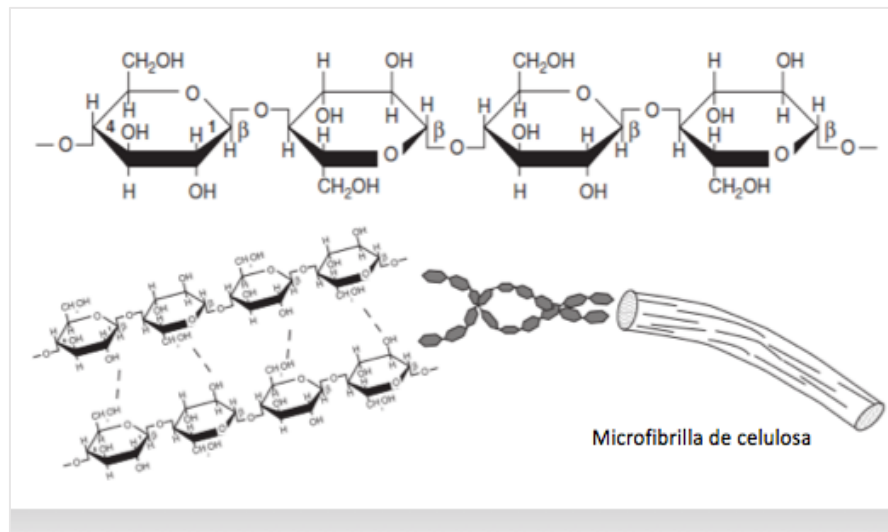


**Figura 1.** Imagen representativa de las fracciones que componen el material lignocelulósico (celulosa, hemicelulosa y lignina). Tomado y modificado de Dávila, 2003.

A continuación se describe la composición molecular y algunas características físicas de cada polímero.

- (i) Celulosa: Es un homopolímero policristalino no ramificado presente en la pared celular de las plantas. Representa aproximadamente entre el 20 y 50% del peso seco de la pared celular en dependencia de la especie (Oliva, 2003). Las microfibrillas de celulosa se forman por la unión de 50 a 15,000 unidades de D-glucosa a través de enlaces  $\beta$ -1-4 glucosídico

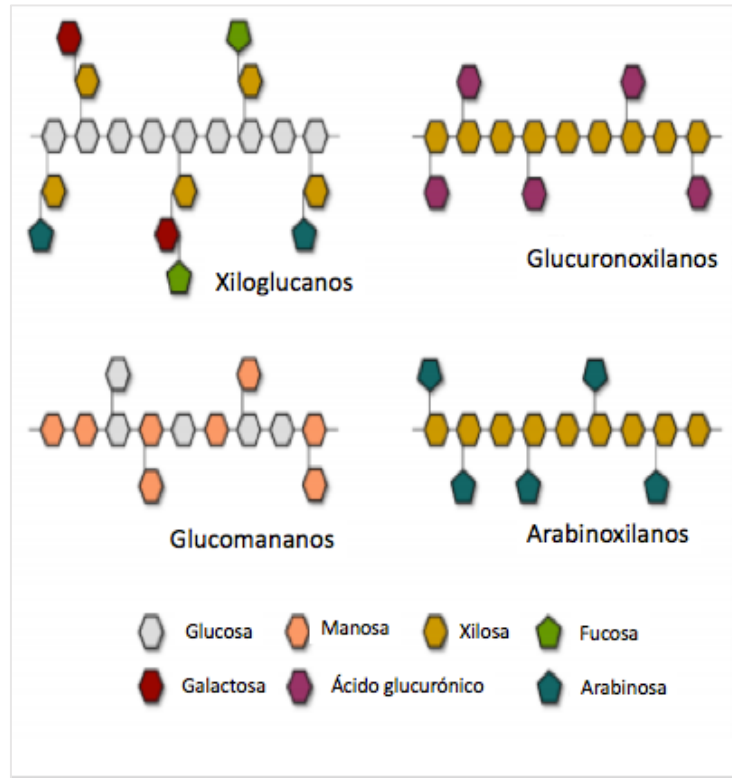
(Gutiérrez et al., 2010) (Figura 2). Los monómeros de glucosa forman dos puentes de hidrógeno intramoleculares y uno intermolecular generando regiones muy ordenadas que confieren alta grado de cristalinidad, haciendo de la celulosa un polímero altamente insoluble al agua y muy resistente a la degradación enzimática. Por el contrario, las zonas amorfas o de menor ordenamiento, presentan una mayor accesibilidad a enzimas celulolíticas, siendo más susceptible a la degradación enzimática (Morales de la Rosa, 2015).



**Figura 2.** Representación de la estructura de la celulosa. Imagen tomada y modificada de Valdez, 2015.

- (ii) Hemicelulosa: Se caracteriza por ser un heteropolímero de estructura diversa y más compleja que la celulosa, representa entre un 15 y 35%, aproximadamente, de la biomasa vegetal (Oliva, 2003). La hemicelulosa está formada por asociación de diversas cadenas heterogéneas de xilanos, galactomananos, xiloglucanos y arabinoxilanos (Figura 3). Su estructura está principalmente compuestas por polímeros de cadenas cortas y ramificadas con una gran variedad de pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-galactosa, D-glucosa y D-manosa), ácidos úronicos (glucurónico, 4,O-metilgalacturónico), desoxihexosas (ramnosa y fucosa) y la asociación de grupos feruloil, O-acetil, y O-metil (Gutiérrez

et al., 2010). Los azúcares se encuentran unidos por enlace glicosídico  $\beta$ -1-4. La hemicelulosa presenta un grado de polimerización que no excede generalmente los 200 monómeros, y su función fundamental es mantener unida la celulosa y la lignina para brindar rigidez a la pared celular de las plantas (Morales de la Rosa, 2015).

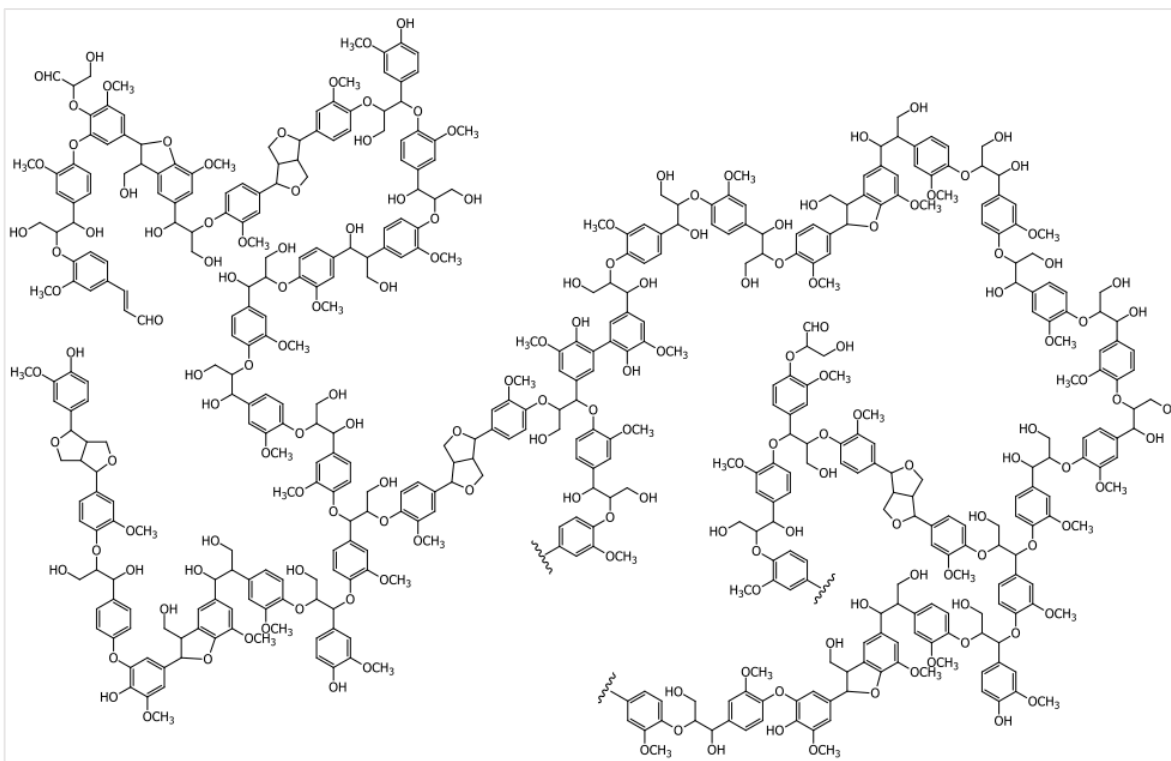


**Figura 3.** Heteropolisacáridos y azúcares que forman parte de la estructura de la hemicelulosa. Tomado y modificado de Chamorro, 2019.

- (iii) **Lignina:** Dependiendo de la especie vegetal, el contenido de este polímero oscila entre un 10 a 30% de total del total de la pared vegetal. Es considerado el tercer polímero más abundante en la Tierra después de la celulosa y hemicelulosa (Gutiérrez et al., 2010). Su arquitectura química esta definida principalmente por la polimerización de tres alcoholes aromáticos: cumarílico, coniferílico y sinapílico, (Morales de la Rosa, 2015) (Figura 4).



Este heteropolímero actúa como una barrera de defensa ante la infección por patógenos y desempeña importantes funciones en el transporte de metabolitos, así como de agua y nutrientes a través del sistema vascular de las plantas (Dávila, 2003; Olivo, 2003).



**Figura 4.** Representación de la estructura de la lignina. Tomada de Chávez et al., 2013.

#### 2.4. Sacarificación de la biomasa lignocelulósica.

Debido a la cristalinidad y compleja organización de la lignocelulosa se han propuesto diversas tecnologías que se enfocan en aumentar la porosidad de la biomasa vegetal para rendir un mejor rendimiento de sacarificación (Giraldo, 2012). Es importante mencionar que la invención de diferentes procesos tanto físicos, químicos y biológicos ha permitido “relajar” esta red de cristalinidad unida y estabilizada entre si por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes (Barroso, 2010). Estas tecnologías han permitido acceder, con un mejor rendimiento, a los azúcares que conforman la celulosa y hemicelulosa (Barroso, 2010).

#### 2.4.1. Métodos físicos

Se enfocan principalmente en la aplicación de métodos mecánicos y térmicos que tienen como objetivo principal la fragmentación de la biomasa en partículas más pequeñas susceptibles de degradación (Giraldo, 2012).

La fragmentación mecánica como proceso de pretratamiento físico permite la reducción de tamaño de la materia lignocelulósica (Giraldo, 2012). Se han reportado varios métodos como la molienda por molinos de bolsa, el cual se ha reportado como el más eficaz (Sun, 2003). Otros como la radiación, por ejemplo, el haz de electrones y radiación por microondas, que han sido satisfactoriamente utilizados en el pretratamiento de diferentes biomásas vegetales, como caña de azúcar, bagazo de maíz y sorgo (Oliva, 2003). Sin embargo, estas tecnologías demandan altos niveles de energía, y por tanto, no son económicamente favorables, ni tampoco amigables con el medio ambiente (Oliva, 2003).

#### 2.4.2. Métodos químicos

Las metodologías más usadas para generar una reducción en la cristalinidad de la lignocelulosa se caracterizan por el uso de soluciones químicas de ácido sulfúrico, clorhídrico y fosfórico concentrado a 160 °C (Anderson, 2009). Existen otras técnicas químicas de sacarificación como HWL (HotWaterLiquid) y AFEX (AmoniExpansionFiber), las cuales han reportado rendimientos que oscilan entre el 90 y 100% de conversión a productos fermentables, pero también reflejan inconvenientes económico-ambientales debido a la aplicación excesiva de energía (200 °C) (Viñals, 2012). También se generan diferentes residuos producto de la degradación acida de las pentosas y hexosas, originando moléculas como furfural e hidroximetilfurfural, ácido láctico y glicólico (Anderson, 2009). En mismas condiciones, la degradación de lignina genera productos aromáticos, fenólicos, poliaromáticos, aldehídos y grupos acetilo producto de la degradación de hemicelulosa (Machado, 2010).

La presencia y concentración de estos agentes causa efectos negativos como la inhibición enzimática, pérdida de la integridad de la membrana e inhibición del crecimiento en organismos como levaduras, microorganismos que posteriormente son empleados en la fermentación para la obtención de bioetanol (Anderson, 2009).

La aplicación de soluciones a base de sales e hidróxidos como hidróxido de sodio (NaOH), clorito de sodio (NaClO<sub>2</sub>) y cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), en concentraciones entre el 1 al 3%, acompañadas de ácido sulfúrico en concentraciones variables entre 0.75 y 72%, empleadas en el blanqueamiento e hidrólisis ácida de la lignocelulosa, implicando la remoción parcial o total de la lignina, dejando expuestas la celulosa y hemicelulosa para la sacarificación y posterior fermentación de los azúcares (Salcedo et al., 2012). El proceso de remoción consiste en aplicar soluciones de NaOH, NaClO<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>, así como ácido sulfúrico o acético, los cuales liberan de la biomasa los agentes extraíbles como agua, proteínas crudas, cenizas y lípidos solubles, entre otros (Toscano et al., 2015). Luego, la biomasa es sometida a hidrólisis ácida con solución de ácido sulfúrico (72%) provocando la disociación de la lignina del resto de los polímeros (Toscano et al., 2015).

Es importante mencionar que, en todas las etapas del proceso, la biomasa es lavada y neutralizada cada vez que recibe una solución diferente (Salcedo et al., 2012). Estos pretratamientos podrían significar una ventaja hacia los organismos fermentadores de azúcares, ya que se reducen los agentes tóxicos sobre el crecimiento microbiano como, fenoles, compuestos aromáticos y poliaromáticos, entre otros, procedentes de la degradación ácida de la lignina (Machado, 2010).

Por otra parte, la generación de holocelulosa con características ácidos de pH (4) y una salinidad residual de 300 a 500 mM, representa una enorme desventaja, ya que estas propiedades químicas pueden inhibir o disminuir el crecimiento, así como comprometer el metabolismo de organismos fermentadores como *Saccharomyces cerevisiae* (Folch et al., 2004).

### 2.4.3. Métodos biológicos.

Para estos procesos las investigaciones se han ocupado de emplear microorganismo como, bacterias *Paraccocus sp*, *Pseudomonas sp*, *Rhizobium sp* y hongos que se caracterizan por secretar una gran diversidad de enzimas lignocelulolíticas (Ruiz, 2017; Cuervo et al., 2009). Es importante resaltar que, durante la implementación de estas tecnologías de biodegradación, deben considerarse que el organismo a utilizar sea capaz de alcanzar una abundante colonización del sustrato, mantener su crecimiento durante largos períodos de tiempo, y producir preferentemente enzimas extracelulares que logren deconstruir la celulosa, hemicelulosa y lignina en azúcares fermentables (Ruiz, 2017).

En la actualidad se ha dado un enfoque prioritario hacia las cepas fúngicas, en especial aquellos hongos de pudrición blanca como, *Penicillium sp*, *Trichoderma reesei*, *Phanerochate chrysosporium*, *Fusarium sp* y *Aspergillus sp*, ya que son los organismos más estudiados por ser un grupo polifiléticamente diverso y por la producción de celulasas y xilanasas extracelulares con gran capacidad de hidrólisis sobre diferentes sustratos (Cuervo et al., 2009). Estos organismos, también son una fuente importantes por la producción de glioxal oxidasas, aril alcohol oxidasas, celobiosa deshidrogenasas, celobiosa quinona oxidoreductasas, lacasas, peroxidasas y esterases, las cuales intervienen en la mineralización de la lignina. (Gutiérrez, 1996; Luley, 2006). Los ascomicetos de pudrición blanca son hongos de rápido crecimiento y se han perfilado como modelos idóneos en la degradación de materiales recalcitrantes como desechos vegetales agrícolas, plaguicidas, fármacos, hidrocarburos, así como en la remoción de metales pesados, entre otros (Ruiz, 2008; Quintero et al., 2011).

Entre los hongos más usados en los tratamientos biológicos destacan los *Aspergillus* (Vries et al., 2017). Este género ha tomado gran interés por empresas como Sigma-Aldrich, la cual comercializa algunas enzimas como celulasa (producto: C2605) de *Aspergillus niger*, Pectinasas (P2611 y P4716) de *Aspergillus aculeatus* y *niger*, respectivamente, empleadas en la hidrólisis enzimática de polímeros vegetales.

Por otra parte el género *Aspergillus* es un grupo biológicamente diverso de importancia médica, alimentaria e industrial (ejemplos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, entre otros). Se caracterizan por su facilidad de colonizar diferentes hábitats, principalmente crecen sobre materia inerte, suelos, vegetales vivos, incluso pueden albergarse en animales (Vries et al., 2017). Es un grupo muy diverso con aproximadamente 350 especies. Se sabe que alrededor del 64% de las especies de *Aspergillus* presentan reproducción asexual, y el resto también puede reproducirse sexualmente; estas estrategia evolutivas les han permitido proliferar y persistir en diferentes condiciones de estrés (Samsón et al., 2014). Por otra parte, las especies del género *Aspergillus* son bien conocidas por su capacidad de crecer sobre diversas fuentes de carbono con estructuras químicamente muy diferentes, incluso recalcitrantes a la degradación por otros organismos (Vries et al., 2017).

El interés industrial que ha surgido en torno a este género es debido a la hipercapacidad para la producción de ácidos orgánicos como ácido cítrico y glucónico, los cuales puede ser utilizados como aditivo acidulantes y antioxidantes en la producción de alimentos (Sansón et al., 2014). Los aspergilli también presentan una larga historia de uso como productores de enzimas modificadoras y degradadoras de la biomasa vegetal, lo que les ha permitido un estilo de vida generalista, ya que no presentan una especialización en ningún sustrato vegetal en particular, pero si logran degradar prácticamente todos los polímeros vegetales (Vries et al., 2017). Así mismo, han desarrollado repuestas al estrés mediado por diversos procesos como es la transducción de señales, síntesis de solutos compatibles y remodelación de la pared celular, así como también han generado estrategias de defensa mediante la producción de metabolitos secundarios empleados en mecanismos de patogenicidad, comunicación celular y competencia por nutrientes (Vries et al., 2017).

## 2.5. Enzimas lignocelulolíticas

Para la biodegradación de material vegetal se han reportado varias enzimas hidrolíticas como esterasas, celulasas y xilanasas, y aquellas que generan la despolimerización por reacciones de óxido-reducción como lacasas y peroxidases, entre otras (Quiroz et al., 2013). Además, se ha observado como característica relevante la versatilidad que tienen muchas de estas enzimas, para la degradación de otros compuestos recalcitrantes como fármacos, pigmentos, plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Ruiz, 2008).

### 2.5.1. Celulasas

Pertencen a la familia glicosil hidrolasa (GH) la cual presenta diversidad que permite la hidrólisis de celulosa mediante la ruptura de enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídico de la regiones amorfas y cristalinas de la celulosa (Macarron, 1992). Por su parte las endoglucanasas acceden por las regiones amorfas y cristalinas de la celulosa, donde será generada la ruptura de las cadenas en oligosacáridos de tamaños variados (Ovando, 2005). Cada uno de estos servirá como sustrato para la acción de las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH), las cuales hidrolizan estos sustratos para rendir diferentes azúcares estructuralmente más sencillos como la celobiosa y celotriosa, entre otros (Ovando, 2005). Posteriormente, las  $\beta$ -D-glucosidasas escinden los enlaces glucosídicos de la celodextrina para la obtención final de glucosa libre (Martínez, 2008).

### 2.5.2 Xilanasas

Este grupo de enzimas sintetizadas generalmente por hongos y bacterias, son clasificadas como glicosidasa con actividad carbohidrasa (Ovando, 2005). Las endo- $\beta$ -(1,4)-d-xilanasas están involucradas principalmente en la hidrólisis del arabinoxilano y separan arabinoxilanos mediante la hidrólisis de manera aleatoria de los enlaces internos 1,4- $\beta$ -d-xylosídico. Luego las  $\beta$ -xilosidasas terminan el proceso de despolimerización de la hemicelulosa y comienza la degradación de los polímeros del xilano en moléculas de D-xilosa (Collins et al., 2005). Los polímeros

ramificados de galactomanano son hidrolizados por endo- $\beta$ -1,4-manasas, disociando las cadenas de manosa, mientras las  $\alpha$ -galactosidasas se encargan de separar la D-galactosa de la cadena principal (Devia, 2014). Por su parte el heteropolímero de xiloglucano es degradado por diversas enzimas. Las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas,  $\alpha$ -xilosidasa,  $\alpha$ -fucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa liberan los azúcares como D-arabinofuranosa, D-xilosa, L- fucosa y D-galactosa, de la cadena principal formada por monómeros de glucosa la cual puede ser hidrolizada por una xiloglucanasa, rompiendo los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos (Cooper, 2013).

