



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA CUTINASA AN CUT4 DE
Aspergillus nidulans PW1**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

CYNTHIA MONSERRATH BASTIDA LÓPEZ

CDMX.

2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ARTURO NAVARRO OCAÑA

VOCAL: AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

SECRETARIO: BEATRIZ RUÍZ VILLAFAN

1er. SUPLENTE: CARMINA MONTIEL PACHECO

2° SUPLENTE: NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHÁVEZ

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT 153500 y del proyecto PAPIIT IN228316

ASESOR DEL TEMA: DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

FIRMA: _____

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. EVA PATRICIA BERMÚDEZ

FIRMA: _____

SUSTENTANTE: CYNTHIA MONSERRATH BASTIDA LÓPEZ

FIRMA: _____

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE GRÁFICOS	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cutinasas	1
1.2 Cutícula	2
1.3 Estructura	4
1.4 Identificación de los géneros productores de cutinasas	4
1.5 <i>Aspergillus nidulans</i>	6
1.6 Mecanismos naturales de regulación en los hongos	7
1.6.1 Nutrición y metabolismo del carbono	7
1.6.2 Metabolismo del nitrógeno	9
1.6.3 Estrés oxidativo	11
1.7 Factores que afectan la producción de cutinasas	13
1.7.1 Especies reactivas de Oxígeno (ERO)	14
1.7.2 Estrés Oxidativo (EO)	15
1.7.3 Mecanismos antioxidantes	15
1.8 Aplicación de cutinasas	16
1.8.1 Alimentos	16
1.8.2 Detergentes	18
1.8.3 Degradación de contaminantes	18
1.8.4 Producción de biodiesel	19
2. ANTECEDENTES	20
2.1 Cutinasas reportadas en el genoma de <i>A. nidulans</i>	20
2.2 Investigaciones del grupo de trabajo	20
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 General	23
5.2 Particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	24

6.1 Estrategia experimental	24
6.2 Microorganismo.....	25
6.3 Obtención de cutina.....	25
6.4 Cosecha de esporas de <i>A. nidulans</i> PW1	25
6.5 Formulación de medios en condiciones de estrés oxidativo.....	26
6.6 Condiciones de cultivo	26
6.7 Concentración y precipitación de los extractos crudos.....	26
6.7.1 Centrifugación	26
6.7.2 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	27
6.7.2.1 Volumen en tubos eppendorf	27
6.7.2.2 Volumen en matraz Erlenmeyer	27
6.7.3 Precipitación de proteína con solvente	27
6.8 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	28
6.8.1 Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína	28
6.8.1.1 Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca.....	28
6.8.1.2 Cuantificación de proteína en microplaca	28
6.8.2 Preparación del perfil de proteínas y zimogramas.....	29
6.8.2.1 Electroforesis	29
6.8.2.2 Tinción con plata	29
6.8.2.3 Tinción con azul de Coomassie	29
6.8.2.4 Zimograma	30
6.8.3 Electroforesis bidimensional (2D)	30
6.8.3.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	30
6.8.3.2 Segunda dimensión	31
6.8.3.3 Análisis de geles.....	32
6.9 TÉCNICAS MOLECULARES.....	32
6.9.1 Extracción de ARN con trizol	32
6.9.2 Síntesis de ADNc	33
6.9.3 Primers.....	33
6.9.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
6.9.5 Preparación de geles de agarosa	34
6.9.6 Purificación de ADN	34

6.9.7 Secuenciación de ADN.....	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Cosecha de esporas y reactivación de la cepa	35
7.2 Producción de la enzima ANCUT4	36
7.2.1 Selección del agente oxidante.....	36
7.2.2 Formulación del medio optimizado para la expresión de ANCUT4.....	39
7.3 Corroboración de condiciones de estrés oxidativo.....	40
7.3.1 Identificación.....	40
7.4 Concentración de proteína y cuantificación de actividad	41
7.5 Perfil de proteína y zimograma.....	42
7.5.1 Identificación.....	43
7.6 Optimización de muestra para el IEF (primera dimensión).....	44
7.6.1 Métodos de precipitación de proteínas ensayados.....	44
7.6.2 Isoelectroenfoco de ensayos de muestras precipitadas.....	45
7.6.3 Precipitación con TCA de medio optimizado	46
7.7 Optimización de IEF con muestra precipitada.....	47
7.8 Geles en 2D (segunda dimensión).....	50
7.8.1 Perfil de proteína y zimograma	50
7.8.2 Identificación.....	53
8. CONCLUSIONES	55
9. PERSPECTIVAS.....	56
10. BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO A.....	72
ANEXO B.....	73
ANEXO C.....	74
ANEXO D.....	74
ANEXO E	75
ANEXO F	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Unidad estructural de cutina.	1
2. Ubicación de la cutícula en tejido vegetal.	2
3. Diagrama del plegamiento α/β de cutinasa.	4
4. Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .	6
5. Inducción de enzimas asociadas al estrés oxidativo en diferentes condiciones de crecimiento.	13
6. Generación de ERO.	14
7. <i>Aspergillus nidulans</i> PW1.	35
8. Esporas de <i>A. nidulans</i> PW1.	35
9. Medición de la actividad esterasa cualitativa de extractos crudos.	37
10. Crecimiento de <i>A. nidulans</i> en medio optimizado utilizando cutícula de manzana como inductor.	39
11. Crecimiento de <i>A. nidulans</i> en medio optimizado en condiciones de estrés oxidativo.	39
12. Gel de agarosa al 1%. Carriles 1: MPM Gene Ruler 1kb, 2,3 y 4: productos de amplificación del gen <i>catB</i> .	40
13. Comparación de la secuencia de CatB con producto amplificado mediante PCR en punto final.	41
14. Medición de la actividad cualitativa del extracto concentrado.	41
15. Perfil de proteínas de sobrenadantes concentrados en gel SDS-PAGE al 14%.	42
16. Zimograma de sobrenadantes concentrados en gel SDS-PAGE al 14%.	42
17. Perfil de proteínas en gel 2D SDS-PAGE al 12%.	51
18. Zimograma de sobrenadantes concentrados en gel 2D SDS-PAGE al 12%.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Principales monómeros de cutina de manzana variedad Golden Delicious.	3
2. Microorganismos productores de cutinasas.	5
3. Factores de transcripción para ortólogos de nitrógeno en hongos filamentosos.	10
4. Factores de transcripción para ortólogos de estrés oxidativo en hongos filamentosos.	12
5. Parámetros bioquímicos de las cutinasas ANCUT1 y 2 de <i>A. nidulans</i> PW1.	21
6. Análisis de sitios de unión de factores de transcripción de EO, para <i>ancut4</i> .	21
7. Cutinasas en el genoma de <i>A. nidulans</i> .	22
8. Caracterización bioquímica de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2.	22
9. Composición de medios en condiciones de estrés oxidativo en <i>A. nidulans</i> .	26
10. Volumen y cantidad de proteína máximos para las ReadyStrips IPG Strips pH 3-10 (Bio-Rad).	31
11. Conteo de esporas de <i>Aspergillus nidulans</i> PW1.	35
12. Ensayo cualitativo, de crecimiento de biomasa en <i>A. nidulans</i> a concentraciones diferentes de estrés.	37
13. Cuantificación de proteína de los extractos crudos, en condiciones de estrés.	38
14. Composición de medio optimizado en condiciones de estrés oxidativo en <i>A. nidulans</i> .	39
15. Cuantificación de proteína de extracto concentrado.	42
16. Identificación de la cutinasa ANCUT4 de <i>Aspergillus nidulans</i> .	43
17. Identificación de la cutinasa ANCUT1 de <i>Aspergillus nidulans</i> .	43
18. Cuantificación de proteína en medios precipitados con TCA y Acetona-DTT.	45
19. Programa para el IEF de muestra con glucosa.	45
20. Cuantificación de proteína en medio optimizado precipitado con TCA.	47
21. Programa I para el IEF.	47
22. Programa II para el IEF.	47
23. Programa para el IEF con muestra de Cutina/H ₂ O ₂ 0.5 mM.	49
24. Análisis de gel 2D SDS-PAGE.	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico	Página
1. Cultivo con glucosa, precipitada con TCA y Acetona-DTT.	46
2. Cultivo con Cutina/H ₂ O ₂ 0.5 mM en dos programas diferentes en el IEF.	48
3. Cultivo con Cutina/H ₂ O ₂ 0.5 mM.	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cutinasas

Las cutinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del polímero cutina, un componente estructural de la cutícula de las plantas. La cutina es un polímero que consta de ácidos grasos de cadena larga que están unidos entre sí por enlaces tipo éster creando una red tridimensional rígida (Taiz y Zeiger, 2002). Está formada principalmente por ácidos grasos de C16 y C18, sustituidos con grupos hidroxilo o epóxidos, situados en la parte final de la cadena, en el lado opuesto al grupo carboxilo, aunque la composición precisa varía dependiendo de la especie (Figura 1).

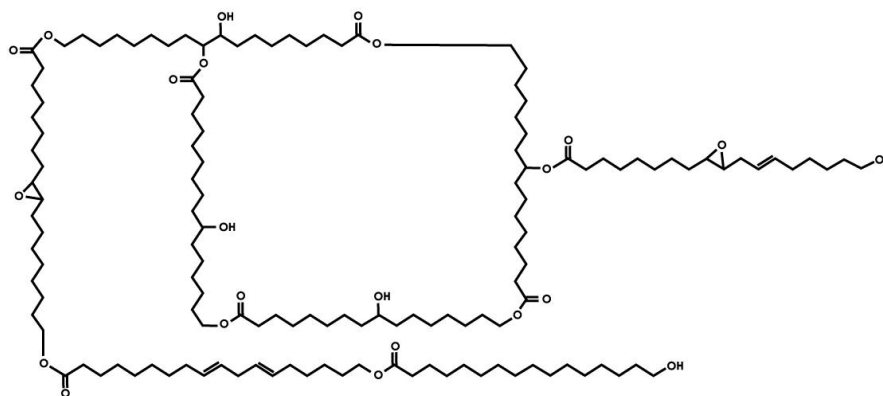


Figura 1. Unidad estructural de cutina (Walton y Kolattukudy, 1972).

Las cutinasas son producidas por microorganismos capaces de degradar la pared celular de las plantas. Catalizan la ruptura del enlace éster de la cutina originando la liberación de monómeros de cutina. Las cutinasas han sido encontradas en diversas fuentes, especialmente en hongos (principalmente fitopatógenos), ya que estas enzimas pueden colaborar a la penetración por parte del micelio a través de la cutícula de la planta (Purdy y Kolattukudy, 1975). También pueden hidrolizar diversos ésteres sintéticos y mostrar actividad sobre triglicéridos de cadenas cortas y largas, así como realizar reacciones inversas de síntesis en medios con baja actividad de agua, por lo tanto se pueden considerar un puente entre carboxilesterasas y lipasas debido a su amplia especificidad de sustrato (Carvalho *et al.*, 1999), lo que las ha llevado a numerosas aplicaciones (Chen *et al.*, 2013).

1.2 Cutícula

Las partes aéreas de las plantas superiores, hojas y estructuras especializadas como tallos, flores frutos, están cubiertas por una barrea químicamente densa y resistente llamada cutícula o membrana cuticular. El espesor de la cutícula varía entre 0.1-10 micras y su grosor es variable según las especies vegetales, la zona de la planta y su edad o estado de desarrollo. Sus funciones son evitar la pérdida de agua y de sustancias de los tejidos vegetales, así como proteger a la planta de la irradiación y de agresiones físicas, químicas y biológicas, por lo que representa la primera barrera para la invasión de patógenos y constituye una fuente de alimento para los saprobios cuando la planta está en descomposición (Figura 2) (Skamnioti *et al.*, 2008).

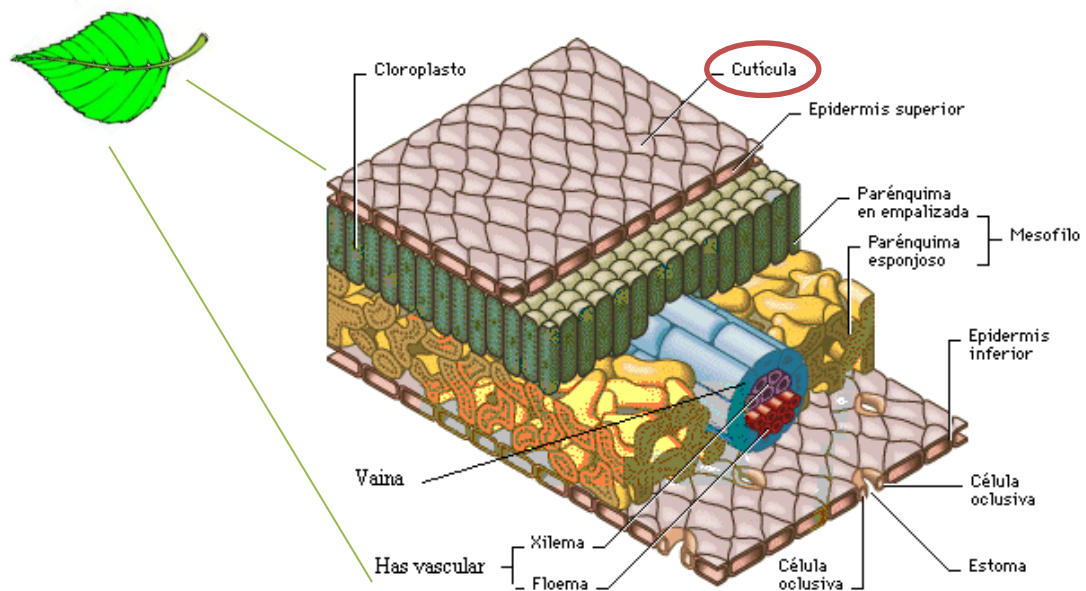


Figura 2. Ubicación de la cutícula en tejido vegetal (Skamnioti *et al.*, 2008).

La estructura y composición de la cutícula varía entre plantas, órganos y etapas de crecimiento, pero básicamente se compone de una matriz de cutina con ceras en su interior y sobre su superficie.

El principal constituyente de la cutícula es la cutina (Holloway, 1973). El biopolímero cutina se forma a través de esterificación de alcoholes primarios, resultando un complejo estructural tridimensional incrustado de ceras.

Las ceras cuticulares son una mezcla de compuestos hidrofóbicos que están compuestos predominantemente de lípidos alifáticos, tales como largas cadenas de ácidos grasos y sus derivados. Además las ceras podrían contener otros compuestos tales como triterpenoides y fenilpropanoides (Nawrath, 2006). La cera epicuticular puede ser depositada como una capa o como cristales. Las ceras intracuticulares, en contraste, están embebidas en el polímero de la cutícula principalmente formando subunidades bien empaquetadas.

La mayoría de las cutículas caracterizadas corresponden a hojas y frutas (Kolattukudy, 1970; Deas *et al.*, 1974; Casado y Heredia, 1999; Vogg *et al.*, 2004), de las cuales principalmente la cutícula y cutina de manzana se han estudiado ampliamente (Richmond y Martin, 1959; Holloway, 1973; Croteau y Kolattukudy, 1974). La cutina de manzana, variedad Golden Delicious, fue utilizada como fuente de carbono e inductor en los primeros estudios de producción de cutinasas en *F. solani pisi* (Purdy y Kolattukudy, 1975; Lin y Kolattukudy, 1980). En la Tabla 1 se muestran los principales monómeros de la cutina de manzana variedad Golden Delicious. En algunas cutículas predomina un largo de cadena como, por ejemplo, en el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y en la hoja de haba (*Vicia faba*) C16, y en la hoja de espinaca (*Spinacia oleracea*), C18 (Stark y Tian, 2006).

Tabla 1. Principales monómeros de cutina de manzana variedad Golden Delicious (Holloway, 1973).

Ácido graso	Monómeros totales (%)
16-hidroxihexadecanoico	2.1
9- ó 10,16-dihidroxihexadecanoico	19.7
18-hidroxi octadeca-9-enoico	2.4
18-hidroxi octadeca-9,12-dienoico	14.3
9,10-epoxi-18-hidroxi octadeca-12-enoico	22.5
9,10-epoxi-18-hidroxi octadecanoico	15.3
9,10,18-trihidroxi octadeca-12-enoico	4.3
9,10,18-trihidroxi octadecanoico	14.4
Otros	5

Estudios posteriores han explorado diferentes sustratos para lograr la producción de cutinasas en hongos (Guo *et al.*, 1996) y bacterias (Sebastian y Kolattukudy, 1988; Fett *et al.*, 1999; Fett *et al.*, 2000), han concluido que la cáscara de jitomate, la cutina de manzana y la suberina de papa son buenos inductores de estas enzimas.

1.3 Estructura

Las cutinasas son los miembros más pequeños de la familia de serina-hidrolasas y presentan un plegamiento conocido como α/β hidrolasa (Martínez *et al.*, 1992). La estructura central de las α/β hidrolasas está formada principalmente por láminas β -plegadas paralelas conectadas por hélices- α . Los residuos catalíticos constituyen siempre una triada altamente conservada: un nucleófilo (serina, cisteína o ácido aspártico), un residuo ácido y un residuo de histidina totalmente conservado. (Nardini y Dijkstra, 1999). En la Figura 3 (Egmond y de Vlieg, 2000) se muestra un esquema del plegamiento canónico de las cutinasas, basado en la estructura de la cutinasa de *F. solani* que ha sido la más estudiada.

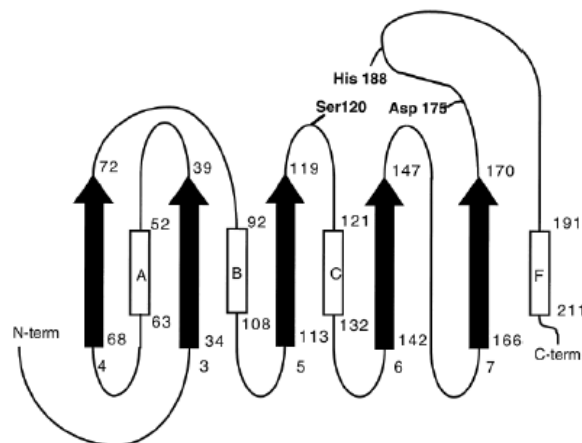


Figura 3. Diagrama del plegamiento α/β de cutinasas. Se indica la triada del sitio activo (Ser120, Asp175 e His188), las cinco cadenas β (fechas negras numeradas del 3-7) y cuatro hélices (marcadas A, B, C y F). Los números en el lado derecho de los elementos de la estructura secundaria señalan el inicio y final de estos elementos (Egmond y de Vlieg, 2000).

1.4 Identificación de los géneros productores de cutinasas

La producción de cutinasas se descubrió primero en hongos fitopatógenos que crecían en medios que únicamente contenían cutina como fuente de carbono (Trail y Koller, 1990) y posteriormente se reportó la producción en otros sistemas

biológicos, como en polen de plantas, bacterias y hongos saprófitos. Algunos de los microorganismos productores se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos productores de cutinasas (Dutta *et al.*, 2009).

Fuente	Género	Especie	Referencia
Hongos	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Trail y Koller, 1993
	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Maeda <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2009
		<i>flavus</i>	Guo <i>et al.</i> , 1996
	<i>Colleotrichum</i>	<i>kahawae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
		<i>gloesporioides</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
		<i>capsici</i>	Hijden
	<i>Fusarium</i>	<i>solani pisi</i>	Martinez <i>et al.</i> , 1992
		<i>oxysporium</i>	Speranza <i>et al.</i> , 2011
		<i>roseum culmorum</i>	Goncalves <i>et al.</i> , 1996
	<i>Monolinia</i>	<i>fruticola</i>	Wang <i>et al.</i> , 2000
<i>Venturia</i>	<i>inequalis</i>	Trail y Koller, 1990	
<i>Glomerella</i>	<i>cingulata</i>	Nyon <i>et al.</i> , 2009 Abu Bakar <i>et al.</i> , 2005	
Bacteria	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008
	<i>Thermomonospora</i>	<i>fusca</i>	Fett <i>et al.</i> , 1999
	<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>	Fett <i>et al.</i> , 2000
	<i>Streptomyces</i>	<i>scabies</i>	Lin y Kolattukudy, 1980 ^a
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Sebastian y Kolattukudy, 1988
		<i>mendocina</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
Polen	<i>Tropaelum</i>	<i>majus</i>	Maiti <i>et al.</i> , 1979
	<i>Brassica</i>	<i>napus</i>	Hiscock <i>et al.</i> , 1994

La producción de cutinasas está influida por el tipo y la concentración de fuente de carbono y nitrógeno, el pH del medio, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto. Aunque la mayoría de las cutinasas microbianas se producen por cultivo sumergido, también se han reportado en fermentaciones en estado sólido (Speranza *et al.*, 2011). Además se ha observado que los alcoholes primarios *n*-alifáticos de 14 o más átomos de carbono también son buenos inductores de este tipo de enzimas (Lin y Kolattukudy 1980^a).

Por otro lado, se han realizado estudios sobre la producción de cutinasas con otros sustratos como aceite de soya, de oliva, de girasol y de palma. Pio y Macedo (2007)

observaron un alto nivel de actividad enzimática de *Fusarium oxysporum* tras 48 h de fermentación utilizando aceite de linaza como fuente de carbono, y de la misma manera se han obtenido resultados favorables con el uso de cutículas de jitomate y papa en la producción de cutinasas (Fett *et al.*, 2000). Dado que en muchos casos estos componentes se consideran desechos agrícolas, representan un buen potencial como inductores de bajo costo para la producción comercial de cutinasas microbianas (Dutta *et al.*, 2009).

1.5 *Aspergillus nidulans*

Es un hongo ascomiceto que se caracteriza por la presencia de cuatro estadios bien definidos: crecimiento vegetativo (germinación de una espora), reproducción asexual (conidias), reproducción sexual (ascoesporas) y el ciclo parasexual (Figura 4); pertenece a la clase *Eurotiomycetes* y al orden Eurotiales (Rittenour *et al.*, 2009). En 2005 la secuencia del genoma de *A. nidulans* se publicó junto con el de *A. fumigatus* y *A. oryzae* (Galagan *et al.*, 2005). La publicación simultánea de estos tres genomas colocó al género *Aspergillus* como líder en los estudios genómicos comparativos y, específicamente, a *A. nidulans* como organismo modelo en diversos estudios.