Las xilanasas son un grupo diverso de enzimas que confieren alto valor agregado a los cocteles enzimáticos que son usados para la degradación de la lignocelulosa porque, aunque estas enzimas permiten degradar un solo tipo de polisacáridos complejos, también pueden ser empleadas en procesos industriales como aditivos, blanqueadores del pulpa celulósica, y en el tratamiento de aguas residuales, entre otros (Montoya, 2012)

### 2.5.3. Lacasas

En su mayoría, las lacasas fúngicas son glicoproteínas monoméricas que oscilan entre 45 y 100 kDa, se caracterizan por presentar cuatro átomos de cobre en su sitio catalítico (Rodríguez, 2006). Las lacasas se clasifican como enzimas polifenol oxidasas (Gutiérrez, 2009), y realizan la reducción de oxígeno molecular a agua, la cual se acopla al proceso de oxidación de diferentes sustratos como pueden ser lignina, compuestos fenoles y aminas (Rodríguez, 2006). Cada proteína lacasa presenta un sitio activo con cuatro iones de cobre, uno de tipo 1 (T1), uno de tipo dos (T2) y dos de tipo tres (T3), donde el sitio T2 y los T3, los cuales se encuentran organizados espacialmente para ligarse al oxígeno, el cual actúa como el aceptor final de electrones (Gutiérrez, 2009). Se conoce que estas enzimas están ampliamente distribuidas en casi todos los microorganismos y plantas (Gutiérrez, 2006).

#### 2.5.4. Peroxidasas

Conforman una familia de isoenzimas con actividad presente en muchos organismos como bacterias, hongos, plantas y animales (Castro, 2013). Pertenecen a la clase oxidoreductasa, y por lo general poseen un grupo hemo para la oxidación de especies reactivas de oxígeno y la degradación de polímeros complejos como la lignina (Herrero, 2014). Por su actividad de oxidación y reducción son capaces de actuar sobre compuestos fenólicos y no fenólicos, diversos químicamente, mediante el empleo de peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Los hongos que degradan lignocelulosa, por ejemplo los del género *Aspergillus* se caracterizan por sintetizar y secretar tres tipos de estas enzimas: lignino peroxidasa (LiP) (E.C.1.11.1.14), la cual es capaz de oxidar alcohol veratrílico en veratrilaldehido: manganeso peroxidasa (MnP) (E.C.1.11.1.13), enzimas que presentan afinidad por el  $Mn^{2+}$  como cofactor, el cual es oxidado a  $Mn^{3+}$  formando complejos con ácidos dicarboxílicos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, los cuales difunde hacia la enzima para la oxidación de la lignina. Finalmente la peroxidasa versátil (VP) es un enzima que combina las propiedades catalíticas de la LiP y MnP, para llevar a cabo la oxidación de la lignina (Ocampo, 2017).

#### 2.5.5. Esterasas.

Este grupo de enzimas constituye una subclase dentro de las hidrolasas de ésteres carboxílicos, reciben también el nombre de esterazas del ácido ferúlico, hidrolasas de ácidos cinámicos, *p*-cumaroil esterazas y cinamoil esterazas (Calvo, 2018).

Esta familia de enzimas hidrolizan el grupo éster de los ácidos hidroxicinámicos (AHC) como ácido ferúlico, unidos de manera covalentemente al xilano (Morell et al., 2014). Cuando se realiza la ruptura lignina-feruloato-arabinosilano se facilita de manera completa la degradación de la pared celular de las plantas (Morell et al., 2014). Por lo anterior, su importancia radica en remover los grupos accesorios unidos a las cadenas del heteropolímero, para favorecer el acceso a enzimas hidrolíticas como celulasas y xilanasas (Calero, 2006).



#### 2.4.5. Organismos Extremófilos (Halófilos) y Aplicaciones Biotecnológicas

En los últimos años se ha generado un importante interés en la búsqueda de organismos que habitan ambientes hostiles para la vida como se concibe por nosotros (*Homo sapiens*). Los microorganismos extremófilos crecen de manera óptima en ambientes extremos que poseen condiciones atípicas o extremas de vida (Castro, 2011). El crecimiento óptimo se establece por manifestar en estos ecosistemas extremos la velocidad específica de crecimiento de aquellos organismos clasificados como extremófilos (Ramírez, 2006). En dependencia de la condición extrema en la que los microorganismos manifiestan su condición de extremofilia, se definen diferentes clasificaciones para estos microorganismos extremófilos. Así, podemos definir los termófilos, psicrófilos barófilos, xerófilos, alcalófilos, acidófilos y halófilos, entre otros (Ramírez, 2006).

Los microorganismos halófilos se caracterizan por crecer de manera óptima en ambientes hipersalinos que poseen una concentración molar de NaCl superior a la existente en el agua de mar (0.5 M NaCl) (Gunde-Cimerman et al., 2000). Las características genéticas, fisiológicas y metabólicas que permiten el desarrollo de estos organismos en ambientes variados en cuanto a su composición salina, ha permitido su clasificación en diversos grupos, como por ejemplo, halófilos extremos, moderados, débiles; halotolerantes o halófilos obligados (González, 2002). Como halófilos los hongos tienen una historia joven, solo 20 años de reportar los primeros hongos halófilos (Gunde-Cimerman et al., 2000). Las cepas de hongos que pueden crecer en condiciones de hipersalinidad resultan una parte de la biodiversidad fúngica muy promisoría para la producción de enzimas haloestables con robustas propiedades catalíticas que tengan utilidad en una diversidad inmensa de aplicaciones biotecnológicas (Batista et al., 2014).

A través de los años la investigación en la caracterización de hongos se ha centrado en algunos géneros como, *Cladosporium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, así como algunas especies del grupo de los *Aspergillus* y *Penicillium*. Particularmente cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis* y *Aspergillus versicolor* se han descrito como un grupo de hongos

capaces de sintetizar y secretar cocteles enzimáticos que presentan actividad para la biodegradación de compuestos tan recalcitrantes como la lignocelulosa (Vries et al., 2017).

## 2.6. La proteómica como una metodología de análisis en la expresión diferencial de proteínas.

La proteómica se basa fundamentalmente en el análisis del proteoma total de una célula organismo, órgano, fluido o tejidos, en un momento fisiológico determinado (Pando y Ferreira, 2007). Se basa en un análisis proteico a gran escala, logrando integrar un conjunto de procesos y herramientas indispensables por la elevada precisión y eficacia ( Castellanos, 2005). Así mismos la proteómica no solo se centra en la identificación y cuantificación del proteoma, sino que también se basa en describir las interacciones, localización, actividad, modificaciones y función dentro y fuera de la célula de las proteínas identificadas (Encarnación, 2005).

Los análisis de proteómica se basan generalmente en 4 etapas básicas las cuales consisten en la preparación de la muestra, fraccionamiento de la muestra, análisis por espectrometría de masas (MS) y el análisis bioinformático de los datos. La electroforesis de una dimensión (1D) y dos dimensiones (2D) son técnicas que permite visualizar de manera general y global el proteoma de una muestras, y permiten realizar un análisis semicuantitativo mediado por la comparación de un pool de geles entre diferentes muestras (Albar, 2014). Así mismos los análisis bioinformáticas de comparación de los mapas del proteoma o secretoma, permiten identificar proteínas con perfiles de expresión diferencial que posteriormente podrán ser procesadas para su identificación por MS (Pando y Ferreira, 2007).

Con base en lo anterior, la proteómica ha abierto un campo de estudio para el análisis de grupos enzimáticos producidos por hongos lignocelulolíticos. Estas enzimas han sido extraídas, cuantificadas e identificadas por técnicas como MS, lo que ha permitido conocer aquellas enzimas involucradas en la degradación extracelular de diferentes sustratos como la lignocelulosa, entre otros.

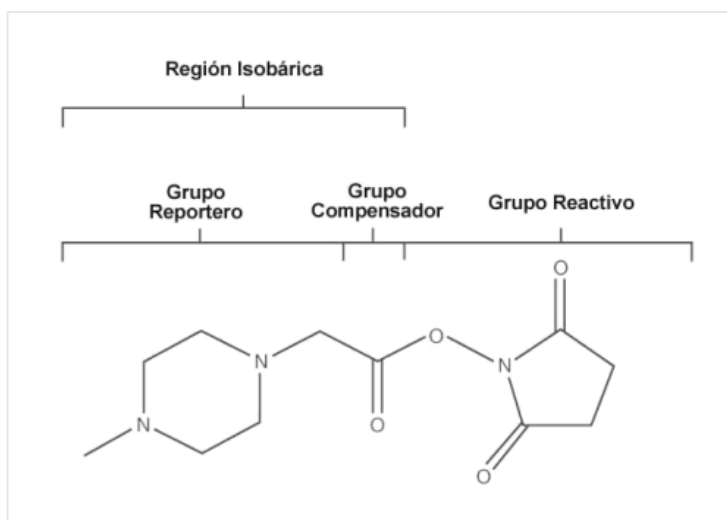
Trabajos realizados en el 2009 por Villenas y colaboradores, compararon mediante mapas proteicos 2D la expresión exclusiva y sobreexpresión de proteínas intercelulares de *Aspergillus niger* ATCC 10864 involucradas en la formación de biofilm. Los cultivos en presencia de biopelícula mostraron que el 19% de las proteínas seleccionadas fueron sobreexpresadas, y el 32% fueron proteínas expresadas de manera exclusiva en la condición de formación de biofilm. Contrariamente, parte de los cultivos de vida libre (sin formación de biofilm) reflejaron un 44% de proteínas sobreexpresadas y un 7% de expresión exclusiva. En el caso del cultivo en presencia de biopelícula se logró anotar el 55% de las proteínas (Villena et al., 2009).

Recientemente se han usado otras herramientas como las basadas en etiquetas isobáricas para la cuantificación proteica absoluta y relativa (iTRAQ), lo cual representa un nuevo enfoque en la espectrometría de masas (MS) para la cuantificación relativa de proteínas para distintas condiciones biológicas (Wiese, 2007). El marcaje con etiquetas iTRAQ, consiste en la unión específica de un isotopo estable que reacciona con péptido a través de los grupos amino presentes en el extremo N-Terminal de la cadenas polipeptídicas en los residuos de lisina, o también con lo grupos tioles o sulfhidrilo presentes en las cisteínas (Protocolo iTRAQ, 2004). La marcas de iTRAQ se caracterizan por poseer tres elementos bien definidos. (i) un grupo reactivo, (ii) un grupo compensador, y (iii) un grupo reportero (Figura 5). Dependiendo de los requerimiento y las muestras de análisis, se han proporcionados dos versiones del iTRAQ, la primera contiene 4 marcas, y la segunda 8 (Protocolo iTRAQ, 2004).

El grupo reactivo deriva de la N-hidroxisuccimida el cual reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino presente en los residuos de lisina y el extremo N-terminal de los péptidos proteicos. A su vez el grupo reportero deriva de la N-metilpiperacina que durante la fragmentación peptídica se libera de los mismos, siendo detectados por el espectro de MS/MS, y generando señales con una relación masa carga de 113,1: 114,1;

115,1; 116,1; 117,1; 118,1; 119,1; 1121,1, en la versión de ocho etiquetas, o de 114,1 a 117,1 en la de cuatro etiquetas.

Por su parte el grupo compensador ecualiza las masas de los reactivos, dando como resultado una masa igual en cada uno (Rodríguez, 2010).



**Figura5.** Componentes principales de una marca isobárica para la cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ), grupo reactivo deriva de la N-hidroxisuccimida, grupo compensador y grupo reportero deriva de la N-metilpiperacina (Rodríguez, 2010).

A continuación se citan algunos organismos y su estudio en torno al secretoma expresado en presencia de sustratos vegetales lignocelulosicos.

En el 2018, Fagundes y colaboradores analizaron el secretoma de *Aspergillus fumigatus* AF293 cultivado durante 24, 48 y 72 horas sobre bagazo de caña de azúcar pre tratado por explosión de vapor. En este lapso de tiempo se determinó la actividad enzimática de xilanasas y celulasas encontrando actividad solo a las 24 horas de cultivo. Las muestras de sobrenadante obtenidas a 24 horas de cultivo permitieron identificar por SDS-PAGE y MS, proteínas involucradas en la degradación de celulosa, como las glicosil hidrolasas (GH) de las familias 5, 6, 7, 43 y 45. GH de las familias 2,10,11,30 y 43 fueron identificadas presuntamente como importantes para la degradación de hemicelulosa. También fueron identificadas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs), proteínas de actividad auxiliar (AA), carbohidrato esterasas (CE) de las familias 1, 4, 8, 15, y 16, polisacárido liasa

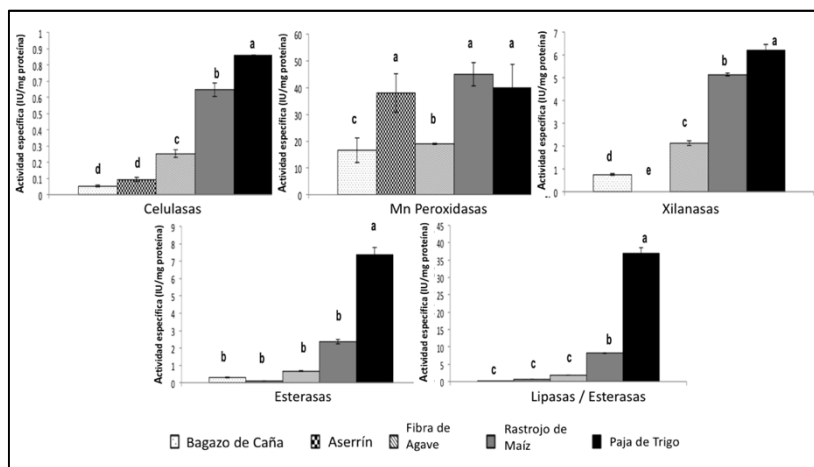
(PL) de las familias 1,3, 4 y 20, así como glicosil transferasas (GT) de las familias 1, 2, 4, 8, 20, 35 y 48. El conjunto de diferentes proteínas expresadas por *Aspergillus fumigatus*, sugieren que la cepa puede ser eficiente en la degradación de material vegetal, como el bagazo de caña de azúcar.

Gustavo Pagotto y colaboradores, en el 2015, proporcionaron un análisis interesante sobre la secreción de enzimas degradadoras de material vegetal producidas por una cepa de *Aspergillus niger* N402 y otra de *Trichoderma reesei* RUT-C30. Ambos ascomicetos fueron cultivados en medio de cultivo básico (BCM) suplementado con bagazo de caña de azúcar pre-tratado por explosión de vapor, y como control, bagazo de caña sin pre-tratamiento. Los azúcares libres fueron cuantificados durante 6,12 y 24 horas en ambos tratamientos de cultivo. Siendo el tiempo 6 horas donde existió una mayor producción de azúcares-

Con base en los resultados anteriores el sobrenadante se analizó por espectrometría de masas en este tiempo de muestreo, en el cual se pudieron detectar, en *A. niger* N402 un total de 65 CAZYmes como glicosil hidrolasas de la familia 17, 55, 3, 5, 6, 7, 30, 28, 53, 10, 11, 43, 51, 54, 62, 67, 35, 12, 74, 32, 65, 95, 27, 16, 72, 81, 13, 15, 18, 20, 47, 92, carbohidrato esterasas de las familias 1, 8, 12, 16, polisacárido liasas de la familia 1 y actividad accesoria de la familia 9. Para el caso de *Trichoderma reesei* la expresión de proteínas fue menor en comparación a *A. niger*, ya que solo se cuantificaron 24 enzimas secretadas como, GH de las familias, 17, 55, 1, 3, 5, 6, 7, 79, 43, 11, 30, 16, 27, 31, 37, 63, 7, 20, 35, 72, 18, CE de la familia 5, polisacárido liasa y de actividad accesoria de la familia 9. La comparación de expresión en ambos tratamientos de cultivo se llevó a cabo mediante mapas de calor que muestran como *A. niger* sostiene una mayor expresión en ambos tratamientos a diferencia de *Trichoderma*.

### 3. Antecedentes

*Aspergillus sydowii* es una cepa que se aisló a partir de la fermentación sólida de un lote de bagazo de caña de azúcar suplementado con 2 M de NaCl (Batista et al., 2014). Los análisis del crecimiento radial de la cepa en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) a diferentes condiciones de temperatura (28, 37 y 42°C) y concentración salina (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl), permitieron observar una mayor velocidad de crecimiento a 28°C en el rango de 1 a 1.5 M de NaCl. Con base a estas características y con el interés de estudiar la capacidad de esta cepa en la producción de enzimas lignocelulolíticas, se obtuvieron cultivos en presencia de diferentes biomásas vegetales como bagazo de caña, fibra de agave, rastrojo de maíz, aserrín y paja de trigo. Los sobrenadantes obtenidos luego de 10 días de cultivo del hongo en presencia de los sustratos anteriormente mencionados fueron analizados mediante zimogramas, y las actividades enzimáticas para celulasas y xilanasas fueron determinadas. Los mejores valores de actividad enzimática correspondieron a la actividad xilanasas, celulasa, esterasa y lipasa, cuando *Aspergillus sydowii* fue cultivado en presencia de paja de trigo como única fuente de carbono. Estos estudios demostraron que *Aspergillus sydowii* es una cepa con potencialidades para la degradación de biomasa vegetal en condiciones de alta salinidad (Batista et al., 2014).



**Figura 6.** Actividades enzimáticas de *Aspergillus sydowii*. Cultivado en diferentes sustratos. Esquina superior izquierda: actividad celulasas: Mn peroxidasas: Xilanasas: Esterasas y lipasas/esterasas (Batista et al., 2014).

En el año 2019, Ramirez-Olivano caracterizó preliminarmente a nivel de laboratorio la producción de un coctel enzimático lignocelulolítico obtenido a partir de la misma cepa de *Aspergillus sydowii* crecida en condiciones de paja de trigo e hipersalinidad. El estudio también incluyó la caracterización de las actividades enzimáticas obtenidas sobre otros sustratos como rastrojo de olote, fibras de agave y rastrojo de trigo, durante 4, 8, 12 y 16 días a 28 °C en presencia de 1 y 2 M de NaCl. Los cultivos fueron generados en cultivos sumergidos y semisólido y se observó que la cepa *Aspergillus sydowii* H1 fue capaz de producir xilanasas, celulasas, esterases, lacasas y peroxidasas estables en condiciones de halofilia hasta 3 M NaCl. En cultivos líquidos, la actividad xilanasa fue mayor en el día 2 (400 U/L), mientras que en los cultivos semisólidos se alcanzó un máximo de actividad de 200 U/L en el día 8 de fermentación. Estos valores de actividad fueron obtenidos en paja de trigo como sustrato en presencia de 1 M NaCl. La evaluación de la actividad celulasa producida por *Aspergillus sydowii* H1 en cultivos sumergidos reflejó una mayor actividad en el día 2 (300 U/L). Este comportamiento también fue similar en cultivos semisólidos. Cabe destacar que los cultivos semisólidos, en promedio, reflejaron una mayor actividad celulolítica. En cuanto a la actividad esterasa, el máximo de actividad se presentó en cultivos líquidos de *Aspergillus sydowii* luego del día 8 (1.5 U/L). En este trabajo se observó una baja actividad de lacasas (> 0.4 U/L) y peroxidasas (0.3 U/L). Estos resultados demostraron a nivel de laboratorio que *Aspergillus sydowii* es un hongo halófilo capaz de producir enzimas lignocelulolíticas en diferentes concentraciones de NaCl. Este hecho justifica la pertinencia de realizar los estudios proteómicos para analizar los perfiles de proteínas secretadas en condiciones de 1 M NaCl cuando el hongo crece en presencia de paja de trigo.

#### **4.JUSTIFICACIÓN.**

La disminución en las reservas de combustibles fósiles es un problema que puede atenderse proponiendo o innovando tecnologías para la obtención de nuevos combustibles. El manejo y aprovechamiento integral de residuos vegetales generados durante el término de la cosecha agrícola, pueden funcionar como una alternativa energética que valore estos residuos con miras a la producción de biocombustibles. Es importante mencionar que estos materiales son de difícil descomposición debido a la compleja estructura de la lignocelulosa.