Tiene un crecimiento rápido como hongo filamentoso en medio sólido o líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales.

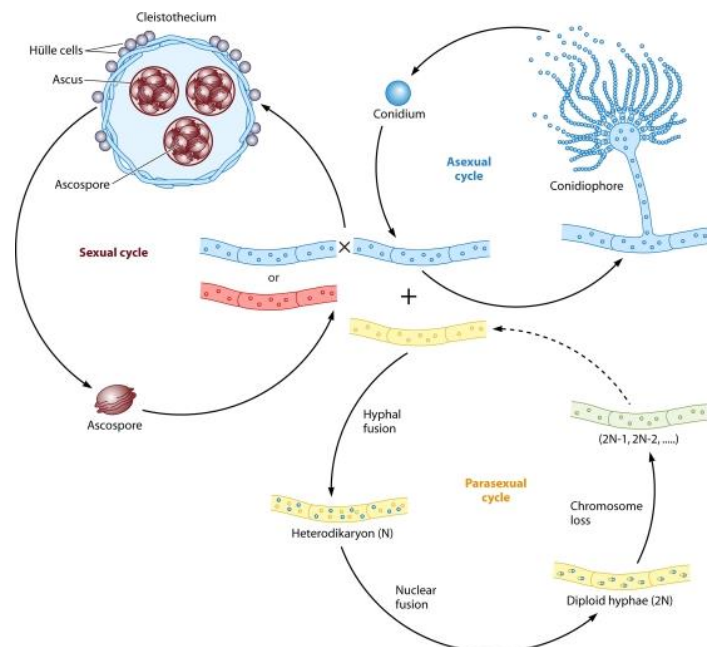


Figura 4. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. (Lee *et al.*, 2010).

1.6 Mecanismos naturales de regulación en los hongos

Los hongos filamentosos son de naturaleza ubicua y se encuentran comúnmente en bosques y plantas en descomposición, así como en el suelo. Sus características saprófitas son ecológicamente importantes ya que desempeñan un papel crucial en el reciclaje de carbono y nitrógeno de la naturaleza, además de ser componentes importantes del ecosistema (Hagiwara *et al.*, 2016).

Debido a la complejidad de estructura de la biomasa vegetal y los hábitats donde se encuentran, los hongos deben hacer frente a varios factores de estrés abiótico y biótico, incluida las temperaturas extremas, sequía, escasez nutrimental, limitación de oxígeno, radiación ultravioleta (UV) y estrés oxidativo. Por lo tanto, los hongos han desarrollado mecanismos para detectar y responder a condiciones extremas, con el fin de sobrevivir en su entorno desarrollando diferentes estrategias, ya que necesitan un amplio conjunto de enzimas degradadoras, así como vías metabólicas diversificadas, que están bajo el control de numerosos reguladores propios de los hongos (Benocci *et al.*, 2017). Algunos de estos sistemas regulatorios se mencionan a continuación:

1.6.1 Nutrición y metabolismo del carbono

Las fuentes de carbono son de gran importancia para los hongos, ya que proporcionan el carbono necesario para la biosíntesis de diversos constituyentes celulares tales como carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Los hongos pueden utilizar diversos compuestos como fuente de carbono y energía.

Los tipos de compuestos de carbono que se pueden usar varían desde moléculas pequeñas y simples como monosacáridos, ácidos orgánicos y alcoholes hasta compuestos más grandes como proteínas, polisacáridos y lípidos (Barnett, 1976, 1981). De todos ellos la glucosa representa la fuente de carbono más accesible y más utilizada, seguida de la fructosa, manosa y galactosa (Deacon, 1984; Garraway y Evans, 1984).

La capacidad de los hongos para usar una fuente de carbono particular depende de que posea la maquinaria necesaria para el transporte y/o para atravesar intacta la membrana celular (Barnett, 1976; Stewart y Russell, 1983). Hay tres tipos básicos de sistemas de transporte para la acumulación de metabolitos: difusión simple o física, difusión facilitada y transporte activo (Jennings, 1984; Fiechter *et al.*, 1981; Cooper, 1982). *Aspergillus nidulans* posee un transporte activo constitutivo para D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa. La D-fructosa es transportada por un sistema altamente específico y, aunque la D-glucosa podría competir con la captación de D-galactosa y viceversa, los sistemas de transporte para estos dos azúcares son marcadamente distintos (Mark y Romano, 1971).

También una amplia gama de hongos puede utilizar hidrocarburos (utilización de n-alcanos y ácidos grasos) como únicas fuentes de carbono y energía y, muchos se pueden oxidar sin apoyar su crecimiento. A diferencia de las bacterias, los hongos producen cambios relativamente menores en los hidrocarburos aromáticos, generalmente modificando sólo los sustituyentes del anillo o hidrolizándolos (Cerniglia, 1984).

Por último, muchos hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*, pueden crecer en un medio químicamente definido. Hay una serie de ejemplos bien documentados, en donde se ha encontrado la regulación de una o varias enzimas en una vía, mediante el empleo de enfoques genéticos, bioquímicos y moleculares. Se han encontrado mecanismos de control específicos de genes o vías, como la inducción y la represión, así como reguladores globales que operan a nivel transcripcional (Hoffmeister, 2016). Por ejemplo: en *Uromyces fabae*, el factor de transcripción Hxt1p se expresa solo en la haustoria (extremo de la hifa) (Voegelé *et al.*, 2001), mientras que en *A. nidulans*, HxtA se expresa durante el desarrollo sexual (Wei *et al.*, 2004). Además en *A. nidulans*, dos proteínas transportadoras de glucosa de alta resolución, SorA y MstC, que muestran 90% de identidad de aminoácidos y aparentemente tienen la misma función, son expresados en diferentes momentos y en diferentes tejidos: *sorA* se expresa temprano en la

germinación de conidios y está sujeta a la represión de catabolitos de carbono, mientras que *mstC* se expresa en micelios más viejos en condiciones de inanición de carbono (Forment *et al.*, 2014).

1.6.2 Metabolismo del nitrógeno

Los hongos filamentosos pueden adaptar su metabolismo para utilizar una amplia gama de nutrientes nitrogenados. Para asegurar una utilización eficiente del nitrógeno, un sistema regulatorio complejo controla la expresión de los genes requeridos para la absorción de fuente de nitrógeno y su degradación metabólica, así como la asimilación celular a través de procesos biosintéticos.

La regulación de la expresión génica metabólica del nitrógeno en hongos filamentosos se ha estudiado intensamente durante más de medio siglo (Caddick, 2004; Chang y Todd, 2004; Marzluf, 1997; Wong *et al.*, 2008). Generalmente, los genes para la captación y el catabolismo de nutrientes nitrogenados específicos, se inducen en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, cuando un nutriente preferido o más fácilmente metabolizado como el amonio o la glutamina está disponible, los genes para la captación y el metabolismo de nutrientes nitrogenados alternativos no se expresan. Este proceso se conoce como represión de metabolitos de nitrógeno (RMN) (Arst y Cove, 1973).

La RMN es relevante por la acción de ortólogos en la actuación global positiva de *Aspergillus nidulans* por el factor de transcripción AreA que pertenece a la familia de transcripción GATA, en promotores del gen metabólico del nitrógeno. AreA también se une a los promotores y/o activa la expresión de ciertos genes secundarios del metabolismo en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno (Chang *et al.*, 2000; Kim y Woloshuk 2008; Mihlan *et al.*, 2003; Tudzynski *et al.*, 1999).

Se ha descrito una respuesta transcripcional a los cambios en la disponibilidad de nutrientes de nitrógeno para varios patógenos de plantas y humanos, y se piensa que la adaptación del metabolismo a la disponibilidad de nutrientes nitrogenados es importante para la virulencia (Coleman *et al.*, 1997; Donofrio *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Lopez-Berges *et al.*, 2010a, b).

Los genes metabólicos del nitrógeno generalmente comparten un regulador global conservado, el factor de transcripción AreA (familia GATA), que típicamente activa la transcripción de genes en ausencia de los nutrientes de nitrógeno preferentemente de amonio o glutamina (Arst y Cove, 1973; Kudla *et al.*, 1990).

Hay varios ejemplos de reguladores de nitrógeno específicos (Tabla 3) y bien caracterizados en *A. nidulans*, por ejemplo AmdR (catabolismo de ω -aminoácidos y lactama), NirA (utilización de nitrato y nitrito), ArcA (utilización de arginina), PrnA (utilización de prolina) y UaY (utilización de ácido úrico) (Andrianopoulos & Hynes, 1990; Burger *et al.*, 1991; Empel *et al.*, 2001; Pokorska *et al.*, 2000; Suarez *et al.*, 1995).

Tabla 3. Factores de transcripción para ortólogos de nitrógeno en hongos filamentosos.

Factores de Transcripción				Descripción		Referencia
<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>F. fujikuroi</i>	<i>M. oryzae</i>	Clase de Factor de Transcripción	Función Primaria	
AreA	NIT2	AreA	NUT1	Dedo de zinc GATA	Activador de unión a ADN	Arst y Cove, 1973; Kudla <i>et al.</i> , 1990.
AreB	ASD4	AreB	Asd4	Dedo de zinc GATA, cremallera de leucina	Represor o activador de unión a ADN	Tollervey y Arts 1982.
NmrA	NMR1	Nmr1	Nmr1, Nmr2, Nmr3	Familia Tipo NmrA	Correpresor	Andrianopoulos <i>et al.</i> , 1998; Schönig <i>et al.</i> , 2008.
MeaB	NC	MeaB	NC	bZIP	Activador de unión a ADN	Arts y Bailey, 1980.
TamA	NC	NC	NC	Zn(II) ₂ Cys ₆	Función doble: Represor/Activador de unión a ADN	Arst <i>et al.</i> , 1982; Kinghorn y Pateman 1975.

NC: No caracterizado

1.6.3 Estrés oxidativo

Para sobrevivir a los cambios repentinos y potencialmente letales en su entorno, los hongos filamentosos deben sentir y responder a una amplia gama de tensiones, incluido el estrés oxidativo. La generación de especies reactivas de oxígeno, o ROS, es un aspecto inevitable de la existencia en condiciones aeróbicas.

Los hongos filamentosos han desarrollado así respuestas complejas y sofisticadas para evadir la muerte por oxidación. Varios pasos son determinantes en estas respuestas, incluida la activación de reguladores transcripcionales (Tabla 4) implicados en el control de la maquinaria antioxidante (Montibus *et al.*, 2015). Por ejemplo, el factor transcripcional SakA de *A. nidulans* es homólogo de Hog1. El gen *sakA* de *A. nidulans* no es esencial para la supervivencia bajo estrés hiperosmótico, pero los mutantes *sakA* tienen defectos de crecimiento modestos en medio de alta osmolaridad (Kawasaki *et al.*, 2002). Los mutantes son más sensibles al H₂O₂ y la exposición a altas temperaturas (50 °C). SakA se fosforila y activa en conidiosporas, pero se desfosforila durante la germinación (Lara-Rojas *et al.*, 2011). También se demostró que SakA interactúa física y funcionalmente con el factor de transcripción AtfA. Mientras que AtfA se localiza permanentemente en el núcleo, SakA se somete a importación nuclear bajo condiciones de estrés oxidativo y osmótico.

Además, las ROS también pueden actuar como moléculas de señalización en cascadas que conducen a modulaciones de expresión génica y posterior adaptación.

Uno de los primeros hallazgos fue que casi todos los componentes de señalización de estrés identificados en las levaduras están codificados en los genomas de hongos filamentosos. Los estudios comparativos de genómica han demostrado que los hongos filamentosos tienen vías de señalización de rapamicina (TOR) y de proteína quinasa A (PKA), cascadas de proteína quinasa activadas por mitógenos y señalización de calcineurina, así como maquinaria de señalización río arriba

(receptores acoplados a proteína G, G-subunidades proteicas y sistema de señalización de dos componentes (TCS)) (Hagiwara *et al.*, 2016).

También en hongos filamentosos existen señales que son transmitidas por módulos conservados de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) que están involucradas en la respuesta a varios estímulos, a menudo transmiten señales de los receptores de la superficie celular al núcleo y se sabe que *A. nidulans* tiene una MAPK adicional en homología con SakA/Hog1, MpkC, que se conserva en el género *Aspergillus* (May, 2007).

Tabla 4. Factores de transcripción para ortólogos de estrés oxidativo en hongos filamentosos.

Factores de transcripción			Descripción		Referencia
<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>C. neoformans</i>	Clase de Factor de Transcripción	Función Primaria	
SakA, AtfA	NC	NC	Cremallera de leucina	Activador de unión a ADN	Du <i>et al.</i> , 2006; May, 2007.
Hog1	Hog1	Hog1	Dedo de zinc	Represor o activador de unión a ADN	Bahn <i>et al.</i> , 2005; May, 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2002.
MpkA, MpkC	NC	Mpk1	Dedo de zinc	Función doble: Represor/ Activador de unión a ADN	Bahn <i>et al.</i> , 2006; Gerik <i>et al.</i> , 2008.
NC	OS-2	NC	Dedo de zinc	Represor de unión a ADN	Lamb <i>et al.</i> , 2012; Vitalini <i>et al.</i> , 2007.

NC: No caracterizado

1.7 Factores que afectan la producción de cutinasas

Se sabe que la producción de cutinasas es afectada por diversos factores como concentración y tipo de nutrientes, así como condiciones de crecimiento del microorganismo (temperatura, pH, velocidad de agitación, estrés oxidativo, etc.) y que responden a diferentes nutrientes (C, N) (Castro-Ochoa *et al.*, 2010). Estas enzimas son inducidas por la presencia de cutina, monómeros de cutina o análogos de éstos en el medio de cultivo (Lin y Kolattukudy, 1978; Purdy y Kolattukudy, 1975). Sin embargo, una de las principales desventajas del empleo de cutina como inductor de cutinasas es el alto consumo de tiempo y bajo rendimiento del proceso de producción de la misma, por lo que se han buscado alternativas a su uso en la producción de cutinasas (Pio y Macedo, 2007). Se han explorado varias fuentes de carbono como glúcidos, ácidos grasos, aceites, así como fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas y se ha observado que la adición de glucosa al medio de cultivo inhibe la producción de las cutinasas (Farah *et al.*, 2005; Lin y Kolattukudy, 1978; Fett *et al.*, 1999).

Otro factor es el desafío ambiental, al cual todos los organismos que crecen aeróbicamente deben adaptarse, incluyendo los hongos, es la exposición a las especies reactivas de oxígeno (ERO) causadas por formas parcialmente reducidas de oxígeno molecular (Figura 5) y hacer frente a la interacción anfitrión-patógeno (Kroll *et al.*, 2013).

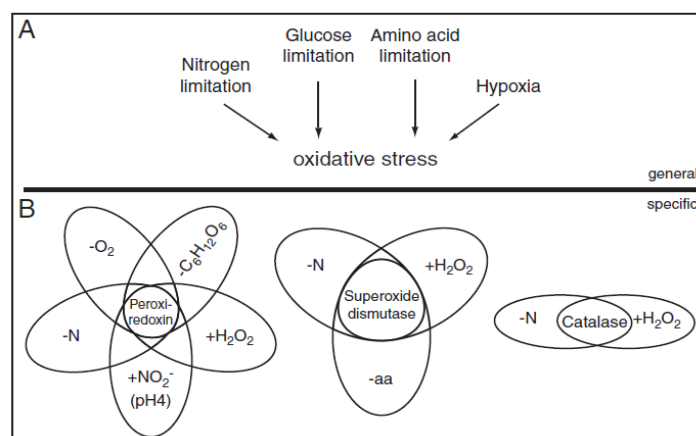


Figura 5. Inducción de enzimas asociadas al estrés oxidativo en diferentes condiciones de crecimiento. A. Diversas condiciones de estrés, incluyendo la limitación de nutrientes, la hipoxia y el estrés nitroso provocan la respuesta al estrés oxidativo como una reacción general. B. La comparación de un gran subconjunto de estudios proteómicos reveló que las proteínas antioxidantes específicas, como las peroxiredoxinas, las superóxido dismutasas y las catalasas, forman parte de la respuesta general al estrés. (-) significa la limitación de oxígeno (O₂), glucosa (C₆H₁₂O₆), nitrógeno (N) o aminoácidos (aa). (+) Significa la adición de un compuesto estimulante del estrés tal como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o nitrito a pH 4 (NO₂⁻). Tomada de Kroll, *et al.*, 2013.

Además, debido a su vida sésil los hongos han desarrollado en el curso de la evolución mecanismos que le confieren resistencia a ambientes adversos, así como respuestas sofisticadas a tensiones ambientales. En el caso de hongos patógenos de plantas, ha aumentado significativamente en las últimas dos décadas el conocimiento sobre la respuesta a estrés (Gostincar *et al.*, 2010).

1.7.1 Especies reactivas de Oxígeno (ERO)

Aunque el oxígeno (O_2) es esencial para la vida aeróbica; a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones llega a ser tóxico, los organismos aerobios utilizan al oxígeno como aceptor final de electrones durante la respiración. En este proceso metabólico las células producen especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son especies del oxígeno (O_2) reducidas parcialmente (Figura 6).

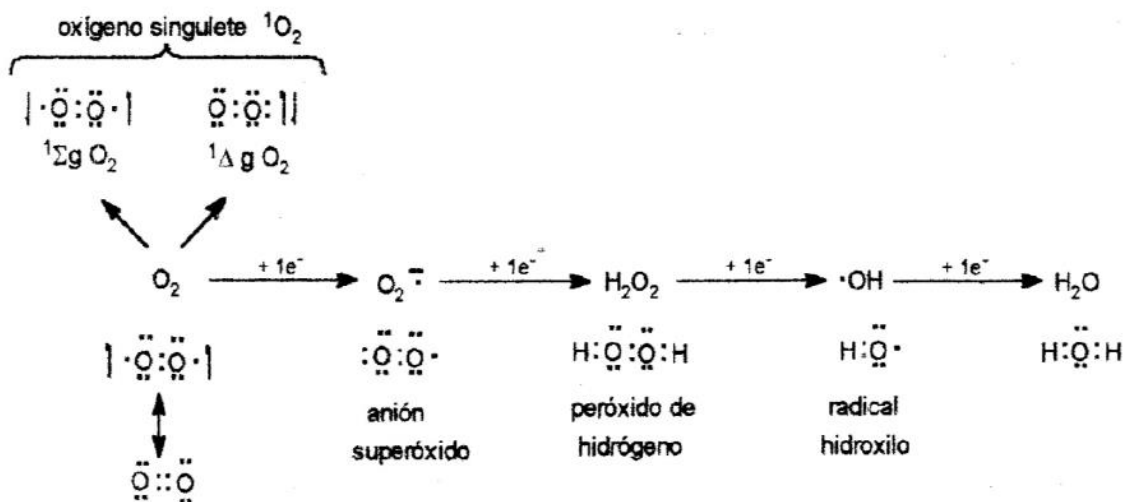


Figura 6. Generación de ERO (Bowler y Crapo, 2002).

La adición de un electrón a la molécula de oxígeno produce el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), este puede sufrir una segunda reducción para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que la adición de un tercer electrón da lugar al radical hidroxilo (HO^{\cdot}). El HO^{\cdot} es el más reactivo de las ERO y su alta constante de velocidad de reacción ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) sugiere que reacciona en el lugar donde se produce y prácticamente con cualquier compuesto (Halliwell, 1999). Estos tres productos intermedios se denominan especies reactivas del oxígeno (ERO) debido a su facilidad para reaccionar con biomoléculas como las proteínas, los lípidos y el ADN.

El oxígeno en singulete es otra ERO que se forma por la inversión en el spin de uno de los electrones desapareados de la molécula de oxígeno.

Existen dos formas del oxígeno singulete: la sigma (Σ) que es un radical libre, debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos $2\pi^*$ (cada electrón en un orbital), la diferencia radica en que un electrón tiene giro paralelo y otro electrón tiene giro antiparalelo, y la delta (Δ), la cual también posee dos electrones, aunque en este caso se encuentran apareados en un solo orbital $2\pi^*$, por lo que no es un radical libre (no posee ningún electrón desapareado) (Hansberg, 2002).

1.7.2 Estrés Oxidativo (EO)

El estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular (Ames *et al.*, 1993).

Mantener el control de los niveles de las especies reactivas permite que, a condiciones bajas y moderadas, estas moléculas sean benéficas para los procesos celulares (Burns, 2003).

1.7.3 Mecanismos antioxidantes

La principal defensa de los organismos aerobios contra las ERO está constituida por los antioxidantes, los cuales pueden subdividirse en dos categorías: enzimáticos y no enzimáticos. Entre los sistemas no enzimáticos se encuentran los compuestos antipropagadores, los cuales reaccionan directamente con los agentes oxidantes, como por ejemplo la vitamina C y E, el β -caroteno, el ácido úrico, los fenoles, furfurales, las furanonas y algunos pigmentos tales como los carotenoides, y las melaninas varios de estos presentes en los hongos (Davies, 2000).

Entre los sistemas enzimáticos encontramos a las superóxidos dismutasas (SODs), las catalasas, las peroxidasas de glutatión, las S-transferasas de glutatión, las tioredoxinas y las peroxirredoxinas (Davies, 2000).

Los mecanismos antioxidantes no actúan de forma aislada, sino al parecer lo hacen de manera cooperativa y tienden a presentarse en forma de reacciones secuenciales (Kamata y Hirata, 1999).

1.8 Aplicación de cutinasas

En años recientes, la actividad esterolítica de las cutinasas ha sido ampliamente explorada. Carvalho y colaboradores (1999) discuten a detalle las reacciones de biocatálisis que pueden llevar a cabo las cutinasas. *In vitro* las cutinasas despliegan actividad hidrolítica hacia una amplia variedad de ésteres, desde ésteres sintéticos solubles (e.g., p-nitrofenil ésteres) a triglicéridos de cadena larga insolubles (Flipsen *et al.*, 1996; Gonçalves *et al.*, 1999). Además en medios no acuosos o de baja actividad de agua, pueden catalizar reacciones de síntesis como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos.