Los tratamientos químicos y físicos, mayormente empleados, logran un pretratamiento adecuado de la biomasa vegetal, y por tanto, niveles de sacarificación competitivos en la industria. Sin embargo, estas estrategias usualmente tienen un alto costo energético y ambiental ya que generan usualmente residuos tóxicos, los cuales resultan en la inhibición de microorganismos que participan en el proceso de fermentación. Por lo anterior es importante proponer técnicas en las cuales la sacarificación de la biomasa es asistida por metodologías que combinen los métodos físico-químicos, con otros, como los métodos biológicos de sacarificación de biomasa. Los microorganismos, en particular los hongos, ofrecen una alternativa única para diseñar prototipos de procesos biológicos de sacarificación de biomasa ya que son organismos productores por excelencia de enzimas extracelulares lignocelulolíticas. En particular, los microorganismos extremófilos, como los hongos halófilos, producen proteínas con cualidades catalíticas robustas, que manifiestan ser funcionales en condiciones de hipersalinidad. El aislamiento y análisis molecular de estos organismos y su expresión enzimática promete una mayor eficiencia en la sacarificación de materiales recalcitrantes como la lignocelulosa. El estudio de estos procesos mediante aproximaciones proteómicas ayudan a obtener datos masivos que permiten analizar en detalle los perfiles proteicos involucrados en las condiciones de sacarificación de la biomasa.



## 5.Hipótesis

El secretoma *Aspergillus sydowii* H1 revelará cambios en los perfiles de expresión de proteínas lignocelulolíticas y de respuesta a NaCl, cuando es cultivado sobre paja de trigo en presencia y ausencia de condiciones hipersalinas (1 M NaCl),

## 6.Objetivo general

Analizar mediante cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS/MS) (iTRAQ) la expresión diferencial de proteínas del secretoma de *Aspergillus sydowii* H1 cultivado en condiciones hipersalinas (1M NaCl) sobre paja de trigo como única fuente de carbono.

### 6.1. objetivos específicos

1. Obtener condiciones de cultivo estandarizadas que permitan la producción y obtención del secretoma de *A. sydowii* cultivado en paja de trigo como única fuente de carbono, en presencia y ausencia de 1 M NaCl.
2. Extraer y purificar el secretoma de *A. Sydowii* cultivado sobre paja de trigo como única fuente de carbono en condiciones de hipersalinidad (1M NaCl).
3. Identificar las proteínas expresadas diferencialmente por la cepa *A. sydowii* cuando se cultiva en condiciones hipersalinas (1M NaCl) y paja de trigo como fuente de carbono.
4. Comparar el secretoma de *A. sydowii* crecido en presencia y ausencia de 1M de NaCl y paja de trigo como única fuente de carbono, para identificar proteínas potencialmente involucradas en la degradación de lignocelulosa y en la respuesta a condiciones de hipersalinidad.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Crecimiento de *Aspergillus sydowii* en medio sólido.

El crecimiento de la cepa *Aspergillus sydowii* H1 se realizó durante 7 días en cajas Petri conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA) suplementado con 1 M de NaCl. El medio se preparó con base a las especificaciones del proveedor (Difco). De esta manera la cepa fue conservada para todos los experimentos.

Para los cultivos en fresco se cortó un disco de micelio de 8 mm de diámetro y se inoculó en cajas conteniendo medio fresco, las cuales fueron incubadas a 28°C durante siete días. La cepa se conservó en glicerol estéril al 25%. Para ello se colocó un disco de 8 mm de diámetro en 500 µL de glicerol (25%) y se conservó a -80 °C (Batista *et al.*, 2014).

### 7.2. Cultivo de *Aspergillus sydowii* H1 sobre paja de trigo en presencia y ausencia de 1 M NaCl.

El cultivo de *Aspergillus sydowii* H1 se generó en 0 y 1 M de NaCl. El medio en condiciones semi-sólidas contenía, 1 g de paja de trigo triturada y tamizada a un tamaño de partícula de 0.279 mm (Baltierra, 2016). 10 mL de medio mínimo (MM), su composición en mg/L es CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 7.8, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 18, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 500, ZnSO<sub>4</sub> 100, KCl 50, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1000, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2000, fue suplementado con 1M de NaCl, según fuera el caso (Batista *et al.*, 2014).

Los cultivos se inocularon utilizando cuatro discos de 8 mm de diámetro proveniente de cultivos de 7 días sobre medio agar papa dextrosa (PDA). Cada disco contenía aproximadamente 10<sup>7</sup> esporas. Los cultivos fueron incubados durante 7 días a 28°C en condiciones de oscuridad (Baltierra, 20016; Jiahong Wanga *et al.*, 2018). Se colectó a punto final un solo sobrenadante en cada condición. Para obtener el secretoma, en cada caja Petri fueron colocados 50 mL de buffer VERSENO. La composición del buffer en g/L es: NaCl 8, KCl 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24, y EDTA 0.146. Los cultivos fueron homogéneamente agitados a temperatura

ambiente durante 10 minutos. En seguida fueron centrifugados a 4,000 rpm, 4 °C, y 15 minutos, el sobrenadante enriquecido con el secretoma fue colectado.

Con el objetivo de reducir las impurezas de material lignocelulósico, así como para eliminar el debris celular, el sobrenadante con buffer, fue filtrado dos veces con membrana de polieter sulfona de 0.45  $\mu\text{m}$ , y 0.22  $\mu\text{m}$  (Encarnación *et al.*, 2005).

### 7.3. Obtención del secretoma.

Para obtener el secretoma del hongo, los sobrenadantes provenientes de los cultivos en paja de trigo fueron precipitados con solución de ácido tricloro acético (TCA) (12%) y desoxicolato de sodio (2%) ( Bhadauria *et al.*, 2007; Yonghyun *et al.*, 2007). El sobrenadante se centrifugó a 10,000 rpm, 20 minutos a 4 °C. La pastilla o pellet producido se disolvió en 500  $\mu\text{L}$  de TCA (25%), y la solución fue centrifugada en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se desechó el sobrenadante, el pellet fue nuevamente disuelto en solución acetona/Tris-HCl (50 mM, pH7.5 ), la cual fue centrifugada nuevamente en las condiciones mencionadas anteriormente. Finalmente la pastilla de proteínas fue lavada con acetona (80%) y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la pastilla, fue resuspendida en buffer de solubilización tributilfosfato (TBP), el cual se compone de urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 4M, y ditio tretitol (DTT) 60 mM. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente se colectó cuidadosamente el sobrenadante (Casado, 2004; Encarnación *et al.* 2005).La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

### 7.4. Cuantificación de proteína por SDS-PAGE y densitometría.

Se realizaron geles SDS-PAGE (12%) para la visualización de los perfiles proteicos obtenidos para cada muestra, y para la cuantificación se cargaron como estándar 5 y 15  $\mu\text{g}$  de proteína intracelular de la cepa *Rhizobium etli* (Encarnación *et al.*, 2005). De los secretomas obtenidos a partir de cultivos crecidos en presencia y ausencia de 1 M de NaCl, y siempre en presencia de paja de trigo como única fuente de

carbono, se cargaron entre 5 y 10  $\mu\text{L}$  de proteína en cada caso. La electroforesis tuvo una duración de 1 hora en condiciones de 30 mA. Como buffer de corrida fue usado Tris-glicina-SDS 1X. Luego, cada gel se fijó con solución de etanol:ácido fosfórico (30%:2%). En seguida los geles fueron teñidos durante 24 horas en solución Coomassie blue brillante G-250, y posteriormente los geles fueron lavados con agua destilada. Finalmente los geles fueron procesados digitalmente con un escáner GS-800. El análisis de densitometría se realizó mediante la utilización del programa QuantitiONE (Encarnación et al., 2005).

#### 7.5. Identificación de proteínas.

La identificación de proteínas se llevó a cabo mediante LC-MS/MS, asistido por marcas isobáricas iTRAQ Regent 8 Plex One Assay Kit. Para cada caso, 40  $\mu\text{g}$  de muestras se redujeron y después alquilaron durante una hora con DTT (100 mM) e iodoacetamida (200 mM), respectivamente. Luego, se realizó una precipitación de las proteínas utilizando nueve volúmenes de etanol puro previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos, 13,000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ . Después, el pellet obtenido se lavó con un volumen de etanol (90%) y fue centrifugado en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

La pastilla se dejó secar por inversión y fue resuspendida en 15  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía TEAB (100 mM), SDC (0.5%), SDS (0.05%). La muestra fue agitada vigorosamente usando un vortex por 5 minutos. Posteriormente las proteínas fueron digeridas con tripsina (Promega), usando 1  $\mu\text{g}$  de enzima por cada 50  $\mu\text{g}$  de proteína. La digestión se realizó durante 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Para el marcaje de las proteínas (paja + 1 M NaCl *versus* paja sin NaCl), se utilizó el Kit iTRAQ 8 Plex (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121), para las dos muestras de este estudio se aplicaron las marcas 115 y 116 respectivamente (Protocolo iTRAQ<sup>TM</sup>, 2004). En cada una se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de marca y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se detuvo con la adición de 130  $\mu\text{L}$  de agua MiliQ. Una vez marcada cada una de las réplicas de ambos secretomas (paja + 1 M NaCl *versus* paja sin NaCl) se obtuvo un pool de todas las muestras marcadas y se secó usando un SpeedVac sc 100 a un volumen final de 30 mL

(Protocolo iTRAQ™, 2004; Ankney *et al.*, 2018 ). Se lavó con solución acetato de etilo/ácido trifluoroacéticos (TFA), y se realizó un segundo proceso de evaporación bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente para la obtención de espectros e identidad de proteínas, la muestra se inyectó en un equipo LC-MS/MS y los datos fueron procesados mediante MaxQuant (versión 1.6.5). El análisis de expresión diferencial se realizó usando el software PERSEUS, Finalmente los RAW-DATA obtenidos , fueron ingresados en la base de datos dbCAN, para clasificar las proteínas dependientes de carbohidratos.

## 8.Resultados y Discusión

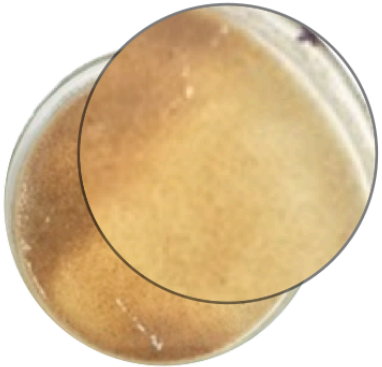

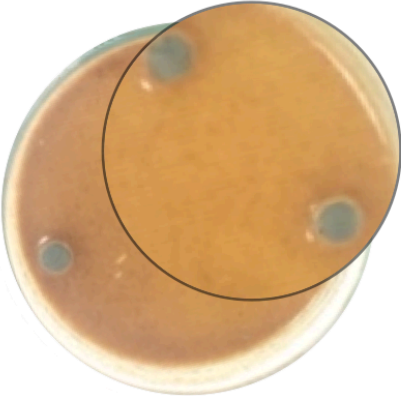
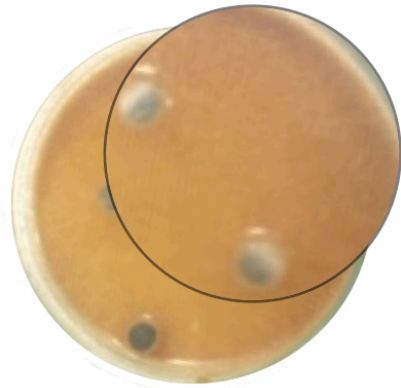
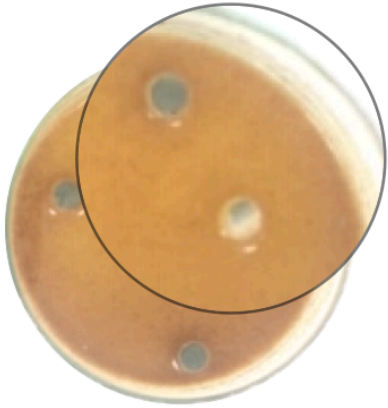
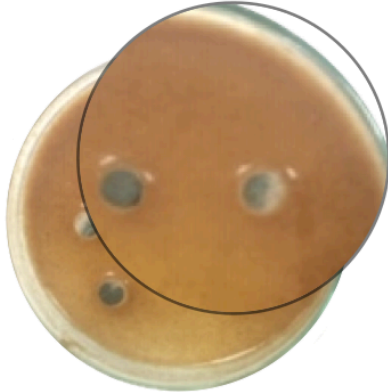
8.1. Crecimiento de *Aspergillus sydowii* H1 en presencia y ausencia de 1M de NaCl y paja de trigo como única fuente de carbono.

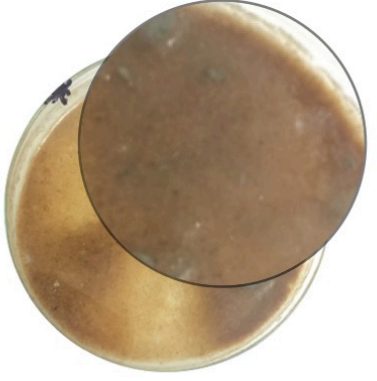
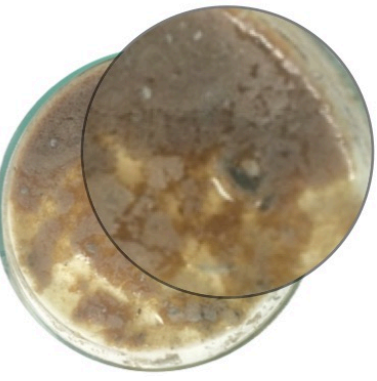
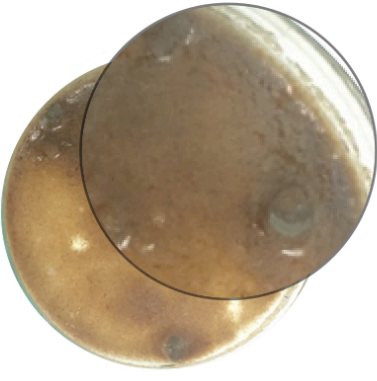


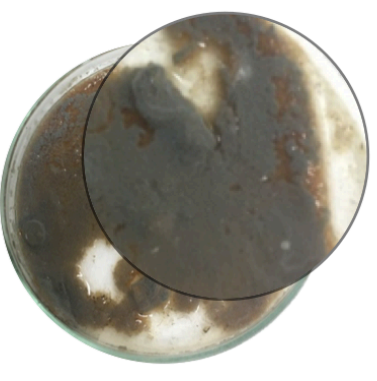
La molienda fina permitió obtener partículas muy finas que probablemente son más susceptible a la degradación ya que podemos exponer una mayor cantidad de áreas de contacto para las hifas y enzimas lignocelulolíticas. Así mismos se pretendía tener una biomasa más fina por lo cual el tamizado ayudó en la selección de estas partículas (Baltierra et al., 2016). El cultivo piloto realizados arrojaron resultados positivos, ya que la cepa H1 mostró crecimiento y colonización del sustrato.

Con los datos obtenidos mediante el crecimiento piloto, la cepa fue cultivada durante 7 días, y cada uno se documentó fotográficamente.

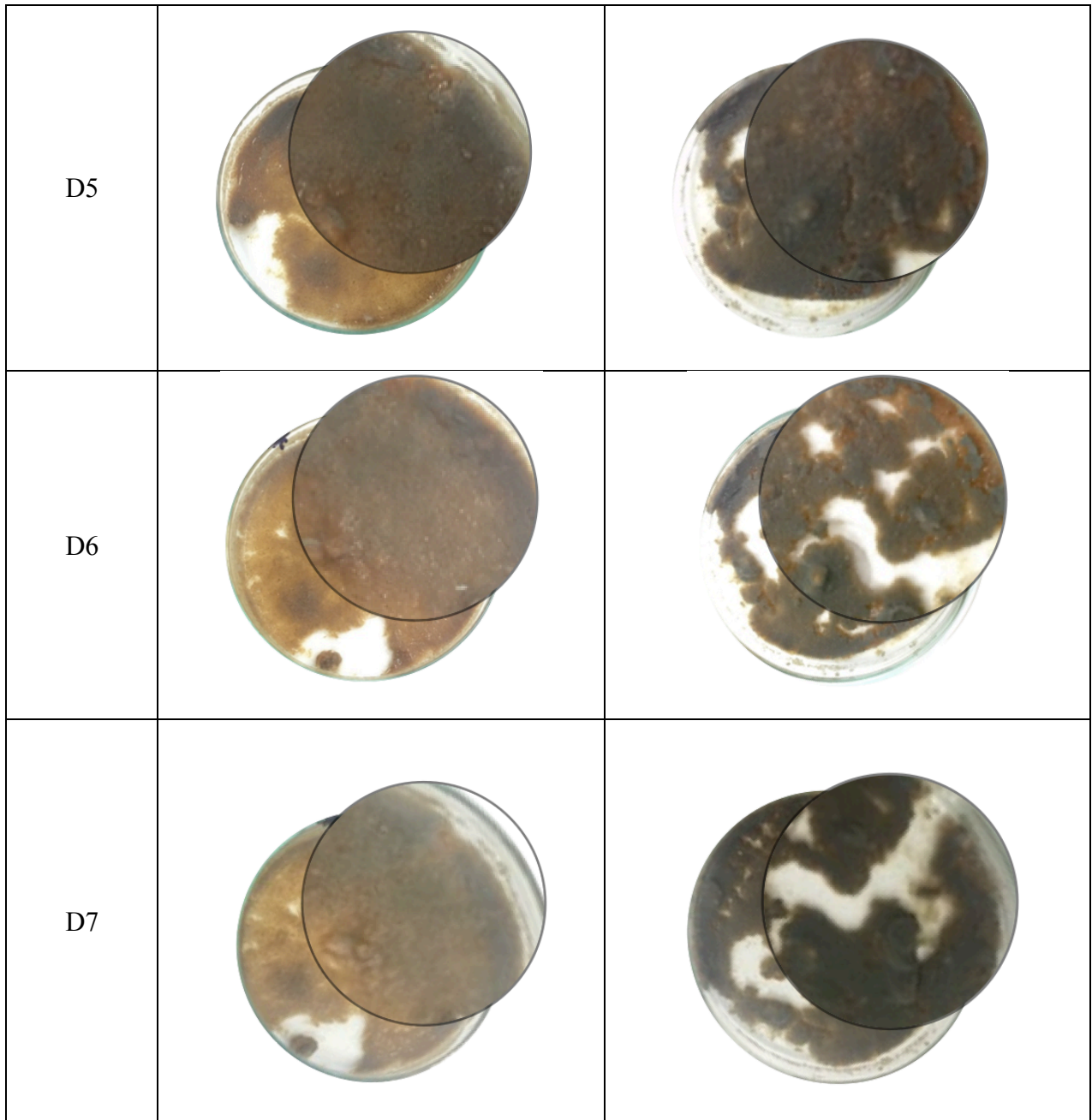
En la tabla 1 se muestran las imágenes del control abiótico y el crecimiento sobre paja de trigo en presencia y ausencia de NaCl. Los puntos más relevantes para cada tratamiento fueron el día 2 donde se observaron los primeros parches de crecimiento, estas colonias de micelio comenzaron a colonizar el sustrato y se reflejaron un aumento para en el día 4. Visualmente el día 5 fue un punto de crecimiento donde el hongo logró cubrir totalmente la paja de trigo . Finalmente para el día 7 no se observó un cambio significativo en el crecimiento y visualmente se mantuvo muy similar al día 5.

Los cultivos en presencia de NaCl reflejaron una menor abundancia de micelio aéreo en comparación al tratamiento en ausencia de sales. La diferencia en el crecimiento puede estar asociada en este caso, a la presencia del NaCl, ya que este agente puede desencadenar estragos como, pérdida de agua, intoxicación intracelular e inhibición enzimática. Por lo anterior la cepa debe generar un crecimiento muy bien regulado, donde cada una de las células del micelio sea capaz de aclimatarse a las condiciones abióticas y al mismo tiempo degradar el sustrato vegetal (Lequart et al., 200).