Estas reacciones de hidrólisis y síntesis tienen un uso potencial en la industria de alimentos, en la de lácteos para la hidrólisis de grasa de leche, en la industria de detergentes y oleoquímica, en la síntesis de triglicéridos estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, y en la producción de biodiesel, entre otras aplicaciones (Carvalho *et al.*, 1997) como se detalla a continuación.

1.8.1 Alimentos

Modificación de grasa y aceites: Las grasas y aceites son constituyentes importantes de los alimentos. El valor nutricional, sensorial y las propiedades físicas de un triglicérido son influenciados enormemente por factores tales como la posición estereoespecífica del ácido graso en el glicerol, el largo de cadena del ácido graso, y su grado de insaturación (Sharma *et al.*, 2001). La estructura básica de grasas y aceites puede ser modificada de diferentes maneras: modificación química del ácido

graso (hidrogenación), ruptura del enlace éster (hidrólisis), y reorganización de ácidos grasos en la cadena principal del triglicérido (interesterificación) (Pio y Macedo, 2009).

La transesterificación de grasas y aceites, así como la esterificación selectiva de alcoholes, se puede obtener empleando cutinasas en bajas actividades de agua (Carvalho *et al.*, 1999).

Síntesis de aromas: los ésteres de ácidos grasos son componentes importantes de aromas naturales usados en la industria de los alimentos. Por ejemplo, etil butirato e isoamil acetato son compuestos encontrados en el aroma de fresas y plátanos, respectivamente (Langrand *et al.*, 1988).

Estos ésteres son obtenidos tradicionalmente por extracción de fuentes naturales, fermentación o síntesis química (Welsh *et al.*, 1989). Sin embargo, estos métodos suelen ser costosos o de bajo rendimiento. Con el creciente interés por los productos “naturales”, la industria del sabor está cada vez más interesada en el empleo de la biotecnología para la producción de estos compuestos, particularmente por métodos enzimáticos.

La cutinasa recombinante de *F. solani pisi* fue empleada para catalizar la reacción de transesterificación de butil acetato con hexanol para la obtención de hexil acetato, un éster de cadena corta con aroma frutal. El empleo de cutinasas en reacciones de transesterificación de etanol y ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) en medio orgánico también ha sido estudiada (Barros *et al.*, 2007).

Lipofilización de antioxidantes naturales: los antioxidantes en alimentos retardan la rancidez causada por oxidación atmosférica protegiendo así a los lípidos y los compuestos liposolubles como vitaminas o carotenoides.

Muchos compuestos han sido usados como antioxidantes en alimentos, principalmente sustancias fenólicas artificiales como el butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), los cuales se ha reportado pueden producir carcinogénesis. Por ello ha habido un gran interés por el uso de antioxidantes naturales. Los ácidos fenólicos son antioxidantes naturales que están presentes en

frutas, vegetales, hierbas aromáticas y especias. Los ácidos fenólicos (ferúlico, caféico, cumárico, etc.) generalmente son solubles en agua, por lo que su carácter hidrofílico reduce su efectividad en la estabilización de grasas y aceites (Stamatis *et al.*, 1999).

La esterificación química y enzimática de compuestos fenólicos ha sido reportada por diversos autores (Peña-Montes *et al.*, 2009). Stamatis *et al.* (2001) estudiaron la esterificación enzimática de antioxidantes fenólicos naturales como los derivados del ácido benzoico y cinámico con alcoholes alifáticos, monosacáridos y alquilglucósidos empleando varias lipasas, estererasas y cutinasas en medios no acuosos.

1.8.2 Detergentes

La fabricación de detergentes biológicos es una tecnología en rápido crecimiento. Las lipasas, proteasas, amilasas y celulasas son enzimas que se añaden a las formulaciones de detergentes para la remoción de grasas, proteínas, carbohidratos, etc. (Sharma *et al.*, 2001). El uso de cutinasas en formulaciones de detergentes para lavandería y lavaplatos ha sido evaluado (Kolattukudy *et al.*, 1991; Flipsen *et al.*, 1998). La cutinasa presentó algunas ventajas en comparación con la lipasa comercial (Lipolase™) en la remoción de triacilgliceroles en un solo proceso de lavado, así como en la hidrólisis de grasas en ausencia de calcio (Flipsen *et al.*, 1998).

1.8.3 Degradación de contaminantes

Insecticidas: el malatión es un insecticida y acaricida organofosforado sintético utilizado para el control de insectos en campos de cultivo, frutas, vegetales y ganado, y ha sido ampliamente usado como sustituto del DDT (Kim *et al.*, 2005; Rettich, 1980). Éste, o sus residuos expuestos en el ambiente son absorbidos rápidamente por prácticamente todas las rutas incluyendo el aparato gastrointestinal, la piel, las membranas mucosas y los pulmones (Indeerjeet *et al.*, 1997).

El empleo de cutinasas y estererasas en la degradación de malatión ha sido evaluado. Kim *et al.* (2005) reportaron que la cutinasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*

degradó 50 y 60% de la cantidad inicial de malatión en 15 y 30 minutos de reacción, respectivamente.

Polímeros sintéticos: Los polímeros son de gran importancia y su producción ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, el excesivo consumo de plásticos sintéticos derivados del petróleo ha tenido un impacto adverso en el medio ambiente debido a que la mayoría de estos plásticos sintéticos no se degrada en el ambiente (Huang, 1995). Por esta razón, el desarrollo de polímeros o compuestos biodegradables, se presenta como una solución a la conservación del medio ambiente y al impulso de nuevas aplicaciones.

Las cutinasas son enzimas capaces de hidrolizar una amplia variedad de ésteres sintéticos; la degradación de plásticos biodegradables ha sido reportada para las cutinasas de los microorganismos *F. solani f. sp. pisi*, *Pseudozyma jejuensis sp. nov.*, *Aspergillus oryzae* y *Cryptococcus sp.* (Murphy *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2005 y Masaki *et al.*, 2005).

1.8.4 Producción de biodiesel

El biodiesel es un combustible renovable, biodegradable y no tóxico que se obtiene principalmente a partir de aceites vegetales o grasa animal mediante el proceso de transesterificación. Químicamente se describe como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena corta o larga (Jeong y Park, 2008). Se obtiene por transformación de triacilglicerol en alquil ésteres de ácido graso en presencia de un alcohol (Vasudevan y Briggs, 2008; Jeong y Park, 2008). A la fecha se han desarrollado varios procesos para la producción de biodiesel empleando ácidos, álcalis o enzimas como catalizadores de la reacción de transesterificación.

Se han reportado diversos estudios empleando enzimas lipolíticas, principalmente lipasas en reacciones de transesterificación para la producción de biodiesel (Jeong y Park, 2008). Sin embargo, las reacciones de transesterificación también se han evaluado usando esterases y cutinasas empleando varios sistemas (Cambou y Klibanov, 1984).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cutinasas reportadas en el genoma de *A. nidulans*

Los microorganismos saprofiticos producen una amplia gama de enzimas hidrolíticas. El genoma de *Aspergillus nidulans* tiene un tamaño aproximado de 30.07 Mpb organizado en ocho cromosomas con 10,560 genes y presenta numerosos genes que codifican para diferentes hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (CEH). Se han reportado 60 carboxilesterasas dentro de las cuales destacan 4 cutinasas putativas, denominadas ANCUT 1-4, (Galagan *et al.*, 2005).

2.2 Investigaciones del grupo de trabajo

Considerando la importancia y el potencial de aplicación de las enzimas CEH en diferentes áreas de biotecnología, en el grupo de trabajo se inició una línea de investigación para buscar la producción de estas enzimas, los estudios se enfocaron en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, un microorganismo modelo de investigación.

Estudios previos en el grupo de trabajo mostraron que la cepa de *A. nidulans* PW1 produce enzimas con actividad carboxilesterasa cuando se emplea aceite de olivo como inductor en el medio de cultivo, se encontró una proteasa con actividad promiscua tipo esterasa (PrtA) de 37 kDa (Peña-Montes *et al.*, 2008), y otra banda de 29 kDa con actividad esterasa que se identificó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), que corresponde a la cutinasa producto del gen AN7541.2, nombrada ANCUT2 (Castro-Ochoa *et al.*, 2012).

Estudios posteriores se centraron en analizar las características estructurales de la AN7541.2 y en la optimización de sus condiciones de producción (Castro-Ochoa *et al.*, 2012), así como en la caracterización bioquímica (pH y temperatura óptimos) y aplicación de la enzima libre e inmovilizada (Vergara-Barroso, 2010). Entre las fuentes de carbono ensayadas para optimizar la producción de la AN7541.2, Castro-Ochoa realizó fermentaciones con cutina (extraída de cáscara de manzana) al suponerse como el sustrato natural de este tipo de enzimas. Se realizaron geles de actividad esterolítica de los extractos crudos de estas fermentaciones y se observó una sola banda de peso molecular menor, en lugar de la banda esperada de 29 kDa correspondiente a la AN7541.2.

Este hallazgo derivó en optimizar las condiciones de producción, utilizando como fuente de carbono e inductor a la cutina de manzana, por LC-MS/MS se identificó una enzima de 22 kDa que corresponde a la cutinasa AN5309.2, nombrada ANCUT1, reportada en el genoma de *A. nidulans* PW1 (Esqueda-Domínguez, 2012).

A partir de la identificación de estas dos cutinasas, se purificaron y caracterizaron bioquímicamente, siendo ambas muy semejantes, salvo que ANCUT1 no hidroliza la cutina, en comparación con la ANCUT2:

Tabla 5. Parámetros bioquímicos de las cutinasas ANCUT1 y 2 de *A. nidulans* PW1.

Enzima	Temperatura óptima de ensayo	pH óptimo de ensayo	Estabilidad		Preferencia en largo de cadena	Hidrólisis de cutina	Referencia
			T (°C)	pH			
ANCUT1	60°C	9	>80% a 60°C 1h	Por 3h a pH 10	Cadena corta	No hidroliza	Vega, 2013.
ANCUT2	60°C	9-10	>80% a 60°C 1h	Por 3h a pH 10	Cadena corta y larga (16 y 18C)	Sí hidroliza	Bermúdez, 2013.

Posteriormente, Bermúdez (2018) mediante qPCR detectó la expresión a nivel transcripcional del gen de la cutinasa ANCUT3 en diferentes medios que utilizan fuentes de carbono de origen lipídico, pero no se ha observado respuesta a nivel transcripcional de ANCUT4 frente a estas mismas fuentes, sin embargo, su secuencia rio arriba reveló sitios de unión de factores de transcripción para elementos regulatorios en condiciones de estrés oxidativo (Tabla 6). Por tanto, su expresión podría estar regulada por condiciones de estrés.

Tabla 6. Análisis de sitios de unión de factores de transcripción de EO, para *ancut4*.

Factor	Secuencia de unión	Posiciones	Función
NapA, AtfA	TGCCTCA/ TGGCTCA	-384, -826	Respuesta celular a estrés
CTF-18	CTCTGTT	-616, -652,- 680,-767	Regula elementos de respuesta antioxidante
NF-Y1	GGAATTGG/ GGCATTGG	-28, -124, 238,- 370	Regula respuesta a estrés oxidativo

Hasta este momento no se ha detectado la presencia de las dos enzimas restantes y permanecen como cutinasas hipotéticas, ya que no hay evidencia que las defina

claramente en ningún medio estudiado. En la Tabla 7 se muestra la información recabada sobre estas cuatro enzimas.

Tabla 7. Cutinasas en el genoma de *A. nidulans*.

Gen	Nombre	PM teórico (kDa)	PI teórico	Localización	Descripción	Referencia	Inductor
AN5309.2	ANCUT1	19.80	6.35	Extracelular	Proteína con actividad cutinólítica (22kDa). Purificación y caracterización	Esqueda Katia, (2012). Vega F., (2013).	Cutina
AN7541.2	ANCUT2	20.44	4.90	Extracelular	Proteína con actividad cutinólítica (29kDa). Purificación y caracterización.	Castro-Ochoa, <i>et al.</i> , (2012). Bermúdez (2013).	Aceite de Oliva
AN7180.2	ANCUT3	21.25	5.78	Extracelular	Detección de transcrito.	Bermúdez (2017).	Constitutiva
AN10346.4	ANCUT4	19.90	7.58	Extracelular	Proteína no verificada.	-----	---

Además, en el grupo de trabajo se optimizó la expresión de las dos cutinasas en un sistema heterólogo, utilizando a *Pichia pastoris* como organismo hospedero, se expresaron y caracterizaron bioquímicamente las enzimas ANCUT1 y 2 (Morales, 2015; Solís, 2015), obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 8. Caracterización bioquímica de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2.

Enzima	Parámetros óptimos de reacción				
	Temperatura	pH	Sustratos	Solventes	Referencia
ANCUT1	50°C	9	Ésteres de <i>p</i> -nirófenilo de cadena corta (C2)	Acetona, isopropanol y hexano (30%)	Morales, 2015.
ANCUT2	40°C	9	Ésteres de <i>p</i> -nirófenilo de cadena corta (C2)	DMSO, hexano y acetona (30%)	Solís, 2015.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado la utilidad de las cutinasas para catalizar procesos de interés biotecnológico, por lo que se sigue en la búsqueda de nuevas enzimas de este tipo. En este trabajo se buscará la identificación y las condiciones de producción de la cutinasa ANCUT4 para contribuir al estudio de la regulación de este tipo de enzimas.

4. HIPÓTESIS

La enzima ANCUT4 se expresará bajo condiciones de estrés oxidativo a diferencia de las otras cutinasas codificadas en el genoma.

5. OBJETIVOS

5.1 General

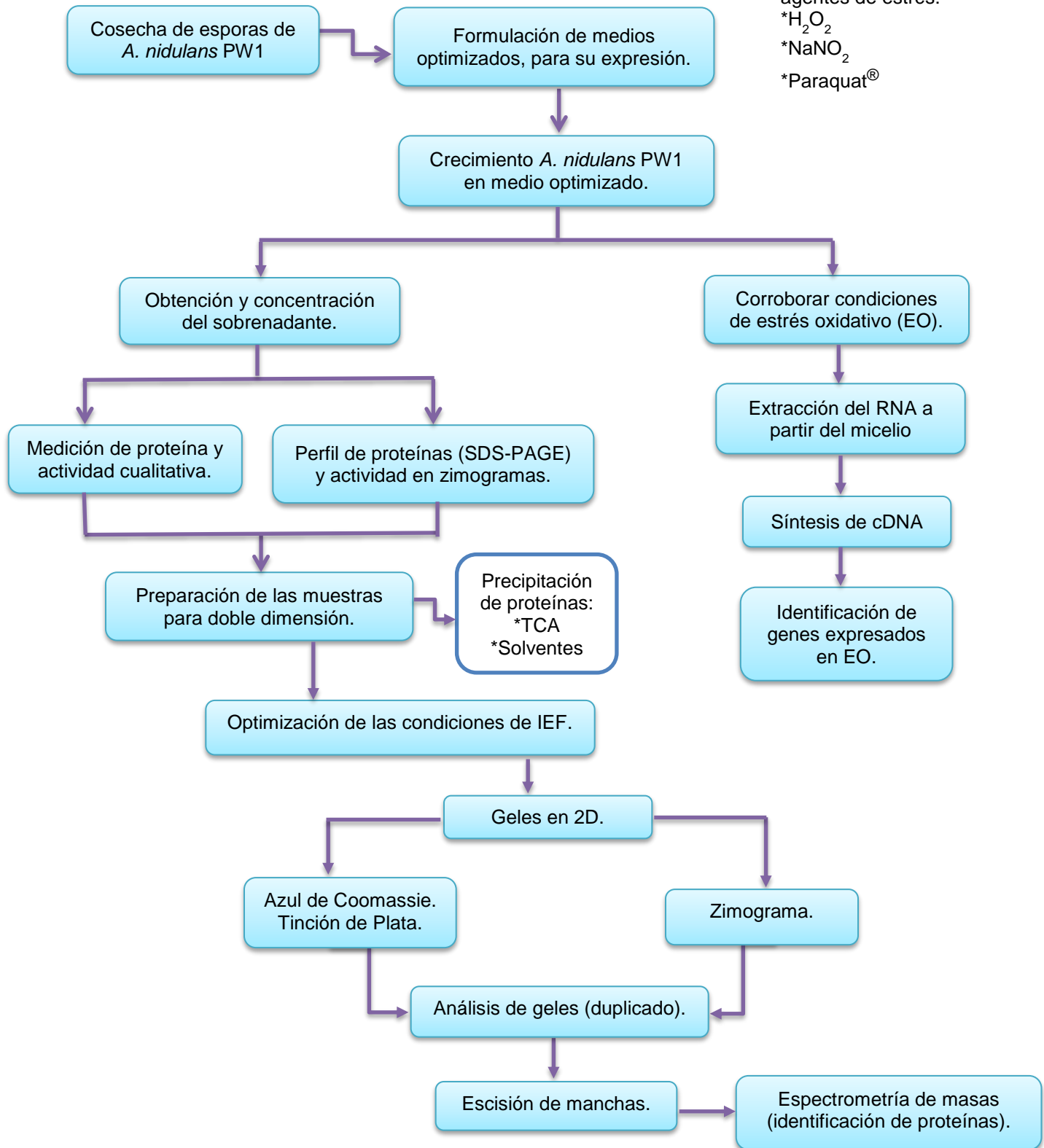
Identificar las condiciones de producción de la cutinasa ANCUT4.

5.2 Particulares

- Identificar la producción de cutinasas de *A. nidulans* bajo condiciones de estrés oxidativo (H_2O_2 , Paraquat®, $NaNO_2$) empleando la glucosa como control.
- Utilizar herramientas de proteómica para la identificación de ANCUT4 basándonos en su punto isoeléctrico (pI).

6. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

6.1 Estrategia experimental



6.2 Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Aspergillus nidulans* PW1 auxótrofa para arginina y no patógena, la cual fue proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Número del FGSC: ATCC®MYA-601™).

6.3 Obtención de cutina

El método desarrollado para la obtención de cutina a partir de muestras de cáscara de frutos de manzana Golden Delicious comprende varios pasos propuestos por Walton y Kolattukudy (1972).

6.4 Cosecha de esporas de *A. nidulans* PW1

Se prepararon 10 cajas Petri con medio mínimo de Käfer, 1977 (Anexo A), a las cuales se les inoculó 50 µL de esporas de *A. nidulans* PW1 y se incubaron durante cinco días a 29 °C (Precision® Gravity). Para cosechar las esporas se agregaron 5 mL de Tween 80 estéril al 0.1% a cada una de las cajas Petri y se rasparon cuidadosamente con una asa micológica; las esporas se recuperaron en un tubo Falcon estéril de 50 mL. Posteriormente, se centrifugó el contenido del tubo durante 20 min a 8500 rpm a 4 °C (Biofuge, Primo R), se desechó el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de agua destilada estéril para nuevamente centrifugar el contenido bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió dos veces y finalmente se resuspendieron las esporas en 5 mL de agua desionizada estéril. Una vez obtenida la solución final, se realizó un conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer (Anexo B) para lo cual se tomaron 990 µL de agua desionizada y 10 µL de la solución de esporas en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se homogenizó y se colocaron 20 µL en cada extremo de la cámara y se realizó el conteo para calcular la concentración y el volumen de solución de esporas a adicionar para futuras inoculaciones con 1×10^6 esporas/mL. Las esporas se almacenaron a 4 °C.

6.5 Formulación de medios en condiciones de estrés oxidativo

Tabla 9. Composición de medios en condiciones de estrés oxidativo en *A. nidulans*.

Compuesto	Agente causante de estrés oxidativo		
	H ₂ O ₂	NaNO ₂	Paraquat®
Concentraciones ensayadas de agente	1,2,3,4 mM	250 y 500 µM	10 µM
Sales 20x	50 mL/L	50 mL/L	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L	1 mL/L	1 mL/L
Arginina	5 mL/L	5 mL/L	5 mL/L
Biotina	500 µL/L	500 µL/L	500 µL/L
Metionina	11 mg/L	11 mg/L	11 mg/L
Glucosa	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura	0.5%	---	0.5%

Al medio de cultivo se le adicionaron los requerimientos nutricionales de la cepa y se midió el pH para ajustarlo a 6.5 con una solución de NaOH 0.1 M y se esterilizó en autoclave (SM300, Yamato) a 121 °C por 15 min. Al término de la esterilización se enfriaron los matraces hasta temperatura ambiente antes de inocular el medio.

6.6 Condiciones de cultivo

Cada uno de los matraces con 50 mL de medio (ver Tabla 9) se inoculó con 1×10^6 esporas/mL de *A. nidulans* PW1. Las fermentaciones se realizaron a temperatura de 37 °C y 300 rpm (Innova® 40, New Brunswick Scientific) de 36 a 48 h dependiendo del agente.

Pasado este tiempo, se adicionó cada agente y se incubó a temperatura de 37 °C y 300 rpm (Innova® 40, New Brunswick Scientific) durante otras 6 h.

6.7 Concentración y precipitación de los extractos crudos

6.7.1 Centrifugación

Se filtraron los matraces al vacío utilizando un papel filtro Whatman No. #1. El extracto crudo se concentró 150X utilizando Centrifugación® con límite de corte de 10 kDa a 300 rpm y 15 min (Thermo IEC) para realizar las pruebas de precipitación, actividad, de proteína y sus respectivas separaciones en geles SDS-PAGE y de doble dimensión.