Día (D)	Cultivo Paja+ 1M de NaCl	Cultivo Paja sin NaCl
Control		
D0		
D1		

D2		
D3		
D4		





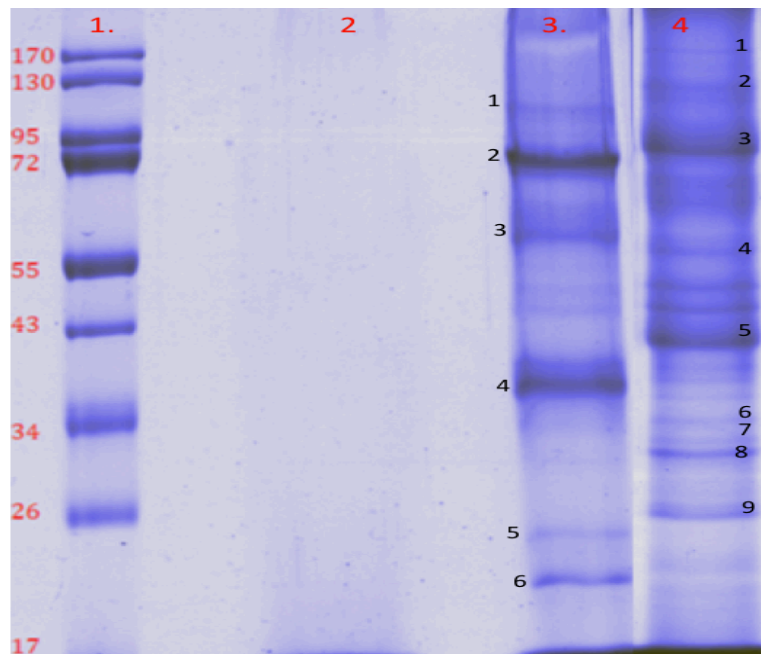
**Tabla 1.** Crecimientos de *Aspergillus sydowii* H1 en presencia y ausencia de NaCl, y paja de trigo como única fuente de carbono. La figura contiene siete días de monitoreo y una casilla donde se ha colocado un control abiótico. El acercamiento en caja Petri permite observar la colonización de la cepa sobre el sustrato.

## 8.2. Análisis del secretoma mediante electroforesis SDS-PAGE

El extracto de proteína de cada cultivo piloto, fue analizado por electroforesis para corroborar la presencia de bandas en los cultivos celulares de H1 (Figura 7). En este gel de poliacrilamida se colocaron: un control abiótico (carril 2) las muestras en presencia de paja de trigo y NaCl (carril 3), y paja de trigo (4).

La migración de la muestra abiótica (control sin la cepa H1) permitió demostrar que las proteínas resueltas en los carriles 3 y 4, son secretadas por la cepa H1. Y de lo contrario no son producto de una contaminación por degradación de la paja de trigo.

Por su lado la migración de las muestras contenidas en el carril 3 y 4 mostraron un tráfico de proteínas bastante claro y definido, donde llegamos a distinguir 6 bandas exclusivas para el tratamiento en ausencia de NaCl. Y 9 en presencia de NaCl (Figura 7). Así mismo podemos observar que la técnica de extracción permitió reducir los materiales como residuos vegetales, debris celular y sales, entre otros, que pudieran interferir en la migración de cada una de las muestras.

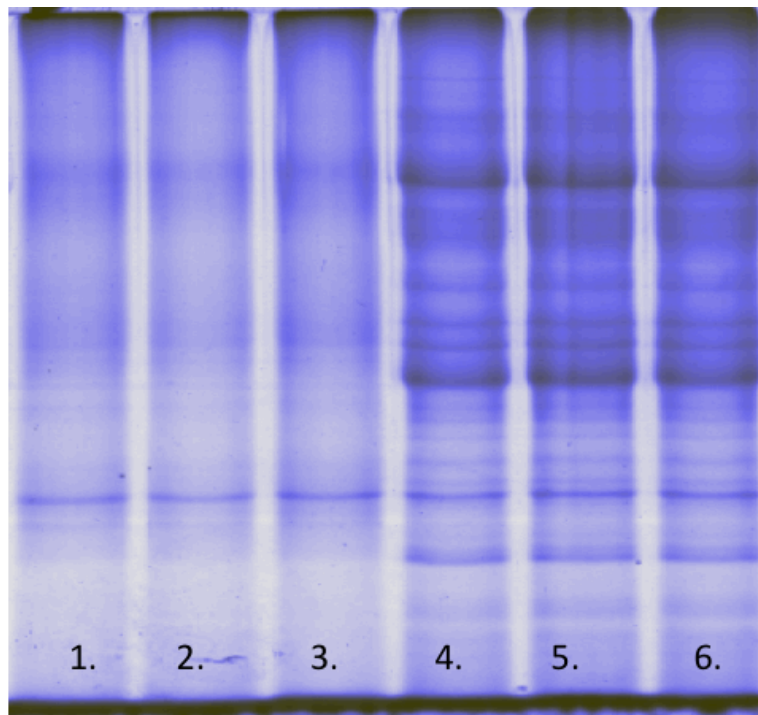


**Figura 7.** Electroforesis SDS-PAGE de los extractos obtenidos del cultivo en presencia y ausencia de NaCl. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2, la muestra del control abiótico. Carril 3 secretoma en ausencia de NaCl. Carril 4 secretoma en presencia de NaCl.

La electroforesis de los extractos provenientes del cultivo piloto reflejaron la presencia de proteínas extracelulares. Por ello y con base en estos resultado, los sobrenadantes de los cultivos finales fueron procesados por el mismo método de extracción.

La figura 8 representa la electroforesis de las réplicas de cada tratamiento de cultivo de H1. En seguida se notó que en los carriles 4,5 y 6 propios al tratamiento paja de trigo y NaCl, visualmente presentan una mayor cantidad de proteínas en comparación al tratamiento en paja de trigo. Esta abundancia de bandas en el secretoma NaCl pude sugerir la presencia de proteínas que degradan la biomasa vegetal y proteínas que participan en la respuesta al estrés generado por la presencia de sales. Las muestras en electroforesis también manifestaban una clara presencia y ausencia de proteínas así como la sobreexpresión de otras. En el caso de la sobreexpresión podrían estar involucradas en la biodegradación de lignocelulosa para obtención de una fuente de carbono, con respecto a la presencia y respuesta a la salinidad pueden estar sobre expresadas aquellas enzimas encargadas de la remodelación de la pared, síntesis de ergosterol y síntesis de solutos compatibles.

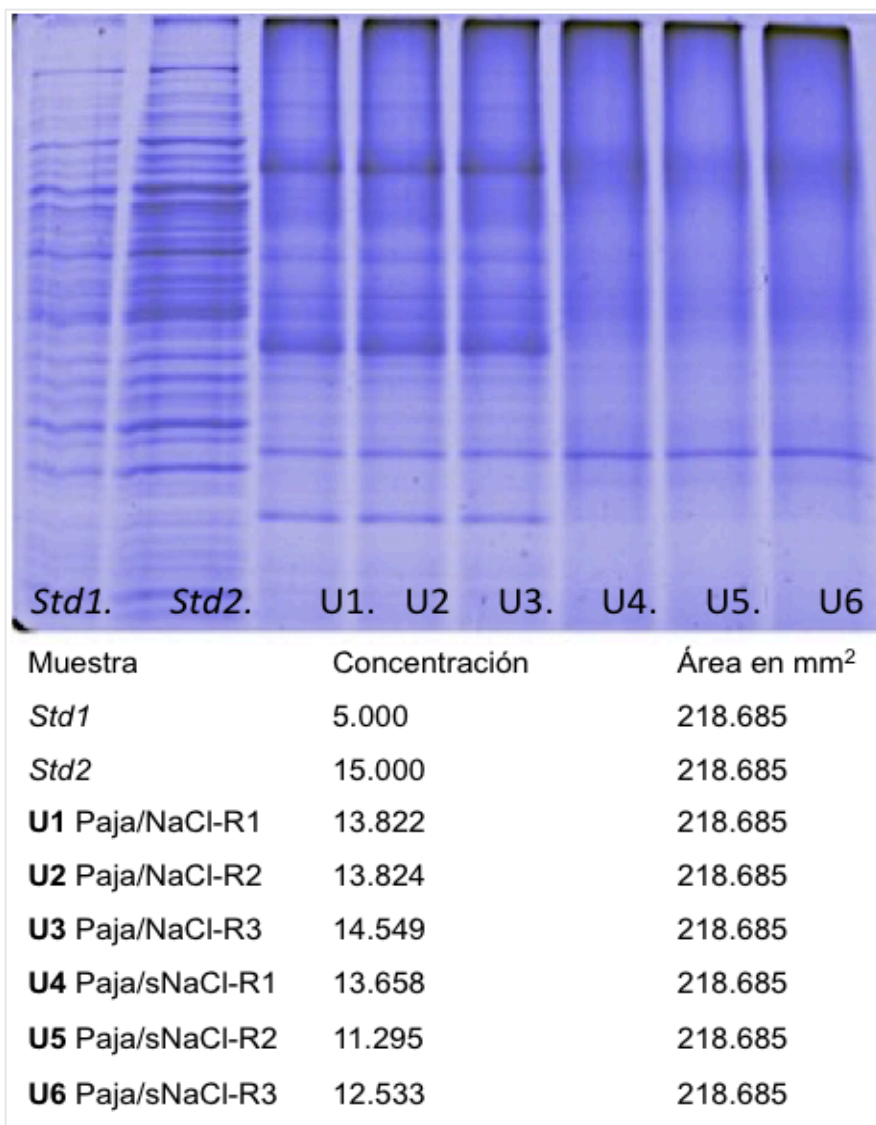
Hasta este punto no se había realizado determinación de concentración proteica, ya que buscábamos corroborar la presencia de proteínas en el secretoma de cada tratamiento y réplica de cultivo.



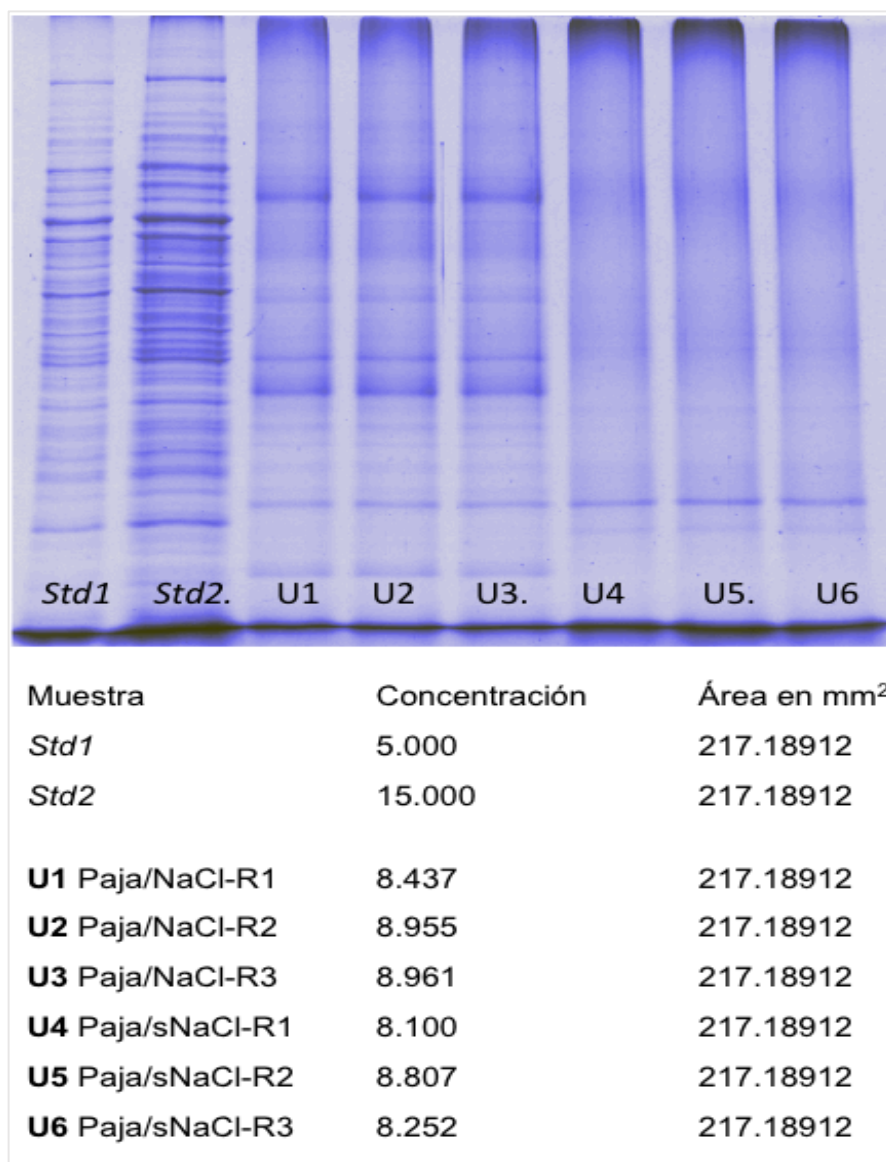
**Figura 8.** Electroforesis SDS-PSGE. Muestra las réplicas de cada tratamiento de cultivo. Carriles 1, 2, 3, secretoma en ausencia de NaCl. Los carriles 4, 5, 6, secretoma en presencia de NaCl.

El gel de la figura 9 muestra la primer cuantificación de proteína por densitometría, donde se utilizaron como estándar de referencia (*Std 1: Std 2*) 5:15  $\mu\text{g}$  de proteína de *Rhizobium etli* respectivamente. La concentración de proteína en presencia de NaCl oscilaba los 13 y 14  $\mu\text{g}$  y las muestras en ausencia de sales oscilaban los 11 y 13  $\mu\text{g}$  de proteína.

En este caso se puede decir que la variación en la concentración puede deberse una expresión exclusiva de proteínas que no están presentes en la muestra sin NaCl, y que pueden intervenir en procesos ajenos a la degradación de lignocelulosa. Finalmente y con base a los datos obtenidos en el gel anterior, se realizaron los cálculos de concentración y las muestras de proteínas fueron estandarizadas a una concentración de 8  $\mu\text{g}$  para cada réplica.



**Figura 9.** Electroforesis SDS-PAGE. Primer gel que muestra la concentración de proteína contenida en cada una de la muestras del secretoma de la cepa. *Std1* y *Std2* representan los estándares de proteína de *Rhizobium etli*. Carril U1,2,3 réplicas del tratamiento en presencia de NaCl. Carriles U4,5,6 representa las muestras en ausencia de NaCl. Estandarización por densitometría.

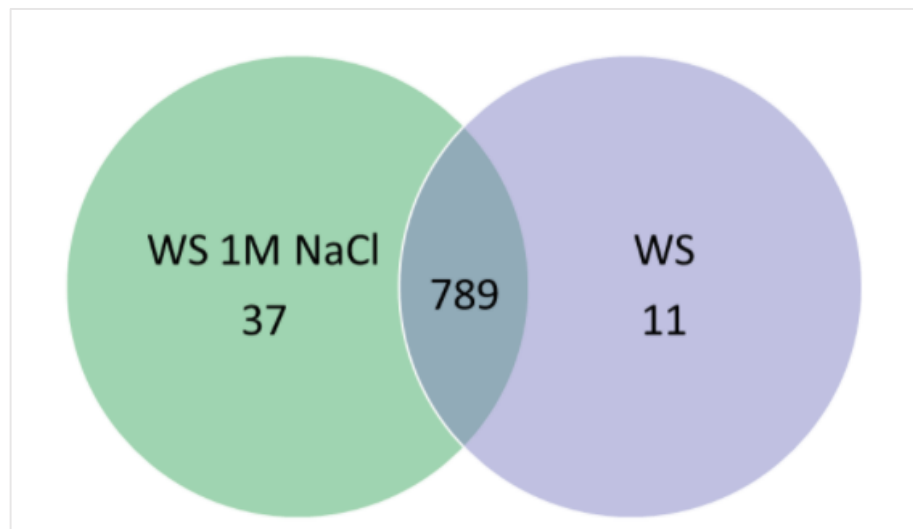


**Figura 10.** Electroforesis SDS-PAGE. Representa la estandarización final por densitometría cada carril de muestra presenta una concentración de 8 µg de proteína. De izquierda a derecha. Carriles *Std1* y *Std2*, son los estándares a 5 y 15 µg de proteína de *Rhizobium etli*. Carriles U1, 2, 3, réplicas del tratamiento en presencia de NaCl. Carriles U4, 5, 6, réplicas del tratamiento en ausencia de NaCl.

### 8.3. Cuantificación y análisis de expresión diferencial del secretoma de *A. sydowii* H1.

Las condiciones de cultivo permitieron la obtención de ambos secretomas para el análisis de proteínas para la cepa H1. Como se hizo mención, en la sección anterior se cuantificaron enzimas secretadas e intracelulares que forman parte de un reservorio importante de diversas enzimas especializadas en mantener la integridad de la cepa H1 con y sin NaCl, así como la degradación de la materia vegetal suministrada.

En particular, el secretoma de la cepa H1 para este trabajo se caracterizó por la cuantificación de 837 proteínas totales. De las cuales, 37 se presentaron como proteínas expresadas únicamente en presencia de NaCl, 11 proteínas en el secretoma en ausencia de NaCl, y 789 proteínas comunes (Figura 11).



**Figura 11.** Diagrama de Venn, cuantificación de proteínas en el secretoma de *A. sydowii* H1; el círculo en color verde representa el tratamiento en presencia de paja de trigo (Wheat Straw- WS 1M NaCl) y 1 M de NaCl, donde se obtuvieron 37 proteínas exclusivas. El círculo morado representa el cultivo en paja de trigo (WS), donde se presentaron 11 proteínas exclusivas. 789 proteínas comunes en el centro.

En el secretoma en presencia de NaCl fueron cuantificadas 37 proteínas exclusivas (color verde), ya que estaban presentes en un tratamiento y ausentes en otro (Figura 12). Cada uno de los niveles de expresión presentados por estas proteínas fueron normalizados y graficados mediante el programa de proteómica Perseus 1.6.14.0.

En este grupo no se cuantificaron proteínas involucradas en la despolimerización de biomasa vegetal. Por otra parte el 51.3 % del total de enzimas exclusivas para este tratamiento, no mostraron una anotación específica. Pero la anotación GO (ontología genética), permitió predecir algunas proteínas como, ATP sintasa mitocondrial, 3-oxiácido COA transferasa y carboxilasa.

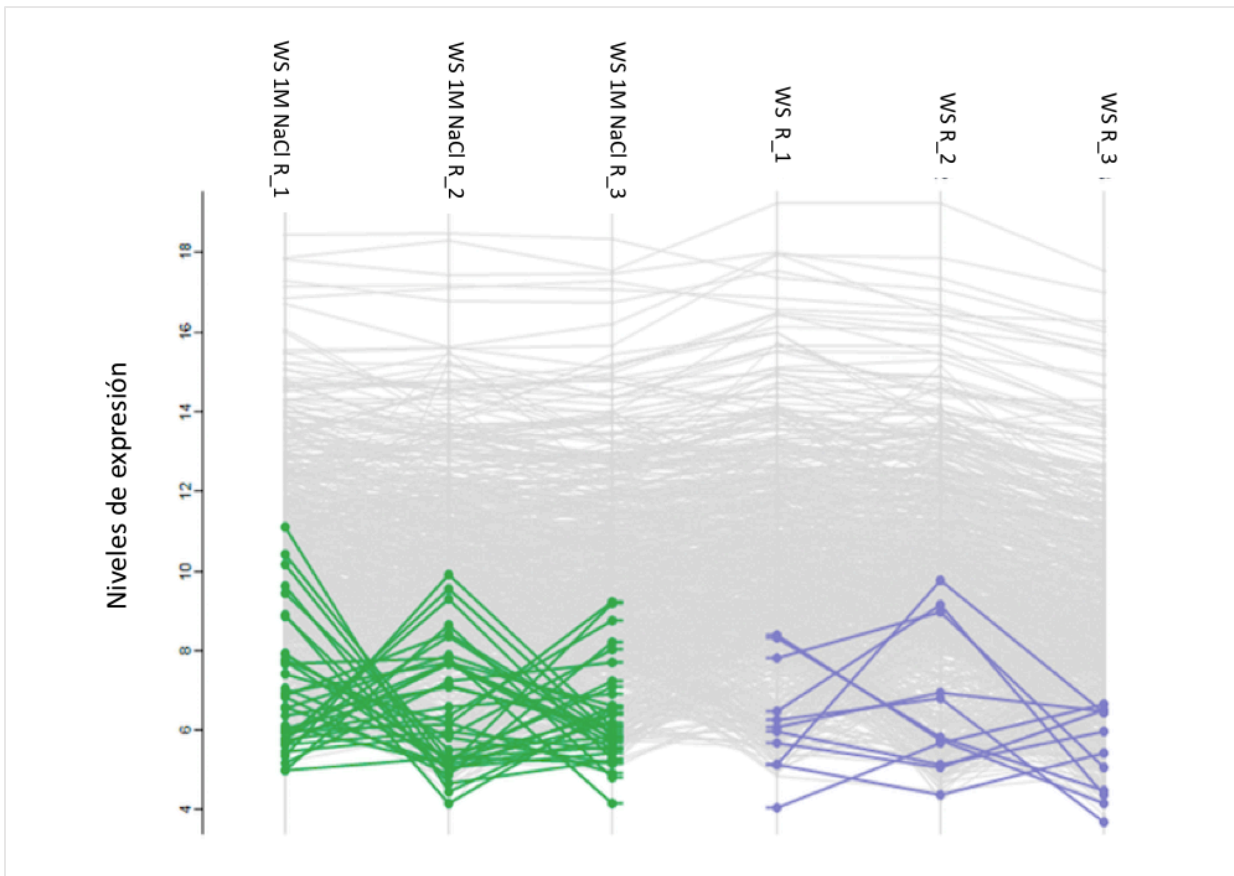
Por ejemplo la ATP sintasa mitocondrial se involucra en la síntesis e hidrólisis de adenosin trifosfato (ATP) (Sánchez et al., 2017). También está relacionada con el transporte mitocondrial interno de sodio ( $\text{Na}^+$ ) que funciona como un mensajero en la regulación del proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial y el control en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un estado hipóxico agudo celular (Henansanz et al., 2020). Se ha descrito otros tipos de ATPasas como la de membrana y vacuola que principalmente se encargan de mantener la homeostasis celular mediante la expulsión de sodio (Folch et al., 2004; Domínguez et al., 2005). La expresión diferencial de la ATP sintasa mitocondrial en el secretoma de H1 representa un proceso importante, ya que se encuentra en un sistema hipersalino para el cual es necesaria en la regulación de la salida y entrada del  $\text{Na}^+$  debido a que este puede generar inhibición enzimática y desestabilidad celular.