6.7.2 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

6.7.2.1 Volumen en tubos eppendorf

A 1 mL de muestra se le adicionaron 100 μ L (1/10 volumen) de 100% TCA (p/v). Se mantuvo en hielo por 20 min. Se centrifugó a 14000 rpm por 20 min a 4 °C (Biofuge, Primo R). El sobrenadante se retiró y desechó. El pellet se lavó con 100 μ L de acetona, al adicionar la acetona, se agitó y se centrifugó por 15 min a 14000 rpm a 4 °C. Se retiró y desechó la acetona del pellet, este paso se realizó dos veces más. El pellet se secó completamente (el tubo se dejó abierto en la campana durante 1 min), para evitar la presencia de acetona residual debido a que puede ocasionar que sea más difícil la resuspensión

6.7.2.2 Volumen en matraz Erlenmeyer

Una muestra de 500 mL de extracto crudo se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4 °C (Beckman, J2-MC). El pellet se retiró y desechó. El sobrenadante se filtró en un matraz kitasato con una membrana de filtración de 0.22 μ m. Una vez filtrado el sobrenadante se colocó en un matraz Erlenmeyer de 1 L, se adicionó 50 g de TCA (10% p/v) y se dejó agitando toda la noche (12 h) a una temperatura de 4 °C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C (Beckman, J2-MC). El sobrenadante se retiró y desechó. El pellet se lavó con 3 mL de acetona, al adicionar la acetona, se agitó y se centrifugó por 20 min a 8500 rpm a 4 °C (Biofuge, Primo R). Se retiró y desechó la acetona del pellet, este paso se realizó dos veces más, con 15 min. El pellet se secó completamente (el tubo se dejó abierto en la campana durante 1 min), para evitar la presencia de acetona residual debido a que puede ocasionar que sea más difícil la resuspensión.

6.7.3 Precipitación de proteína con solvente

Se preparó un stock de DTT 1 M a partir del cual se obtuvo una concentración final de 60 mM de DTT en acetona. Posteriormente se añadieron 6 mL de acetona-DTT a cada extracto concentrado y se dejó precipitar en tubos Falcon a -20 °C por 2 h. Después se pasaron 1.5 mL a tubos Eppendorf y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min (Biofuge, Primo R), lo anterior se repitió hasta acabar el volumen de 6 mL, retirando con cuidado el solvente, sin tocar el pellet. Se dejó secar el pellet en campana por aproximadamente 1 min hasta evaporar la acetona.

6.8 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

6.8.1 Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína

6.8.1.1 Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca

Se realizaron ensayos en microplaca utilizando soluciones de acetato de α -naftilo como sustrato (*Solución A*) y Fast Red como revelador (*Solución B*). En cada pozo de la microplaca se adicionó 50 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2, el cual sirvió de blanco. Se tomaron 50 μ L de muestra de extracto y se adicionaron a los pozos siguientes. Al blanco y a las muestras se les adicionaron 50 μ L de la solución de α -naftil acetato y se dejó incubar por 15 min a 37 °C (Estufa estática, BG). Posteriormente se agregaron 50 μ L de la solución de Fast Red a cada pozo y se observó la aparición de un color rojo, cuya intensidad depende de que haya actividad de esterasa en las muestras tomadas.

Preparación de las soluciones A y B:

- *Solución A*: se pesaron 2 mg de acetato de α -naftilo, se disolvieron en 500 μ L de acetona y se llevaron a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2.
- *Solución B*: se pesaron 8 mg de Fast Red, se agregaron 250 μ L de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2.

6.8.1.2 Cuantificación de proteína en microplaca

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford, cuya sensibilidad es de 1-100 μ g (Lee y Whiteley, 2006). El volumen final de reacción fue de 200 μ L. Se colocaron en la microplaca 160 μ L de muestra, 40 μ L del reactivo de Bradford (Bio-Rad) y un blanco con 160 μ L de agua desionizada y 40 μ L de dicho reactivo. Todo se mezcló perfectamente y se incubó 5 min a temperatura ambiente. El color generado se cuantificó en el lector de microplacas Epoch (Biotek) utilizando el software Gen5 1.10, a una absorbancia de 595 nm. Dependiendo de la cantidad de proteína presente, se realizaron las diluciones pertinentes para que la lectura de absorbancia entrara en un rango confiable de una curva estándar, realizada con albumina sérica (Anexo C).

6.8.2 Preparación del perfil de proteínas y zimogramas

6.8.2.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Utilizando como detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y como agente reductor el β -mercaptoetanol, siguiendo el método de Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 14%. Las muestras de extracto se suspendieron en buffer de carga y se calentaron a 95 °C durante 5 min para desnaturalizar a las proteínas. Como referencia se utilizó un marcador de bajo peso molecular (10 a 250 kDa de Bio-Rad). Los geles se corrieron con un buffer de corrida 1X en una cámara de electroforesis (MiniProtean II, Bio-Rad) inicialmente a 80 V; después de 30 min, el voltaje se subió a 120 V a 4 °C.

6.8.2.2 Tinción con plata

El perfil de proteína de la muestra se evidenció con la técnica de tinción con plata, la cual consistió en que los geles se dejaron en una solución con 10% de metanol y 12% de ácido acético (solución fijadora) durante toda una noche. Pasado este tiempo se realizaron 2 lavados con etanol al 20% durante 10 min cada uno, después se hicieron 2 lavados con agua desionizada durante 10 min cada uno y se realizó un lavado con tiosulfato de sodio pentahidratado 0.8 mM durante 1 min. Posteriormente se agregó la solución de plata 12 mM y se incubó durante 20 min con agitación constante, se realizó un lavado con agua desionizada durante 5 s y por último se reveló con una solución de carbonato de potasio 3%/formaldehído 250 μ L/L (37%)/tiosulfato de sodio pentahidratado 0.6 mM durante 10-20 min o hasta la aparición de bandas o spots. Al final se adicionó EDTA 50 mM (solución de paro) durante 10 min y se realizaron 3 lavados con agua desionizada.

6.8.2.3 Tinción con azul de Coomassie

Los geles se incubaron en 20 mL de solución Page Blue Protein Staining Solution (Thermo Scientific) durante un mínimo de 2h o toda la noche, posteriormente se cambió la solución por agua desionizada y se incubaron en agitación hasta eliminar

el excedente del colorante y se observaron bandas de proteína, de acuerdo con la metodología descrita en el manual de la cámara de electroforesis MiniProtean II (Bio-Rad).

6.8.2.4 Zimograma

Para observar las proteínas presentes en los extractos con actividad de esterasa se realizaron geles de poliacrilamida bajo las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Una vez llevada a cabo la electroforesis, el gel se incubó a 37 °C (Estufa estática, BG) en una solución de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 y Tritón X-100 al 5% durante 30 min, posteriormente se cambió la solución a buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 con Tritón X-100 al 0.5% por toda la noche, para renaturalizar a la enzima. Pasado este tiempo se cambió la solución y el gel se dejó en una solución de acetato de α -naftilo (*Solución A*) durante 30 min en agitación, a temperatura ambiente y finalmente, sin desechar la solución A, se le agregó la solución de Fast Red (*Solución B*) hasta que se observara la tinción de las bandas color marrón que presentan actividad enzimática.

Preparación de las soluciones A y B:

- *Solución A*: Se pesaron 25 mg de acetato de α -naftilo, se disolvieron en 5 mL de acetona y se adicionaron 25 mL de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5.
- *Solución B*: Se pesaron 30 mg de Fast Red TR y se suspendieron en 3125 μ L Tritón X-100 y se llevó a 25 mL de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5.

6.8.3 Electroforesis bidimensional (2D)

6.8.3.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Después de verificar la concentración del extracto de proteína en geles SDS-PAGE, se procedió a la separación de las proteínas de acuerdo a su pI, esto fue realizado con geles de inmovilinas, utilizando tiras (ReadyStrip™ IPG Strips pH 3-10, Bio-Rad).

Se sacaron las tiras (ReadyStrip™ IPG Strips, Bio-Rad) del refrigerador a -20 °C, se retiró con cuidado el plástico que las protege y se colocaron en la charola de hidratación para su hidratación en pasivo (sin aplicar corriente) de 12 h mínimo, con

la muestra respectiva y en el buffer de rehidratación (Anexo D) con el volumen indicado en la Tabla 10.

Tabla 10. Volumen y cantidad de proteína máximos para las ReadyStrips IPG Strips pH 3-10 (Bio-Rad).

Tiras (cm)	Buffer de Rehidratación (RH)	Cantidad de Proteína	Aceite mineral
7	125 μ L	50-100 μ g	4 mL
11	200 μ L	100-200 μ g	5 mL
17	300 μ L	200-400 μ g	7 mL

Transcurrido el tiempo, se programó en el equipo Protean® ii2™ IEF System, Bio-Rad aproximadamente por 7 h (Anexo E), se retiró la tira y se colocó en tubos de ensayo con tapa rosca a -20°C para su posterior utilización o se procedió a correr inmediatamente la segunda dimensión, según fuera el caso.

6.8.3.2 Segunda dimensión

Terminada la separación de las proteínas de acuerdo a su pI, la(s) tira(s) con la proteína focalizada fueron tratadas en el buffer de equilibrio I (6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0.05 M Tris-HCl [pH 8.8] y 1% DTT) por 10 minutos, posteriormente en el buffer de equilibrio II (6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0.05 M Tris-HCl [pH 8.8] y 260 mM iodoacetamida) por 15 minutos, se realizó en agitación suave, este paso sólo se realizó para los geles teñidos con plata y azul de Coomassie, no en los zimogramas.

Las tiras se colocaron horizontalmente sobre un gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) con un formato de 20 x 20 cm, se adicionó 1 mL del stock de agarosa 1% (p/v) y aproximadamente 1 mg de azul de bromofenol. Se utilizó buffer de corrida 1X en una cámara de electroforesis (Protean® II xi cell, Bio-Rad) inicialmente a 20 mA, después de 40 minutos, el voltaje se subió a 40 mA a 4 °C, hasta que el frente llegó al final del gel.

6.8.3.3 Análisis de geles

Se analizó el gel 2D SDS-PAGE y se cortaron 9 spots ubicados en el peso molecular y punto isoeléctrico de la cutinasa de interés, se enviaron a identificar al Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal (IRCM), en Montreal (Quebec) Canadá.

Los resultados se analizaron con ayuda del programa Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR 97219, USA) para validar probabilísticamente las identificaciones de proteínas derivado de los resultados de secuencia MS/MS usando el X!Tandem (Craig (2003)) y algoritmos informáticos de ProteinProphet (Nesvizhskii (2003)).

6.9 TÉCNICAS MOLECULARES

6.9.1 Extracción de ARN con trizol

Se pesó aproximadamente 300 mg de micelio fresco, se colocó en un mortero (flameado con EtOH y enfriado), se agregó 1.4 mL de trizol y se molió hasta romper el tejido, este se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL (agua libre de ARNasas), se homogenizó 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C (Biofuge, Primo R). Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante en un nuevo tubo de 2 mL y el pellet se desechó en residuos, se añadieron 140 µL de cloroformo, se mezcló por inversión 15 veces, se incubó a temperatura ambiente 5 min y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C. En este paso se observó la separación de una fase acuosa y una fase orgánica, se transfirió la fase acuosa a un Eppendorf de 1.5 mL, se añadió 700 µL de isopropanol, se homogenizó 10 segundos, se incubó a temperatura ambiente 10 minutos y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a 4°C. Por último, se desechó el sobrenadante, se adicionó 1 mL EtOH 75% al pellet, se centrifugó a 8000 rpm por 5 min a 4°C, se retiró el EtOH, el pellet se secó en campana de extracción (5 min máximo) y se resuspendió en 40 µL de agua libre de ARNasas. Se verificó la integridad del ARN obtenido por medio de electroforesis en agarosa.