Otras enzimas anotadas para este grupo fueron las 3-oxiácido COA transferasas que se asocian con el metabolismo de aminoácidos como valina, leucina e isoleucinas, y degradación de cuerpos cetónicos (Müller et al., 2008). También se hicieron presentes algunas enzimas carboxil liasas, involucradas en remover o agregar grupos carboxilo, este fenómeno ocurrirá dependiendo la reacción y el proceso metabólico (Cárdenas, 2014). Y generalmente podemos observarlas interviniendo en proceso como el ciclo del ácido cítrico, donde se



encargan de la descaboxilación del piruvato para la obtención de energía celular (Cárdenas, 2104).

El resto de las proteínas exclusivas que si mostraron una anotación, representaron el 50 % del grupo total. Aquí se pudieron observar secuencias para enzimas como N- acetil transferasa y  $\alpha$ -aminodipato reductasa, acetolactato sintasa, prolina 5-carboxilato reductasa, que participan en la biosíntesis de aminoácidos como arginina, L-lisina, isoleucina y prolina respectivamente, también fueron halladas lipasas que participan en la degradación de triacilgliceroles, glicerol y ácidos grasos libres a partir de la hidrólisis de los grupos ester (Gonzáles et al., 2010).



**Figura 12.** Niveles de expresión de las proteínas exclusivas presentes en el tratamiento paja de trigo 1M de NaCl (color verde), y paja de trigo (color morado).

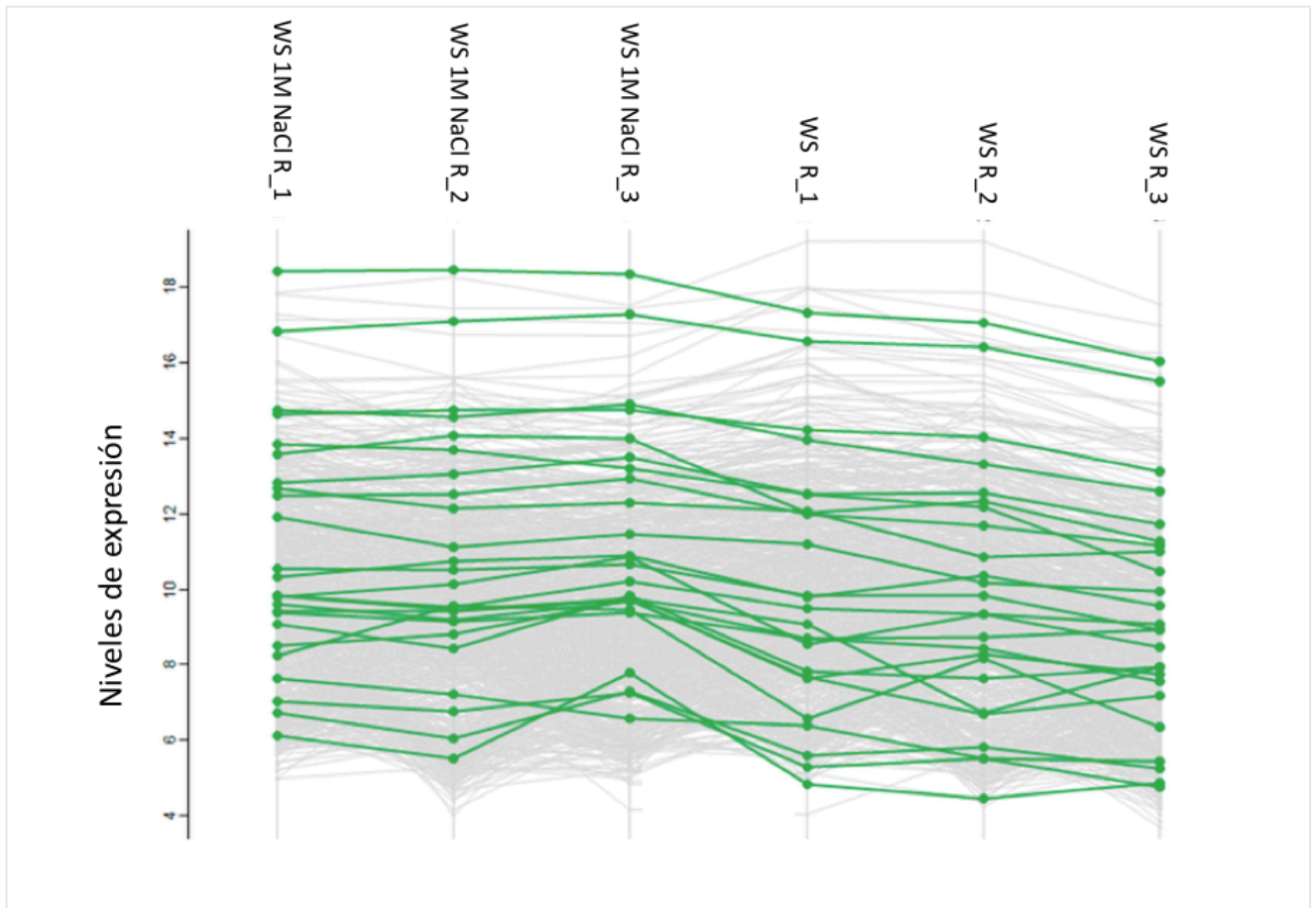
Para el secretoma en ausencia de NaCl (color morado), se lograron cuantificar 11 proteínas exclusivas (Figura 12). Del total de este grupo, el 49 % se anotaron como hipotéticas. El resto de secuencias anotaron con diferentes enzimas como ATPasa de membrana involucrada en la homeostasis a través del transporte de sodio desde la sección intracelular a la parte extracelular (Domínguez et al., 2005). También se hallaron cinasas de unión a ATP que se involucran la transferencia de un grupo fosfato para activar o desactivar otros sustratos, se saben también que son enzimas involucradas en la respuesta a estímulos químicos mediante la activación y desactivación de factores de transcripción (Flores et al., 2005).

También se anotaron proteínas involucradas en el transporte de amonio, y una 3-isopropilmalato deshidrogenasa que participa en la biosíntesis de isoleucina. Cabe mencionar que, cada una de estas proteínas no forman parte del secretoma ya que en su mayoría pertenecen la parte intracelular y regiones de la membrana. Por lo tanto creemos que estas enzimas se hacen presentes en el secretoma debido a una lisis celular que ocurrió en los cultivos de la cepa H1 cuando está en cultivo con paja de trigo 1M de NaCl y paja de trigo. Por otra parte se necesitan más análisis en torno a cada una de las secuencias halladas como exclusivas en ambos tratamientos de cultivo. Estos análisis permitirán poder discernir si realmente están siendo empleadas por H1 para activar procesos involucrados en la respuesta al estrés por salinidad.

Se realizaron algunos análisis para observar los cambios en los niveles de expresión de las 789 proteínas comunes entre tratamientos, de los cuales se observó que, en presencia de paja de trigo fueron cuantificadas 25 proteínas con mayores niveles de expresión cuando se encuentra en presencia de NaCl, estas proteínas fueron obtenidas bajo el análisis estadístico *t-student* a un valor de *p-value* del 99% (Figura 13).

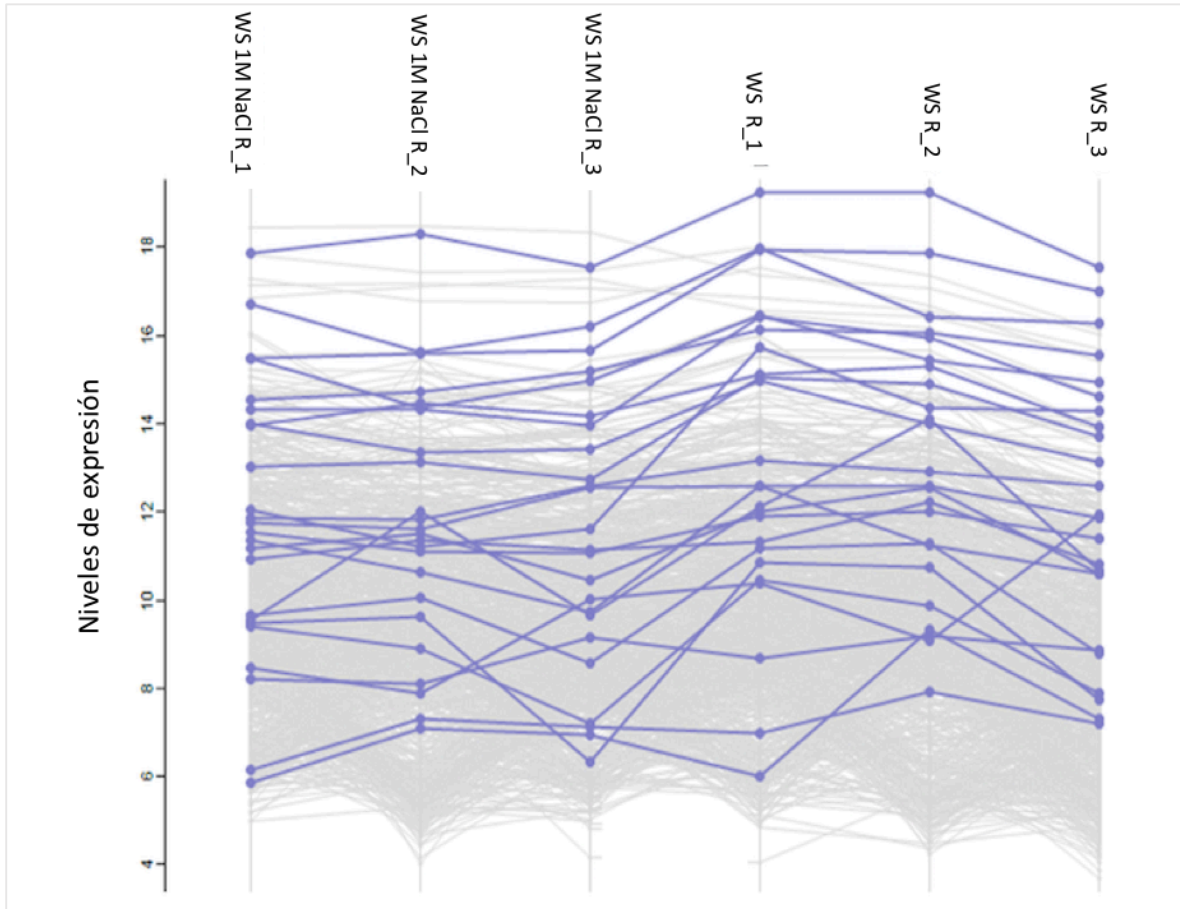
De este grupo se pudieron observar algunas enzimas como, 1,3- $\beta$ -xilanasas,  $\beta$ -glucosidasa y glucanasas que participan en la degradación de celulosa y hemicelulosa respectivamente. También fue anotada una  $\beta$ -glucanosil transferasa, que participa en la elongación de los  $\beta$ -glucanos, como proceso de remodelación de la pared celular en respuesta a las condiciones hipersalinas, permitiendo que la célula tenga una mayor regulación en la entrada y salida de iones y agua principalmente.

También fue posible detectar enzimas como citocromo c, involucrada en el transporte de electrones en el proceso de respiración y apoptosis celular (Colman et al., 2015; Macedo, 2012). Particularmente en este tratamiento se hizo muy interesante la presencia de una D-xilosa reductasa, esta enzima es muy importante en este sistema ya que va a participar en el metabolismo de xilosa proveniente de la degradación del xilanos (Gutiérrez et al 2013). Por otra parte la sobre expresión de esta enzima ayuda a la célula a evitar la acumulación intracelular de este azúcar, ya que las concentraciones por arriba de 70 mM pueden generar la represión de la expresión de enzimas xilanolíticas. Por lo anterior la cepa H1 aprovecha la sobre expresión de la D-xilosa reductasa para obtener energía a partir de la degradación de xilosa y al mismo tiempo mantener activo el sistema de expresión (De Vries et al 1999 Gutiérrez et al 2013).



**Figura 13.** Representación de los niveles de expresión, de las 25 proteínas que mostraron los mayores niveles de expresión en paja de trigo 1M de NaCl en la cepa de *A. Sydowii* H1. Paja de trigo 1M NaCl (WS 1M NaCl), paja de trigo (WS). Cada puntos representa las réplicas de muestra.

Para la cuantificación en ausencia de NaCl, se obtuvieron 25 proteínas con los niveles de expresión más altos, los datos también fueron procesados y las proteínas fueron seleccionadas como en el tratamiento paja de trigo 1M de NaCl (Figura 14). En el caso de este secretoma, se observaron algunas enzimas como, glucanasas, celulasas y  $\beta$ -1,4 endoxilanasas. Así mismos una cutinasa,  $\alpha$ -amilasa y quitinasas. El 28% del total de estas proteínas no presentó una anotación específica. Y el 40 % son proteína de dominio intracelulares que son producto de la lisis celular ocurrida durante los cultivos en ausencia de NaCl.

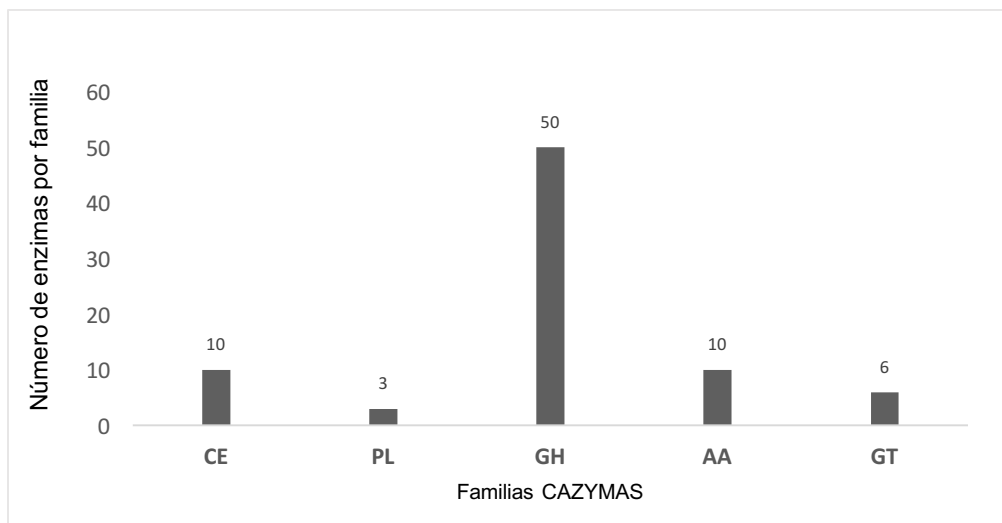


**Figura 14.** Representación de los niveles de expresión, de las 25 proteínas que mostraron los mayores niveles de expresión en paja de trigo en la cepa de *A. sydowii* H1. Paja de trigo 1M NaCl (WS 1M NaCl), paja de trigo (WS). Cada puntos representa las replicas de muestra.

#### 8.4. Anotación de Enzimas Activas de Carbohidratos (CAZY) del secretoma de *Aspergillus sydowii* H1 en presencia y ausencia de NaCl y paja de trigo.

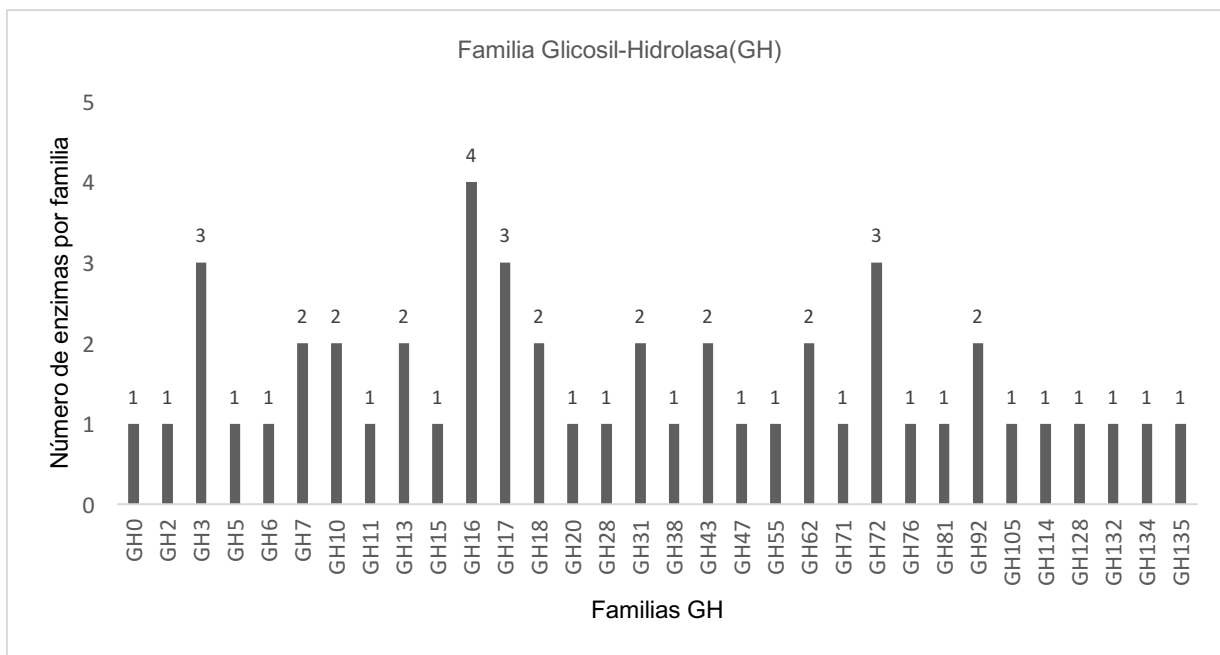
El secretoma de *A. sydowii* H1 fue anotado considerando la base de datos CAZY (<http://www.cazy.org>), obteniendo un total de 79 enzimas distribuidas en 4 superfamilias: i) glicosil hidrolasas (GH), ii) carbohidrato esterasas (CE), iii) polisacárido liasas (PL), iv) actividad accesoria (AA) y glicosil transferasas (GT) (Figura 15).

Proteínas anotadas en todas estas familias fueron expresadas en ambas condiciones de crecimiento: paja de trigo + 1 M de NaCl y paja de trigo sin NaCl. Las proteínas anotadas como CAZYmes representaron el 9.5 % del total de las proteínas cuantificadas en el secretoma de *A. Sydowii* H1.



**Figura 15.** Anotación del secretoma de *A.sydowii* H1 cultivado sobre paja de trigo en presencia y ausencia de NaCl, para la identificación de proteínas CAZY.

La expresión de GH en las condiciones de estudio, fue más relevante en comparación al resto de proteínas CAZY, representando el 63.2% del secretoma total anotado como CAZY. Fueron identificadas 50 GHs anotadas en 32 familias diferentes, de las cuales GH 16 destaca por la presencia de 4 secuencias anotadas como glucanasas (Figura 16 y tabla 2).



**Figura 16.** Distribución de las diferentes familias GHs obtenida en el secretoma CAZY de *A. sydowii* H1. Los números sobre las barras representan la cantidad de secuencias identificadas en cada familia.

Las familias GH 3, 17 Y 72 presentaron tres proteínas anotadas en cada caso (Figura 16 y tabla 2). La familia GH 3 se integra por enzimas  $\beta$ -glucosidasas y  $\beta$ -xilosidasas; la familia GH 17 agrupa enzimas  $\beta$ -1,3- endo glucansas las cuales exhiben actividad para la degradación de beta glucanos propios de la pared celular fúngica (Vargas et al., 2017). Mientras que la familia GH 72 acoge secuencias clasificadas como  $\beta$ -1,3-glucanosil transferasas que están involucradas en la elongación de  $\beta$ -1,3-glucanos para la remodelación de la pared celular fúngica (Moro, 2018; UNiprot).

La cepa de *A. sydowii* H1 también logró expresar otras GHs pertenecientes a las familias GH 7, y GH 31. Estas familias agruparon 2 secuencias de proteínas, las cuales fueron identificadas como  $\beta$ -1,4 endoglucanasas que se relacionan con la hidrólisis de celulosa rompiendo internamente los enlaces glucosídicos de las cadenas, liberando progresivamente oligosacaridos (Gutiérrez et al., 2013). Por otra

parte, en la familia GH 10 también fueron identificadas 2 proteínas del secretoma. Esta familia de GH agrupan principalmente  $\beta$ -xilanasas, las cuales participan en la hidrólisis de la hemicelulosa mediante la despolimerización de las cadenas de xilano (Kowalczyk et al., 2015).

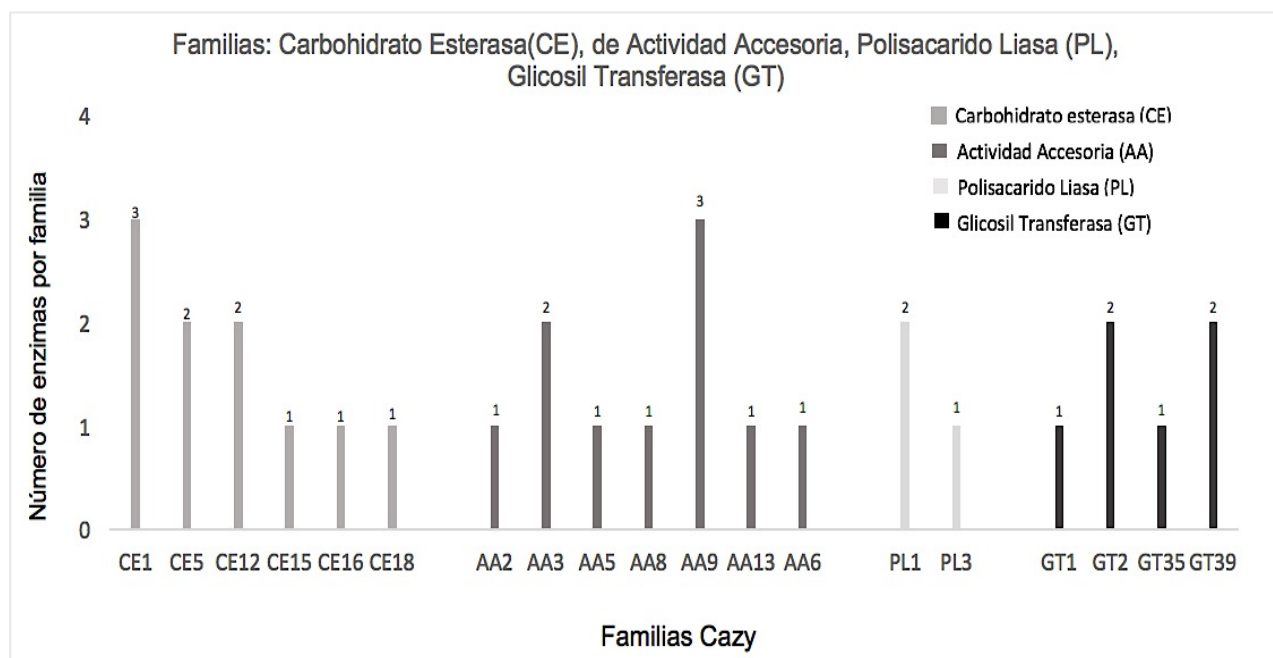
Curiosamente se encontraron 2 secuencias proteicas en la familia GH 18 la cual agrupa proteínas que no están involucradas en la degradación de polisacáridos de pared vegetal. Las enzimas de esta familia fueron anotadas como quitinasas, y pueden estar relacionadas con la degradación de polímeros de quitina presentes en las paredes celulares de hongos y el exoesqueleto de invertebrados como los crustáceos (Mármol et al., 2011; Martínez et al., 2019). Para el caso de la familia GH 62 se anotaron dos secuencias. Esta familia agrupa enzimas con actividad catalítica sobre hemicelulosa como las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, que hidrolizan las D-arabinofuranosa presente en los heteropolisacáridos como xilano y xiloglucano (Umaña, 2016). Finalmente, también se anotaron 2 secuencias del secretoma en la familia GH 13, la cual incluye enzimas activas sobre almidón, como  $\alpha$ -amilasas que participan en la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 de las cadenas de amilosa (Figura 16 y tabla 2) (Anselmi, 2017).

Nuestros resultados concuerdan con los reportados para el análisis de expresión del secretoma de *Aspergillus fumigatus* AF293 durante la degradación de bagazo de caña de azúcar (Fagundes et al., 2018). Estos autores identificaron 78 proteínas CAZY, donde la mayoría correspondió a GHs, que fueron agrupadas en 48 familias diferentes. Nótese que este grupo también representó la expresión mayoritaria para el secretoma de *A. Fumigatus* AF293. Sin embargo el secretoma de *A. sydowii* H1 mostró una mayor diversidad de familias GHs representadas.

Para la degradación de la biomasa vegetal se requiere de un grupo variado de enzimas que usualmente funcionan de manera sinérgica durante una hidrólisis efectiva (Esser et al., 2002). En el secretoma de la cepa H1 fueron también anotadas CAZYmes pertenecientes a otras superfamilias de CEs y AAs. Estas superfamilias fueron cuantificadas como el segundo grupo de mayor abundancia después de las GHs, ya que presentaron un total de 10 proteínas respectivamente, representando



en ambos casos el 12.6 % del total del secretoma de enzimas CAZY de la cepa H1 (Figura 17).



**Figura 17.** Distribución de las familias CEs, AAs, PLs, GTs anotadas en el secretoma CAZY de *A. sydowii* H1 cultivado en presencia y ausencia de NaCl y paja de trigo como única fuente de carbono.

Particularmente las 10 proteínas obtenidas en la superfamilia CE, fueron clasificadas en 6 familias diferentes, de las cuales, CE 1 se identificó en mayor abundancia, siendo tres secuencias anotadas como feruloil esterasas (2) y acetil xilano esterasa (1).

Particularmente las acetil xilano esterasas hidrolizan el enlace éster que mantiene unido el grupo acetilo a las moléculas de xilosa de la cadena principal del heteropolímero (Esser et al., 2002). De esta manera se reduce la complejidad estructural de xilanos contribuyendo en la degradación integral de hemicelulosa, así mismos CE1, también se han descrito para la degradación de otros sustratos como bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo y bagazo de maíz entre otros (Vega et al., 1998). Por otra parte se han reportado acetil xilano esterasas producidas por

cepas de hongos como *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Schizophyllum commune* y *Aspergillus fumigatus* ( Vega et al., 1998; Fagundes et al., 2018).

Las enzimas feruloil esterases del secretoma de la cepa H1, fueron anotadas en la familia CE 1, la cual agrupa enzimas de degradación accesoria con actividad desramificante sobre el xilano. Estas proteínas se encargan de hidrolizar el enlace éster que une la molécula de xilosa y el grupo feruloil. La enzima hidroliza entonces los enlaces mencionados anteriormente y libera ácido ferúlico de la cadena principal de xilano (Tafolla., 2013).

La superfamilia de CE son de gran importancia para la implementación de tratamientos biológicos como herramientas para la disociación de grupos como acetilo y ácido ferúlico, los cuales no pueden ser hidrolizados por enzimas endo y exo xilanasas, facilitando así la degradación de la biomasa vegetal (Gutiérrez et al., 2013). También son una familia de enzimas activas sobre carbohidratos con creciente interés industrial, farmacéutico, alimenticio y textil entre otros (Castro et al., 2010).

Como segunda familia más representativa de carbohidrato esterasa destacó la familia CE 5, con 2 secuencias anotadas como cutinasas. Cabe destacar que esta familia no se reportó, por ejemplo, en los análisis del secretoma de *A. fumigatus* y *A. niger* N402 (Pagotto et al., 2015; Fagundes et al., 2018).

La expresión de enzimas de la familia CE 5 representan un proceso importante en la degradación de biomasa vegetal. En específico las cutinasas se encargan de hidrolizar la cutícula, un polímero de la pared vegetal compuesto por cutina y ceras cuticulares (Tafolla et al., 2013). La cutina está constituida por cadenas de ácidos grasos de 16 carbonos como, ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico, 9,16-dihidroxihexadecanoico, también se asocia una pequeña fracción de ácidos grasos de 18 carbonos como ácido 9, 10-epoxi-18-hidroxi-octadecanoico y 9,10,18-trihidroxi-octadecanoico unidos por enlaces de tipo éster. Y las ceras cuticulares se componen por cadenas de 20 a 40 carbonos, donde se presentan grupos como N-

alcanos, ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos grasos de cadena larga en el caso de las ceras epicuticulares, y de cadena corta en intracuticulares (Tafolla et al., 2013). La cutícula es una capa importante en la pared vegetal ya que está involucrada en algunos procesos como, la defensa contra agentes patógenos, reducción en la pérdida de agua por evaporación, así como transporte y comunicación dentro y fuera de la célula, (Castro et al., 2010).

La acción sinérgica de estas enzimas de la familia CE 5, identificadas en el secretoma de la cepa H1, es precisamente participar en la remoción de la cutícula. Esta contribución puede facilitar el acceso de enzimas como, xilanasas y celulasas que podrán interactuar e hidrolizar los polímeros de celulosa y hemicelulosa (Castro et al., 2010). También son enzimas con gran potencial para aplicaciones biotecnológicas, las cuales han servido como agentes accesorios en la degradación de biomasa vegetal, en el área industrial y ambiental, principalmente en la biodegradación de plásticos, pesticidas y otros agentes recalcitrantes que se encuentran contaminando cuerpos de agua y suelo (Peña et al., 2018).

Como parte del segundo grupo de más abundante de esta superfamilia CE, en específico la familia CE 12 presentó dos secuencias clasificadas como ramnogalacturanan acetilesterasa (pectinasas), que están involucradas en la desesterificación de los grupos acetilo de los ramnogalacturonanos de la pectina presente en la pared celular vegetal (Soriano et al., 2004).

Finalmente la cepa H1 también expresó CE 15, 16 Y 18 como parte de su arsenal enzimático accesorio para la hidrólisis de lignocelulosa aún cuando estas enzimas fueron minoritarias en el secretoma de la cepa H1. Proteínas de estas familias de CE se reportaron en el secretoma de *A. niger* N402 para la degradación de bagazo de caña de azúcar (Pagotto et al., 2015).

En el secretoma total de H1, la superfamilia AAs se mostró también como un grupo relevante en la expresión de enzimas extracelulares involucradas en la degradación del sustrato vegetal (Figura 17). Se cuantificó la expresión de 7 familias diferentes

de AAs. La familia AA9, por ejemplo, mostró 3 secuencias que fueron identificadas como monoxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO), se conoce que estas enzimas pueden realizar procesos de oxido reducción de polímeros como la celulosa, donde la enzima genera la ruptura del enlace glucosídico en el carbono uno (C1) o en el carbono cuatro (C4), utilizando el oxígeno como agente oxidante (Cerdeña, 2016).

La escisión oxidativa de la celulosa, genera la formación de monómeros de glucosa oxidada en diferentes posiciones, en el caso que la oxidación ocurra en el C1, se obtendrá la presencia de ácidos adónicos, y de lo contrario ocurre en el C4 habrá la generación de moléculas denominadas 4-cetoaldosas (Villares et al., 2017). Por lo tanto la acción de estas enzimas da origen a micro fibrillas u oligosacáridos oxidados susceptibles a la degradación por celulasas (Cerdeña, 2016). Por lo anterior la actividad de estas enzimas las ha perfilado como buen recurso y se utilizan en sinergia para conseguir una mayor eficiencia en la degradación de celulosa (Villena et al., 2003; Moreau et al., 2019).

Por su parte, la familia AA 3 se perfiló como la segunda familia mayoritaria (Figura 17) con dos secuencias anotadas como oxidoreductasas. Sin embargo, no se logró tener una identificación más precisa de cada una de estas enzimas. Cabe destacar que esta superfamilia CAZY está conformada por algunas enzimas como aril-alcohol oxidasa, celobio deshidrogenasa, alcohol oxidasa, entre otras (Sützl et al., 2019). Particularmente las enzimas como aril- alcohol oxidasas y las celobiosa deshidrogenasas, se han reportado como enzimas capaces de generar peróxido de hidrógeno extracelular ( $H_2O_2$ ) durante la degradación de lignina (Gutiérrez et al., 1996; Hernández, 2012). Estas enzimas presenta un gran interés debido a la producción de  $H_2O_2$ , ya que es utilizado por enzimas como peroxidasas ligninolíticas como un agente oxidante para la despolimerización de lignina (Gutiérrez et al., 1996).

Finalmente las superfamilias con menor expresión fueron las enzimas polisacárido liasas (PL) y glicosil transferasas (GT) (Figura 17). Se identificaron solo dos familias PL, las cuales fueron anotadas como familias PL1 y 3, con dos y una secuencias anotadas, respectivamente. Las tres secuencias anotadas como pectato liasas involucradas en la degradación de pectina mediante la ruptura del enlace glucosídico, dando como resultado la liberación de monómeros de ácido galacturónico, ramnosa y varias dextrinas (Umaña, 2016; Chamorro, 2019).

Las glicosil transferasas presentaron 4 familias diferentes como, GT 1, 2, 35 Y 39 (Figura 17). Las familias GT 2 y 39 fueron las más abundantes, donde se cuantificaron dos secuencias quitina sintetasa involucradas en la biosíntesis de quitina, uno de los componentes principales de la pared celular fúngica (Werning, 2010).

#### 8.5. Análisis estadístico de los niveles de expresión en cada una de las enzimas del secretoma CAZY.

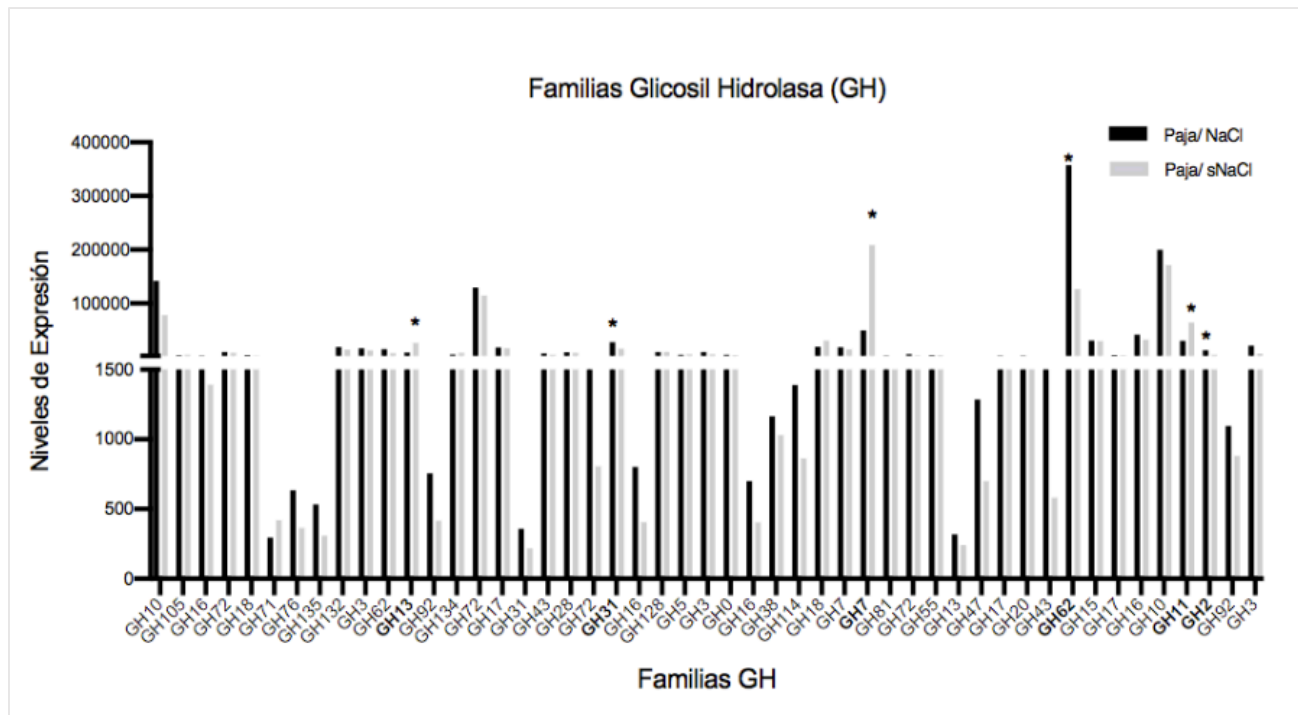
Los niveles de expresión de las enzimas clasificadas, utilizando la base de datos CAZY, fueron analizados mediante la prueba de *t*-student bajo un valor de confianza (*p*-value) de 95%. Este análisis permitió determinar la existencia de cambios estadísticos significativos en los niveles de expresión entre las diferentes proteínas expresadas en los cultivos paja de trigo con 1M de NaCl y paja de trigo.

Para el caso de las familias GH 13, 7 y 11, se obtuvieron niveles de sobre expresión estadísticamente significativos en medio de cultivo sin presencia de NaCl (Figura 18). Principalmente sabemos que GH7 y 11 son familias enzimáticas que se encuentra sobreexpresadas porque se encargan de la descomposición de los polímeros más abundantes en las paredes vegetales de la biomasa como, celulosa y hemicelulosa.

Para el caso de la familia GH 13, se presentan enzimas activas para la degradación de algunos polímeros de reserva como trehalosa y almidón (Figura 18). La sobre expresión de estas proteínas de estas familias mencionadas probablemente

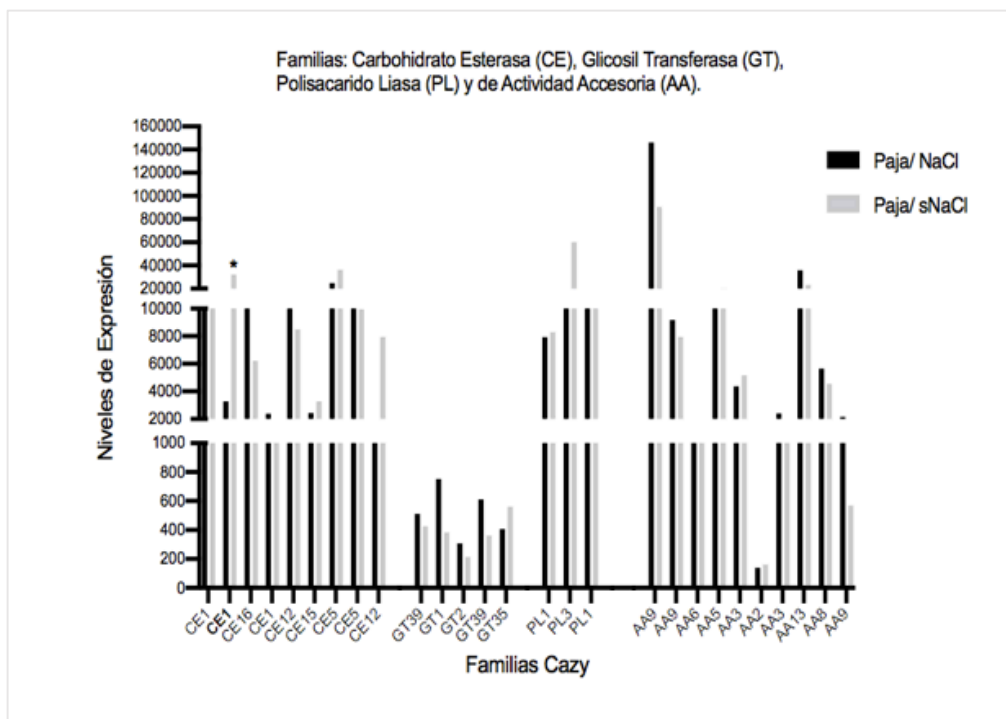
permitan a la cepa H1 tener acceso a una fuente de carbono en menor tiempo lo cual puede reflejarse en su crecimiento (Gutiérrez et al., 2013). Cabe mencionar que los factores abióticos como temperatura, pH, y salinidad para este trabajo no influyen en la expresión diferencial de enzimas hemicelulolíticas, ya que no funge como inductor de este proceso. Por otra parte la expresión y sobre expresión de enzimas hemicelulolíticas estada documentada por la presencia de azúcares inductores como D-xilosa, manosa y L-arabinosa, y la sobre expresión está sostenida por la presencia y abundancia de xilano (De Vries et al 1999). De lo contrario la presencia de un sustrato rico en celulosa inducirá una expresión pobre o nula de estas enzimas. (Gutiérrez *et al.*, 2013; Kowalczyk *et al.*, 2015).

En el cultivo en condiciones hipersalinas, las familias GH 31, 62 y 2, también mostraron niveles de expresión con significancia estadística (Figura 18). Las familias GH 62 y 2 representan enzimas involucradas en la degradación de xilano, mientras que la GH 31 agrupa enzimas con actividad celulasas. Esto ayudará a la cepa H1 a obtener una fuente de carbono en un ambiente hostil generado por la hipersalinidad. Por otra parte estas enzimas presentan un interés de estudio a futuro ya que puede despolimerizar biomasa vegetal en ambientes con altas cantidades salinas aún cuando se ha documentado que, en organismos como *Saccharomyces cerevisiae* concentraciones salinas presentes y mayores a 300 - 500 mM, generan inhibición de enzimas para el metabolismo de este organismo (Folch et al., 2004)



**Figura 18.** Distribución por niveles de expresión de las familias GH, y análisis estadístico ( $t$ -student) donde se marcaron con un asterisco aquellas familias con cambios significativos de expresión.

El mismo análisis estadístico evidenció que, para el resto de las proteínas contenidas en las superfamilias CE, GT, PL, AA, solo CE1 mostró cambios significativos en los niveles de expresión en ausencia de NaCl (Figura 19). Cabe destacar que la sobreexpresión de las enzimas de esta familia ayudará en la reducción de la complejidad estructural de la hemicelulosa, ya que se encargan de remover los grupos acetil y feruloil asociados a los azúcares de las cadenas principales de xilanos y glucomanos, a su vez estos grupos mantienen unida la hemicelulosa y la lignina en la pared vegetal. La hidrólisis de estos grupos sustituyentes reduce la dificultad en la degradación enzimática de la hemicelulosa (Fernández, 2012).



**Figura 19.** Distribución por niveles de expresión de las familias CE, GT, PL Y AA, análisis estadístico (*t*-student) donde se marcaron con un asterisco aquellas familias con cambios significativos de expresión.

En las siguientes tablas se han colocado cada una de las enzimas halladas en el secretoma CAZY de la cepa H1.

Glicosil hidrolasas anotadas en el secretoma de <i>Aspergillus sydowii</i> H1				
			PAJA- 1M NaCl	PAJA
CAZY	Hipotético ID	UniProt ID	NIVELES DE EXPRESIÓN	
GH0		A0A1L9TLJ3	4031.100	3558.133
GH2	$\beta$ -galactosidasa	A0A1L9TZ72	12612.433	4013.533
GH3	$\beta$ -xilosidasa	A0A1L9TZR0	21246.033	6236.967
GH3	$\beta$ -glucosidasa	A0A1L9T7M8	16187.933	12071.367
GH3	$\beta$ -glucosidasa	A0A1L9TLA9	9232.467	5145.133
GH5	Celulasa	A0A1L9TL49	4236.600	5463.700
GH6	$\beta$ -1,4-celobiohidrolasa	A0A1L9TVS8	357133.333	126332.667
GH7	$\beta$ -1,4-endo glucanasa	A0A1L9TQA0	18116.533	14016.667
GH7	$\beta$ -1,4-celobiohidrolasa	A0A1L9TSP8	49739.000	208560.000
GH10	$\beta$ -1,4- endoxilanasas	A0A1L9T0G2	141890.000	78191.667
GH10	$\beta$ -1,4-endoxilanasas	A0A1L9TXU7	199606.667	171572.000



GH11	$\beta$ -1,4-endoxilanasas	A0A1L9TYV9	29967.667	64012.667
GH13	$\alpha$ -amilasa	A0A1L9T921	8121.600	26410.000
GH13	Maltasa	A0A1L9TU62	317.927	241.856
GH15	$\alpha$ -1,4-glucosidasa	A0A1L9TW31	30813.000	29495.333
GH16	Glucanasa	A0A1L9T1E1	2195.467	1390.613
GH16	Glucanasa	A0A1L9TKR0	802.323	406.327
GH16	Glucanasa	A0A1L9TMQ2	699.530	404.970
GH16	Glucanasa	A0A1L9TWH2	41537.667	32238.667
GH17	Endo glucanasa	A0A1L9TB76	17620.667	16279.033
GH17	Endo glucanasa	A0A1L9TW65	3954.167	3048.133
GH17	$\beta$ -glucosidasa	A0A1L9TUF2	2113.967	1877.613
GH18	Quitinasa	A0A1L9T3D0	3832.800	2124.110
GH18	Quitinasa	A0A1L9TP10	19323.333	30892.000
GH20	$\beta$ -exosaminidasa	A0A1L9TUK6	2122.653	1766.630
GH28	Endo-poligalacturonasa	A0A1L9TGX8	8737.533	7550.400
GH31	$\alpha$ -glucosidasa	A0A1L9TK53	27577.667	15199.133
GH31	$\alpha$ -glucosidasa	A0A1L9TEP0	359.090	217.529
GH38	$\alpha$ -manosidasa	A0A1L9TN38	1165.247	1030.277
GH43	Arabinasa	A0A1L9TFZ9	6500.800	4025.933
GH43	$\beta$ -1,4- xilosidasa	A0A1L9TUQ5	1956.867	581.253
GH47	$\alpha$ -1,2 manosidasa	A0A1L9TUE7	1284.967	699.840
GH55		A0A1L9TTW5	3226.733	3946.500
GH62	Arabinofuranosidasa	A0A1L9T8A0	14851.867	7133.667
GH62	Arabinofuranosidasa	A0A1L9TAE7	129340.000	114236.000
GH71		A0A1L9T3G5	295.726	419.087
GH72	$\beta$ -1,3-glucanosil transferasa	A0A1L9T1T8	9365.767	7883.833
GH72	$\beta$ -1,3-glucanosil transferasa	A0A1L9TK27	1566.100	806.440
GH72	$\beta$ -1,3-glucanosil transferasa	A0A1L9TSX6	5478.267	2787.867
GH76	1,6- $\alpha$ - manosidasa	A0A1L9T5N2	634.570	363.111
GH81	$\beta$ -1,3(4) glucanasa	A0A1L9TSR0	2025.767	1721.833
GH92	$\alpha$ -1,2 manosidasa	A0A1L9TZI1	1095.877	879.743
GH92	$\alpha$ -1,2 manosidasa	A0A1L9T9Q4	756.527	415.233
GH105	Ramnogalacturonil hidrolasa	A0A1L9T0N0	3423.000	4437.700
GH114	$\alpha$ -galactosidasa	A0A1L9TN39	1390.497	863.767

GH128		A0A1L9TKR8	9080.467	9187.333
GH132	$\alpha$ -glucosidasa	A0A1L9T6W2	18622.000	13544.067
GH134		A0A1L9TA37	4539.467	7823.600
GH135		A0A1L9T5N8	532.534	308.373

**Tabla 2.** Anotación de cada una de las familias de glicosil hidrolasas (GH) del secretoma de *Aspergillus sydowii* H1.

En las siguientes tablas se han colocada cada una de las familias enzimáticas restantes del secretoma de la cepa H1.

Familias CE, AA, PL y GT del secretoma de <i>Aspergillus sydowii</i> H1				
			PAJA-1M NaCl	PAJA
CAZY	Hipotético ID	UniProt ID	NIVELES DE EXPRESIÓN	
<b>CE1</b>	Feruloil esterasa	A0A1L9TDB5	2362.80	1757.76
<b>CE1</b>	Feruloil esterasa	A0A1L9T898	19745.00	6212.47
<b>CE1</b>	Acetil xilano esterasas	A0A1L9TH85	12454.67	8483.50
<b>CE5</b>	Cutinasa	A0A1L9T4G9	3272.77	32078.00
<b>CE5</b>	Cutinasa	A0A1L9SZF9	21968.67	17956.40
<b>CE12</b>	Pectinasa	A0A1L9T7U5	1924.19	7943.53
<b>CE12</b>	Pectinasa	A0A1L9TMD7	2427.27	3269.47
<b>CE15</b>	4-O-glucuronil metilesterasa	A0A1L9TXI5	12406.83	9963.63
<b>CE18</b>		A0A1L9TN45	24815.00	36277.33
<b>AA2</b>	Peroxidasa	A0A1L9TU37	139.36	160.91
<b>AA3</b>	Oxidoreductasas	A0A1L9TT25	4355.40	5166.30
<b>AA3</b>	Oxidoreductasas	A0A1L9TU50	2391.61	1326.12
<b>AA5</b>	Galactosa oxisadas	A0A1L9TT12	10191.13	20164.47
<b>AA8</b>		A0A1L9U0V1	5644.87	4539.20
<b>AA9</b>	LPMO	A0A1L9TKK2	146000.00	90613.33
<b>AA9</b>	LPMO	A0A1L9TLK0	9177.87	7949.37
<b>AA9</b>	LPMO	A0A1L9TWB 4	2156.50	567.49
<b>AA13</b>		A0A1L9U0T5	35745.67	23081.33
<b>PL1</b>	Pectato liasa	A0A1L9TFB6	7918.90	8287.03
<b>PL1</b>	Pectato liasa	A0A1L9U0D6	14053.67	11394.10
<b>PL3</b>	Pectato liasa	A0A1L9TH94	19316.33	60090.33
<b>GT1</b>		A0A1L9THH2	752.93	384.13
<b>GT2</b>	Quintina sintetasa	A0A1L9TM02	308.09	212.93

GT35	$\alpha$ -1,4 glucano fosforilasa	A0A1L9TWA 3	406.62	562.01
GT39	Quintina sintetasa	A0A1L9TPF4	610.91	361.13
GT39	Quintina sintetasa	A0A1L9TA28	511.20	425.57

**Tabla 3.** Representación de las familias carbohidrato esterasas (CE), de actividad accesoria (AA), polisacárido liasas (PL) y glicosil transferasas (GT) pertenecientes al secretoma CAZY de *Aspergillus sydowii* H1.

## 9. Conclusiones

- La paja de trigo al estar en contacto con las células fúngicas, indujo un número común de enzimas expresadas y sobre expresadas para la degradación y aprovechamiento de la biomasa. Debido a que nuestra hipótesis planteaba que el NaCl podría tener un efecto sobre la expresión de diferentes enzimas lignocelulolíticas, concluimos que en ambas condiciones de crecimiento la presencia de NaCl no fue una herramienta limitante en la expresión y sobreexpresión de enzimas involucradas en la degradación de la biomasa vegetal.
- *Aspergillus sydowii* H1 mostró capacidad para secretar un amplio arsenal de enzimas para la degradación de la biomasa vegetal. Lo cual promete a esta cepa como una bio-herramienta en la producción de cocteles enzimáticos que pueden ser utilizados en la industria papelera, textil y energética. Así como en la biodegradación de algunos compuestos contaminantes.
- *Aspergillus sydowii* H1, puede ser una cepa potencial en producción de xilanasas y celulasas, ya que en este trabajo se obtuvo un número de enzimas similar a otros ascomicetos como, *Aspergillus niger*, *nidulans* y *fumigatus*.
- *Aspergillus sydowii* H1 no mostró expresión de enzimas ligninolíticas, por lo cual podemos decir que este hongo no está mineralizando lignina ya que su enfoque principal está en degradar la celulosa y hemicelulosa para obtener recursos energéticos y aquellos asociados a la inducción de la expresión y sobreexpresión de enzimas lignocelulolíticas.

## 10. Perspectivas

- Llevar a cabo cinéticas de degradación donde *Aspergillus sydowii* H1 se encuentre exclusivamente en presencia de lignina. Medir la degradación de este metabolito mediante técnicas de HPLC y espectrofotometría, así como el crecimiento de la cepa. Con estas pruebas se podrá tener un acercamiento hacia la eficiencia de la cepa en la mineralización y aprovechamiento de este polímero.
- Con el propósito de conocer cual o cuales azúcares inducen una mejor expresión enzimática, se propone generar cultivos de *Aspergillus sydowii* H1 en presencia de biomasa lignocelulolítica suplementados con D-xilosa; D-galactosa; D-manosa y L-arabinosa de manera individual y en consorcio.
- Generar análisis estructurales de las enzimas lignocelulolíticas con mayores niveles de expresión. Esto servirá para demostrar si un ambiente hipersalino (NaCl) pueden influir en la modificación estructural de estas.

## 11. Bibliografía.

- Abiàn, J., Carrascal, M., Gay, M. (2008) Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona. 2. 16-35 pp.
- Álvarez, C.(2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico. Mercados actuales y comercio internacional. Universidad Nacional Autónoma de México. 359. 63-89 pp.
- Anderson, F., Martínez, P., Valencia, H.(2009). PRETRATAMIENTOS DE LA CELULOSA Y BIOMASA PARA LA SACARIFICACIÓN. Scientia et Technica Año XV. 42. 284-289 pp.
- Ankney,A.J.,Muneer,A and Chen,X.(2018).Relative and Absolute Quantitation in Mass Spectrometry-Based Proteomics.ANNUAL REVIEWS. 11.49-77 pp.
- Anselmi,P,A.(2017).Producción de alfa-amilasas fúngicas en cultivos sumergidos empleando subproductos agroindustriales. Tesis de Licenciatura en Biotecnología. CONICET.IPROBYQ.55 pp.
- Ayala,C.,Regil,R.(2004).SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS. IBT, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM. 69 pp.
- Baltierra, E., Silva, E., Márquez, L., Sánchez, J. (2016). Inducción
- Ballesteros, M.J. Negro, Jose Miguel Oliva, A. Cabañas, P. Manzanares, M. Ballesteros. (2006). Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw, Appl. Biochem. Biotechnol., 129-132.496-508pp.
- Barroso, M.(2010). PRETRATAMIENTO DE BIOMASA CELULÓSICA PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL EN EL MARCO DE UNA BIORREFINERIA. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Universitaria Técnica Forestal. 115 pp.
- Barzón, E., Álvarez,C.,Totosaus,S.(2017).Efecto del pretratamiento de la paja de trigo sobre el rendimiento de biomasa y la producción de un extracto con actividad celulolítica empleando*Pseudomonasaeruginosa*.Acta Universitaria AU. 27(5). 26-33pp.
- Batista, R., Balcázar, E., Miranda, E., Sánchez, A., Cuervo, L., Aceves, D., Atriztàn, K., Morales, C., Rodríguez, R., Folch, J.(2014). Caracterizacion of Lignocellulolytic Activies from a Moderate Alophile Strain of *Aspergillus caesillus* isolated from a Sugarcane Bagasse Fermentation. PLOS ONE. 8. 12pp.
- Bhadauria, V., Zhao, W., Wang, L., Zhang, Y., Liu, J.,Yang, J.,Kong, L., Peng, Y.(2007). Advances in fungal proteomics. 162 (3). 193-200 pp.

- Blanes, J., De la Quintana, D., Arze, C., Curi, M. (2008). Biocombustibles. Revista Virtual REDESMA. 2(2). 117pp.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 72, 248-254 pp.
- Casado, J. (2004). Aproximación enzimática, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) Implicación de Polifenol Oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes. Tesis Doctoral. UNIVERSIDAD de ALICANTE. Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. 227 pp.
- Castellanos, L., González, L., Padrón G. (2005). PROTEÒMICA: INTRODUCCIÒN ALGUNOS CONCEPTOS BÀSICOS. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. 403 pp.
- Castro-Ochoa, D., Peña, C., Farrés, A. (2010). Producción y Caracterización de Cutinasas: Una alternativa interesante para la Biocatálisis a nivel industrial. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 13(1). 16-25 pp.
- Castro, D., Peña, C., Farres, A. (2010). Producción y caracterización de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. Revista especializada en ciencias químico-biológicas. 13 (1). 16-25 pp.
- Castro, Y. (2013). ESTUDIO DE LA BIOQUÍMICA DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS. Trabajo para obtener el título de : Especialista en Microbiología Industrial. Universidad Católica de Manizales. Centro de investigaciones, proyección y desarrollo. Instituto de investigaciones en microbiología y biotecnología agroindustrial. Especialidad en microbiología industrial Manizales. 51 pp.
- Cepero, M.C., Restrepo, M., Franco, A., Cardenas, M., Vargas, N. (2015). BIOLOGÍA DE HONGOS. Primera Edición. Universidad de los Andes (Colombia). Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Biológicas. 520pp.
- CNIH. Comisión Nacional de Hidrocarburos. (2018). Reservas de Hidrocarburos. Tomado de [\[https://portal.cnih.cnh.gob.mx/dashboard-reservas.php\]](https://portal.cnih.cnh.gob.mx/dashboard-reservas.php).
- Colman, V., Costa, E., Chaves, R., Tórtora, V. (2015). Roles biológicos del citocromo c: transporte electrónico mitocondrial, muerte celular programada y ganancia de actividad peroxidática. AnFaMed. 59-70 pp.
- Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev 29, 3–23.

- Cooper, B.(2013). ENZIMAS XILANOLÍTICAS BACTERIANAS Y SUS APLICACIONES INDUSTRIALES. VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud. 16 (1). 19-22 pp.
- Cruz, C., Castellanos, D., Arguello, H.(2009).Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. AGRAS Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS. 3(2). 237-249 pp.
- Cuervo, L.,Folch, J., Quiroz, R, E. (2009).Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Produccion de Etanol. Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM. Institutos DE Biotecnología UNAM. Cuernavaca Morelos. 13(3). 24 pp.
- Chamorro-Domínguez, G.(2019). Extracciónn y Cracterizaci3n de Pectinasas de Piel de Lima y su Uso como Estbilizante de Emulsiones de Aceite en Agua. Memoria de trabajo de Fin de Grado.Universitat de les Illes Balears. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.27pp.
- Chamorro, G.(2019). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS DE PIEL DE LIMA Y SU USO COMO ESTABILIZANTE DE EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA. Univesidad de les IIIES Balears. Facultad de Ciencias.Memoria de Trabajo de Fin de Grado. 30 pp.
- Chávez, M.,Domine, M.(2013).LIGNINA, ESTRUCTURA Y APLICACIONES: MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL. Avances en Ciencias e Ingeniería. Universidad Politécnica de Valencia, Intituto de Tecnología Química. 4(4). 15-46 pp.
- Chávez,M.,Domine,M.(2013).LIGNINA,ESTRUCTURA Y APLICACIONES:METODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL. Universidad Politecnica de Valencia, Instituto de Tecnologia Quimica, ITQ(UPV-CSIC). Avances en Ciencias e lingenieria.4(4).15-46 pp.
- Dávila, G.(2003).Transformación enzimática de plaguicidas halogenados utilizando la versátil peroxidasa de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 - Scientific Figure onResearchGate.de la degradación de lignina de paja de trigo en aromáticos por *Aspergillus* spp. y *Penicilliumchrysogenum*. *Journal of the Selva Andina ResearchSociety*, 7(1), 10-19.
- De la Cruz,K.,Dusted,J.,Perez,L.,Anaya, M.(2016).Caracterización de enzimas celulasas de nuevas cepas fúngicas obtenidas a partir de bagazo de caña de azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Redalyc.org. 50(20). 41pp.



- De la Torre, C.(2004). Aplicaciones de las Técnicas de proteómica para el estudio de enfermedades neuromusculares. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona UB. 115 pp.
- De Vries,R.P.,Visser,J.,Graaff,L.(1999).CreA modulates the XInR-induced expresion on xylose of *Aspergillus niger* genes involced in xilan degradation.Microbiol.281-285pp.
- Devia, J.(2014). ESTUDIOS DEL EFECTO DE XILANASAS FUNGICAS EN LA DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULOSÍCOS. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. 100 pp.
- Díaz, R.(2010). Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida por el hongo lignolitico *Corioloopsisrigida* en alpeorujo. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. 205 pp.
- E. Dornez, K. Gebruers, J. Delcour, C. Courtin, Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing, Trends Food Sci. Technol. 20 (2009) 495e510.
- Encarnación, S., Hernández, M., Martínez-Batallar, G., Contreras, S., Del Carmen Vargas, M., & Mora, J. (2005). Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biologicalproceduresonline*.7(1), 117-135 pp.
- Erken,A.(2019).UNFAP, Estado de población mundial 2019. UN ASUNTO PENDIENTE.
- Esser,K.,Bennett.J.W.(2002). THE MYCOTA A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Editorial Springer.Ruhr Universitat.Bochum Germany. 272-275 pp.
- Fagundes de Gouvêa,P.,Vianna,A.,Gerolamo,L.,De Souza Santos,E.,Riaño,D.,Akira,S., and Magnani,T.(2018).Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. BMC Genomics. 18 pp.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas por la Agricultura y la Alimentación.(2013). LA BIOENERGIA Y LOS BIOCOMBUSTIBLES. Tomado de [ [www.fao.org/3/a-ar5895.pdf](http://www.fao.org/3/a-ar5895.pdf) ].
- FAO. Organización de las Naciones Unidas por la Agricultura y la Alimentación.(2010). BIOENERGIA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA. El Marco Analítico BEFS. Tomado de [ <http://www.fao.org/3/a-i1968s.pdf> ].

- Fernández, F.(2012). PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR CEPAS DE *Aspergillus niger* EN CULTIVO SÓLIDO SOBRE SALVADO DE AVENA Y SALVADO DE TRIGO. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO. PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA. 57 pp.
- Folch-Mallol Jorge Luis,Adriana Alejandra A. Covarrubias Robles,Garay-Arroyo,Fernando Lledías.(2004).La Respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología.46(1-12).24-46pp.
- Gaitán, D., Pérez, L.(2007). AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS CELULOTICOS A PARTIR DE RESIDUOS VEGETALES FRESCOS Y EN COMPOST GENERADOS EN UN CULTIVO DE CRISANTEMO(*Dendranthema grandiflora*). Tesis para obtener el grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Bogotá, D.C. 58 pp.
- García, J, L., Martínez, M, J.(2014).Biomasa y Biotecnología. Dpto. Biología Medioambiental de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. 58.45-47 pp.
- Giraldo, O.(2012). Conversión de biomasa recalcitrante originada en la producción de etanol a partir de la planta de banano y su fruto en combustibles mediante procesos de pirólisis. Tesis de Maestría. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía. 103 pp.
- González, C., López., Pérez, G., & Vázquez, E. (2014). Manual de prácticas del laboratorio de bioquímica. Facultad de ciencias naturales. Universidad Autónoma Metropolitana. 35-50 pp.
- González, J., Rodríguez, J.(2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. Revista Colombiana de Biotecnología.
- González-Hernández Juan Carlos,Antonio Peña.(2002)Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). Revista Latinoamericana de Microbiología.44(3-4).137-156 pp.
- Grijalva, N.(2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. Enfoque UTE. 4(1). 13 pp.
- Guarnizo, A, F.,Martínez, P., Albeiro, H.(2009). PRETRATAMIENTO DE LA CELULOSA Y BIOMASA PARA LA SACARIFICACIÓN. Universidad Tecnológica de Pereira. Scientia et Technica. 42. 284-289 pp.
- Gutiérrez-Rojas,I.,Moreno-Sarmiento,N.,Montoya,D.(2013).REVISION: Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. ELSEVIER DOYMA.12 pp.

Gutiérrez, A., Del Río, J.(2010).COMPOSICIÓN QUÍMICA DE DIVERSOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS DE INTERES INDUSTRIAL Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE SUS LIGNINAS. Memoria de Trabajo. Universidad de Sevilla. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. (IRNAS). Departamento de Biología Vegetal. 73pp.

Gutierrez, J.G.(2009). Purificación y Caracterización Parcial de las Lacasas de *Trametes máxima* CU1 y su Aplicación en la Degradación de Colorantes Textiles.UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE NUEVO LEON. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis de Doctorado. 92 pp.

Gutiérrez,A.,Martinez,A.(1996). Revisión:Mecanismos de biodegradación de lignina. Revista iberoamericana de Microbiología. 23pp.

Hernández, A.(2012). MECANISMO CATALÍTICO E LA ARIL-ALCOHOL OXIDASA DE *PLEUROTUS ERINGII*. MEMORIA DE DOCTORADO. Universidad Complutense de Madrid. Centro de Investigaciones Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. 105 pp.

Herrero, J.(2014). ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS PEROXIDASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE LIGNINAS EN MUTANTES DE *ARABIDOPSIS*. TESIS DOCTORAL. Universidad de Alcalá. 221 pp.

IBT.(2015). Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Producción de lacasas por *Pleurotostreatus*. Tomado de [ <http://www.ibt.unam.mx/Geg/cultivos.html> ].

Iñesta, J., García, P.(2012). El petróleo, el recorrido de la Energía. Madrid. Primera edición. Editorial E.i.S.E. Damech, S.A. 18 pp.

Jiahong Wang; Xuntong Chen; Chonlong Chio;Chun Yang; Erzhenq Sua , Yongcan Jin; Fuliang Cao; Wensheng Qin. (2018). Delignification overmatches hemicellulose removal for improving hydrolysis of wheat straw using the enzyme cocktail from *Aspergillus niger*.ELSEVIER.459-468 pp.

Kowalczyk,E. Joanna., Gruben,S. Birgit., Bttaglia E.,Wiebenga, Ad., Mjoor E.,De vries Ronald P.(2015).Genetic Interaction of *Aspergillus nidulans galR*, *xlnR* and *araR* in Regulation D-Galactosa and L-arabinose Release and Catabolism Gene Expression.PLOS one. 1-17 pp.

La defensa de los derechos y la libertad de decidir DE TODAS LA PERSONAS.  
La Rotta, C., Ospina,S., López,A.(1998).PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS CON ACTIVIDAD DE FRUCTOSILTRANSFERASA.Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, AA 14 490, Santafé de Bogotá, *Colombia.Col.Cienc.Quím.Farm.* 27. 53-56

pp.

- Lequart,C.,Ruel,K.,Lapierre,C.,Pollet,B.,Kurek,B.(2000)Abiotic and enzymaticdegradation of Wheat Straw cellwall: a biotechnological and ultrastructuralinvestigation. ELSEVIER, Biotechnology.80.249-259 pp.
- Lu, X., Sun, J., Nimtz, M., Wissing, J., Zeng, A.-P., &Rinas, U. (2010). The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *MicrobialCellFactories*, 9, 23. 1-13 pp.
- Llenque,L.,Muños,M.,Espejo,E.,Moreno,A.(2015). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. Ciencia y Tecnología. 4. 39-49 pp.
- Macarrón, R.(1992). PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACION DE ENDOGLUCANASA III DE *Trichoderma reesei* QM9414. TESIS DOCTORAL. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I. 91pp.
- Macedo, A.(2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 15 (2). 97-103 pp.
- Machado, Cristina.(2010). Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y el Caribe. Organización Latinoamericana de Energia (olade).Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura (IICA). 88 pp.
- Marian, A.,Vázquez, J., González, J., Rogado,R.(2018). Identificación y Secuenciación de Proteínas mediante Espectrometría de Masas. 13pp.
- Martínez-Corona, R., Cortes, C., Madrigal ,L., González, J.(2019).HONGOS Y LEVADURAS:FÁBRICAS DE LIPASAS.INERCENCIA.44(7).378-384 pp.
- Martínez, A., Esperanza, M., Ruiz, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M., Gutiérrez, A., Del Río, J.(2005).Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. INTERNATIONAL MICROBIOLOGY. 8. 195-204 pp.
- Martínez, C., Balcázar, E., Dantan, E., Folch, J.(2008) Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Revista Latinoamericana de Microbiología. 50(3 y 4 ).119-131 pp.
- Martínez, L.(2016).Localización y función de enzimas involucradas en la remodelación de la pared celular de *Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). 106 pp.

- Martínez, Y.(2014). SELECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS CON POTENCIAL PARA LA DEGRADACIÓN DE LIGNOCELULOSA AISLADOS DE DESECHOS AGROINDUSTRIALES DE CAFÈ HIGUERILLA. Tesis para obtener el grado de Bacterióloga. Universidad Católica de Manizales. Facultad de Ciencias de la Salud. Programa de Bacteriología. 65 pp.
- McDonough, M., Kadirvelraj, R., Harris, P., Polusen, J., Larsen, S.(2004). Ramnagalacturonan lyase reveals a unique three-domain modular structure for polysaccharide lyase family 4. FEBS letters. 188-194 pp.
- Mee, J., Nag, J., Sang, Y., Ho, N.(2010). Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. Springer-Verlag. 56. 369-382 pp.
- Meneses, C.(2011). CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS( FRUTO Y TORTA) DE LA HIGUERILLA(RICINUS COMMUNIS). UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES. CENTRO DE INVESTIGACIONES, PROYECCIÓN Y DESARROLLO, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN, MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL, ESPECIALIZADO EN MICROBIOLOGÍA. 57 pp.
- Mojica, T., Sánchez., Bobadilla, L.(2003). La Proteómica, otra cara de la genómica. NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA. Instituto de Genética, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería de Sistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 1(1). 13-16 pp.
- Montoya, M.(2012). CARACTERIZACIÓN DE UNA ENDO-XILANASA PRODUCIDA POR *Bacillus flexus* NJY2. TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Industrial. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS. 67pp.
- Morales de la Rosa, S.(2015). HIDRÓLISIS ÁCIDA DE CELULOSA Y BIOMASA LIGNOCELULÓSICA ASISTIDA CON LÍQUIDOS IÓNICOS. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de ciencias. Departamento de Química - Física Aplicada. 48pp.
- Morales, D., Gallo, L. (2006). Plataforma de proteómica. Instituto de biotecnología. Universidad Autónoma Nacional de México. 1-49 pp.
- Moreau, C., Tapin-Lingua, S., Grisel, S. et al.(2019) Lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. Biotechnol Biofuels 12, 156. 13 pp.

- Moro, S. (2018). Implicación del exómero en la respuesta a estrés de *Schizosaccharomyces pombe*. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral. 173 pp.
- Oliva, J. (2003). EFECTOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN ORIGINADOS EN LA EXPLOSION POR VAPOR DE BIOMASA DE CHOPO SOBRE *Kluyveromyces marxianus*. Memorias para obtener el grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología III. 156 pp.
- OPEP. Organización de Países Exportadores de Petróleo. (2018). Tomado de [\[https://lta.reuters.com/article/businessNews/idLTAKBN1FW15O-OUSLB\]](https://lta.reuters.com/article/businessNews/idLTAKBN1FW15O-OUSLB).
- Orbegoso, A. (2002). Producción de enzimas Pectinasas por Actinomycetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 58pp.
- Ovando, S., & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21 (42), 113-122 pp.
- P. Kumar, D.M. Barrett, M.J. Delwiche, P. Stroeve. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production, *Ind. Eng. Chem. Res.*, (48) 3713-3729 pp.
- Pagotto, Gustavo., Snachez, C., Pereira, A., Silva, E., Tieppo, A., Franco, A., Marcio, F., Buckeridge, M., Goldman, G. (2015). Comparative Secretoma Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. *PLOS ONE*. 20 pp.
- Pando, V., & Ferreira, C. (2007). Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología*. 14, 97-107pp.
- Peña, C., Bermúdez, E., Morales, S y Farrés, A. (2018). Las cutinasas como una herramienta valiosa para la descontaminación de residuos plásticos. Facultad de Medicina. MENSAJE BIQUIMICO. 24-35 pp.
- Plascencia, G. (2003). ESPECTROMETRÍA DE MASAS. MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS. UUNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA. 40 pp.
- Pomilio, A., Bernatenè, E., Vítale, A. (2011). Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electro spray. *Bioquímica Clínica*. 45 (1). 47-79 pp.
- Ponton, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista iberoam Micol.* Departamento de inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de medicina y odontología. 25. 78-82pp

- Protocolo. For Research Use Only.(2004).Applied Biosystems iTRAQ™ Reagents Amine-Modifying Labelig Reagents for Multiplexed Relative and Absolute Protein Quantitation.AB Aplied Biosystems.12 pp.
- Quintero, J,C.(2011). Degradacion de Plagucidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. Revista Facultad de Agronomia. Univesidad de Colombia. Medellin. 64 (1).5867-5882 pp.
- Quintero, J., Feijoo, G., Lema, J.(2006). RPRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM BASIDIOMYCETE FUNGI ON LIGNOCELLULOCIC MATERIALS. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÌMICA FARMACÈUTICA. Universidad Antioquia, Medellin.13 (2). 61-67 pp.
- Quiroz-Castañeda,R.,Folch,J.(2013).Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars.INTECH open science-open minds. 120-155 pp.
- Ramírez-Olivano.(2019). PRODUCCIÓN DE UN COCTEL ENZIMÁTICO PARA LA OBTENCIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍCAS. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Maestría en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables (MIATS). Cuernavaca Morelos. Laboratorio de Organismos Extremófilos. 68 pp.
- Ramos, D., Díaz, S., Villar, M.(2016). Biocombustibles.¿ Qué son los biocombustibles y qué lugar ocupan en el panorama energético argentino y mundial?.Planta piloto de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Sur-Conicet. 25 (47). 69-73 pp.
- Rauniyar,N.,Yates,J.(2014).Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics. Journal of PROTEOMA. ACS Publications.13.5293-5309 pp.
- Riffat,I., Spicer, V,Dmitry, S., Oleg, V., Wilkins, J Umesh, R.,Richard, S., Levin, D.(2015). Quantitativeprotemic analysis of the cellulolytic system of Clostridium temitidis CT1112 reveals distinct protein expresion profiles upon growth on  $\alpha$  cellulose and cellobiose. 125. 41-53 pp.
- Rodríguez, E.(2006). CARACTERIZACION MOLECULAR DE LACASAS DE *Pleurotuseringii*: EXPRESIÓN HETERÒLOGA DE ETSAS ENZIMAS Y APLICACIONES EN LA DEGRADACIÒN DE CONTAMINANTES AROMÀTICOS. TESIS DOCTORAL. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 135pp.
- Rodriguez,M.(2010). PROTEÒMICA DE EXPRESIÒN DIFERENCIAL EN *Acinetobacter baumannii* RESISTENTE A COLISTINA. TESIS DOCTORAL UPF/2010. Barcelon. UNIVERSITAT POMPEU FABRA. Departamente de Cléncies Experimental i de la Salud. 179 pp.

- Romero, A. (2002). Cromatografía. Instituto de Biotecnología UNAM. 9-15pp.
- Romero, R., Fernández, L., Plaza, P., Garrido, A., Martínez, J.(2007). Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. Rev. Esp. Salud Publica. 81 (5). 461- 474 pp,
- Rondón, M.,Díaz, Y.,Fernández, E.,Tabio, D.(2017). Obtención de biodiesel a partir de aceites de origen vegetal, "Moringa Oleífera". Univerisdad Tecnológica de LA Habana. 49 pp.
- Ruiz, D.(2017). Aislamiento e indentificación de microorganismos lignocelulósicos a partir de suelos de cultivo de caña de Finca Balsora y Judea y compost del Ingenio Mayagüez. UNIVERSIDAD ICESI. FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMAÉUTICAS.Trabajo de grado para obtener el título de pregrado en Química Farmacéutica. Santiago de Cali. 38 pp.
- Ruiz,J,K., Morales,D.(2008).DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CADMIO, PLOMO Y NIQUEL POR HONGOS DE LA PODREDUMBRE BLANCA INMOVILIZADOS. PONTIFICIA UNIVESISDAD JAVERIANA. FACULTAD DE CIENCIAS. Bogotá D.C. Colombia. Trabajo de grado para obtener el título en MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL. 104 pp.
- Salcede,J,G.,Ríos, J,M., Ferrer, A.,López,E.,Perdo,M.,Aiello,C.(2013).EFECTO DE PRETRATAMIENTOS DESLIGNIFICANTES SOBRE LA CRISTALINIDAD, HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y ULTRAESTRUCTURA DE RESIDUOS DE LA COSECHA DE LA CAÑA DE AZÚCAR. Universidad de Sucre. Sincelejo, Colombia. 22 (1). 142-151 pp.
- Salinas, E., Gasca, V.(2009). Los Biocombustibles. EL Cotidiano. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco. 157. 75-82 pp.
- Samson, R,A., Visagie, C,M., Houbraken, J.,Hong, S,B., Hubka,V.,Klaassen, C,H.(2014).Phylogeny, identification and nomeclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology. 78. 141-173 pp.
- Serrano, J, C., Luque, R.(2011). Biocombustibles líquidos: procesos y tecnoligías. Química y Medio Ambiente. Universidad de Cordoba. Real Sociedad Española de Química. 107 (4). 383-389 pp.
- Sørensen, L. M., Lametsch, R., Andersen, M. R., Nielsen, P. V., &Frisvad, J. C. (2009). Proteome analysis of *Aspergillus niger*. Lactate added in starch-containing medium can increase production of the mycotoxin fumonisin B<sub>2</sub> by modifying acetyl-CoA metabolism. *BMC Microbiology*. 10. 9-255 pp.
- Soriano, M.(2014). Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Asilamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Penicillus sp.* BP-23 e YVpA de *Bacillus subtilis*. Tesis de doctorado. UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Facultad de biología. Departamento de microbiología. 225 pp.
- Sosa, V.(2012) Proteómica. CINVESTAV-Zacatenco. 1-64 pp.
- Sützl, L., Foley, G.,Gillam, E., Boden, M and Haltrich, D.(2019). The GMC superfamiliiy oxidoreductase revisited: analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases. Biotechnology for Biofuels. 1-59 pp.
- Tafolla, J., Gonzalez, A., Tiznado, M., Zcarias, L y Báez, R.(2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. Revista fitotecnia mexicana. 36 (1). 4-12 pp.



- Umaña-Zamora, M. (2016). Cinéticas de Extracción y Caracterización de Pectinas de los Subproductos de Naranja mediante Asistencia Acústica. Memoria de trabajo de fin de Master. UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS. Ciencia y Tecnología Química. 51 pp.
- UNFPA. Fondo de Población de las Naciones Unidas. (2017). Tomado de [ <https://www.unfpa.org/es/swop> ].
- Valdivia, G., Chacón, S. (2008). LA CRISIS DEL PETRÒLEO EN MÈXICO. Foro Consultivo Científico y Tecnológico. Prime edición. 273 pp.
- Villares, A., Moreau, C., Bennati, C., Garajova, S., Foucat, L., Falaour, X., Saake, B., Guy, J., Chathala, B. (2017). Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. SCIENTIFIC REPORTS. Nature. 7. 1-9 pp.
- Villena, G. J., Venkatesh, L., Yamazaki, A., Tauyumu, S y Gutiérrez, M. (2009). Inicial profile proteoma intracelular de *Aspergillus niger* biofilms. Facultad de ciencias biológicas. 16 (1). 101-108 pp.
- Villena, G., Gutiérrez-Correa. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos extracelulares y fisiológicos. *peru.biol.* FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. 10(1). 78-87 pp.
- Viñals, M., Bell, A., Michelena, G., Ramil, M. (2012). Obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar. 46(1). 7-16 pp.
- Vivek, R. P., Karthikeyan Mohanraj, Muralidharan Vandanashree, Anupam Jhingran, James P. Craig & Areejit Samal. (2017). Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. SCIENTIFIC REPORTS. 8:6617. 16 pp
- Vivero, J., Porras, C. (2008). Los biocombustibles y su impacto en la crisis alimentaria. Fundación alternativas. Madrid. 29-51 pp.
- Wartenberg, D., Lapp, K., Jacobsen, I., Dahse, H. (2011) Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a major secreted protein. ELSEVIER. 301. 602-611 pp.
- Wiese, S., Reidegeld, K., Meyer, H., Warscheid, B. (2007). Protein Labeling by ITRAQ: A New Tool for Quantitative Mass Spectrometry in Proteome Research. *Proteomics* .7. 340-350 pp.
- Y. Sun, J. Cheng. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.*, (83) 1-11 pp.
- Yañez-Cocotl, L., Moreno, S., Encarnación, S., Pliego, L., Castañeda, M and Espin, G.

- (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 160. 479- 487pp.
- Yates, J. (2000). Mass spectrometry from genomics to proteomics. Department of Molecular Biotechnology, University of Washington, Seattle, USA. 16 (1). 5-8 pp.
- Yonghyun, K., Nandakumar, M., Marten, M.(2007). Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *ELSEVIER*. 44. 886-895 pp.