6.9.2 Síntesis de ADNc

Se partió de 1 µg de ARN aislado para la síntesis de ADNc, empleando el Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) y se realizó la mezcla de reacción como lo indica el proveedor.

6.9.3 Primers

Se sintetizaron los primers específicos en IDT (Integrated DNA Technologies) utilizando el software OlygoAnalyzer 3.1 para su diseño:

Primer	Tm (50 nM NaCl)
Forward 5'- CTG CAA GGT TTG GCA AGT ATG -3'	54.7 °C
Reverse 5'- GTA CGG TCA GGA GCA GTA AAG -3'	54.9 °C

6.9.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el ADNc, se utilizó este como templado en una PCR, se corrió en un termociclador (Axygen), la reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

a) Mezcla de reacción:

Componente	Volumen
Buffer de reacción 10X con MgSO ₄	5 µL
dNTPs 10mM	1 µL
Primer forward 10 µM	1 µL
Primer reverse 10 µM	1 µL
ADNc templado 1 ng	1 µL
Pfu polimerasa 2.5 U/µL	0.5 µL
Agua biología molecular	40.5 µL
Volumen final	50 µL

b) Condiciones de reacción:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Alineación	55	30 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

6.9.5 Preparación de geles de agarosa

Se pesaron los gramos de agarosa para la concentración deseada (1%) y se añadió buffer TAE 1X calentando en microondas hasta su completa disolución. Se vertió en un tubo Falcon la solución de agarosa 1% y se agregaron 3 µL de bromuro de etidio con concentración de 10 mg/mL por cada 100 mL de agarosa. La solución se sirvió en la bandeja de corrida vertiendo la solución lentamente por uno de los extremos de la bandeja y se dejó polimerizar la agarosa.

Una vez polimerizada, se retiró el peine y se cargaron las muestras de interés con buffer de corrida (TAE 1X) y el marcador de peso molecular en el gel. Se corrió el gel a 90 V (Power Supply, Bio-Rad) y se reveló sobre un transiluminador de luz UV (UVTM, Hoefer).

6.9.6 Purificación de ADN

Se utilizó el Kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) y se siguieron las instrucciones del manual recomendadas por el proveedor.

6.9.7 Secuenciación de ADN

Se cuantificó el ADN en el equipo EPOCH (BioMate) y se enviaron a identificar en los laboratorios MacroGen en Corea del Sur, mediante secuenciación Sanger o método por terminación de cadena.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cosecha de esporas y reactivación de la cepa

Se creció a *A. nidulans* PW1 en un medio mínimo para poder cosechar sus esporas. Como se observa en la Figura 7, se obtuvo un crecimiento homogéneo y característico del hongo, posteriormente se realizó un conteo microscópico en la cámara de Neubauer (Figura 8) donde se visualizó únicamente la presencia de esporas y los resultados de dicho conteo se encuentran en la Tabla 11:

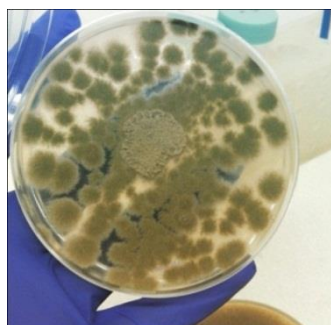


Figura 7. Caja petri sembrada con el hongo *A. nidulans* PW1.

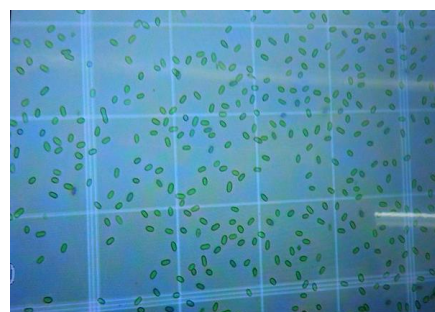


Figura 8. Esporas de *A. nidulans* PW1, vista a 40X y en cámara de Neubauer.

Tabla 11. Conteo de esporas de *Aspergillus nidulans* PW1.

Cuadrante	1ª réplica	2ª réplica
Superior izquierdo	32	47
Superior derecho	37	46
Centro	30	31
Inferior izquierdo	26	33
Inferior derecho	28	41
Total	$\Sigma=153$	$\Sigma=198$

Aplicando la siguiente fórmula, se calculó el volumen de solución de esporas necesario para inocular 10^6 esporas/mL, en matraces con 50 mL de medio:

$$\frac{\Sigma}{5} * 25 * 100 * 10^4 = 8.755 \times 10^8 \text{ esporas/mL}$$
$$V_2 = \frac{(50\text{ml})(1 \times 10^6 \text{ esporas/mL})}{8.755 \times 10^8 \text{ esporas/mL}} = 0.0569 \text{ mL}$$

Por lo tanto se inculó cada matraz con 57 μ L de la solución de esporas en los siguientes experimentos.

7.2 Producción de la enzima ANCUT4

Como se mencionó en el apartado de antecedentes, Bermúdez en 2018 mediante qRT-PCR no detectó la expresión a nivel transcripcional del gen de la cutinasa ANCUT4 en medios que utilizan diferentes fuentes de carbono de origen lipídico. Sin embargo, el análisis de sus secuencias regulatorias reveló sitios de unión para elementos regulatorios involucrados en condiciones de estrés oxidativo.

Por tanto, la información disponible hasta el momento sugiere que la producción de la cutinasa ANCUT4 podría estar regulada por condiciones de EO, por lo cual se decidió utilizar agentes causantes de EO para formular un medio en el que fuera posible detectar la expresión de ANCUT4.

7.2.1 Selección del agente oxidante

Para seleccionar el agente adecuado, creciendo a *A. nidulans* PW1 en el medio mínimo, se decidió probar como agentes de estrés H_2O_2 , Paraquat® y $NaNO_2$ a distintas concentraciones, según lo reportado previamente en otros estudios. Por ejemplo, Kawasaki en 1998 vio la expresión de *catB* en *A. nidulans*, la cual se regula en condiciones de estrés al medioambiente, inducida por la tensión oxidativa generada por el tratamiento con H_2O_2 y Paraquat®. Y Lee y colaboradores en 2010, observaron la sobreexpresión de un gen de cutinasa (*MfCUT1*) de *Monilia fructicola* en condiciones de EO. En este trabajo se observó el aumento de la virulencia del patógeno frente a *Prunus* spp. La expresión de *MfCUT1* se vio reforzada por el EO, debido a que presenta varios sitios de unión para factores regulatorios de este tipo de estrés, de manera similar a lo encontrado en el análisis de secuencias regulatorias de la ANCUT4. La expresión *MfCUT1* se vio aumentada por H_2O_2 a concentraciones entre 0.1 y 0.5 mM mientras que a concentraciones de 1 mM o mayores, se inhibió el crecimiento. Por último, Missall *et al.* en 2006, investigaron el impacto de especies reactivas de nitrógeno (ERN) en el transcriptoma y proteoma mediante el tratamiento de células de *Cryptococcus neoformans* con nitrito de sodio a pH 4.0, que se descompone espontáneamente para formar óxido nítrico (NO) a pH ácido. La exposición de *C. neoformans* a NO dio como resultado cambios en el nivel de muchas proteínas involucradas en general a respuesta al estrés, por ejemplo proteínas con actividad antioxidante.

Para observar el efecto del estrés oxidativo, se buscó primero la generación de biomasa y posteriormente se adicionaron los agentes causantes de EO durante 6 h. En la Tabla 12, se presenta de manera cualitativa cómo se afectó el crecimiento de *A. nidulans* PW1 con cada agente a sus diferentes concentraciones. Como se esperaba, a concentraciones mayores de agente, el crecimiento del hongo fue menor en comparación con el control. Esto ocurre como un mecanismo de defensa natural propio de los hongos, en respuesta al estrés oxidativo pero, además, el hongo en contacto con el agente muere en un intervalo corto de tiempo (Kroll *et al.*, 2013).

Tabla 12. Ensayo cualitativo de crecimiento de biomasa en *A. nidulans* a concentraciones diferentes de estrés.

Agente		Biomasa
Control (sin H ₂ O ₂)		+++
H ₂ O ₂	1 mM	++
	2 mM	++
	3 mM	+
	4 mM	+
Control (sin Paraquat®)		+++
Paraquat®	10 µM	+
Control (sin NaNO ₂)		+++
NaNO ₂	250 µM	++
	500 µM	+

+) Crecimiento casi nulo. ++) Crecimiento medio. ++++) Crecimiento ideal.

Además de observar el crecimiento, fue necesario verificar la actividad esterasa. Como se ve en la Figura 9 los medios con H₂O₂ presentaron una buena actividad, ya que se desarrolló una coloración rojiza intensa, en comparación con los otros medios donde es casi nula.

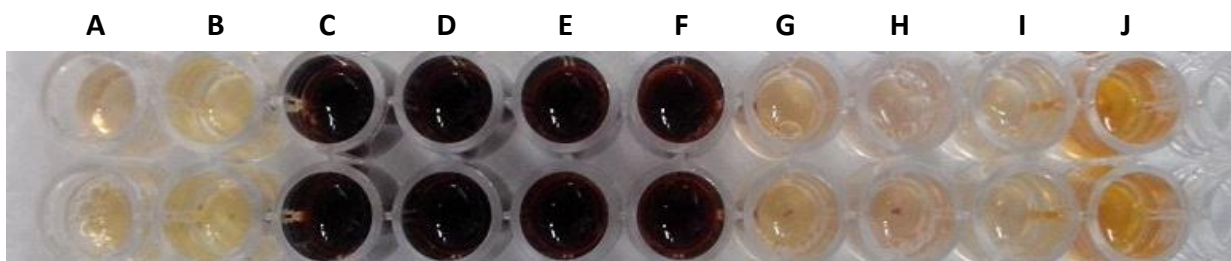


Figura 9. Medición de la actividad esterasa cualitativa de extractos crudos. A: Blanco, B: Control s/ H₂O₂ y Paraquat, C: 1 mM H₂O₂, D: 2 Mm H₂O₂, E: 3 mM H₂O₂, F: 4 mM H₂O₂, G: Control s/ NaNO₂, H: NaNO₂ 250 µM, I: NaNO₂ 500µM, J: Paraquat 10µM.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford, basado en el cambio de color del colorante Comassie Blue G-250, que interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra roja; la forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. La cuantificación de proteína (determinada por duplicado) indicó que no se tenía la cantidad mínima (100 µg) para llevar a cabo el IEF (Tabla 13).

Tabla 13. Cuantificación de proteína de los extractos crudos, en condiciones de estrés.

	Blanco	Control s/H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 1 mM	H ₂ O ₂ 2 mM	H ₂ O ₂ 3 mM	H ₂ O ₂ 4 mM	Control s/Paraq.	Paraq. 10 µM	Control s/NaNO ₂	NaNO ₂ 250 µM *	NaNO ₂ 500 µM *
[] _F µg/mL	---	66.76	65.22	35.43	76.67	84.05	27.10	29.12	53.25	---	---

*No se logró cuantificar proteína por el método de Bradford, ya que el agente oxidante interfería con la reacción.

Con los resultados de las Tablas 12 y 13, es posible analizar el efecto de cada agente. El Paraquat® es un agente altamente tóxico que inhibe casi completamente el crecimiento del hongo por lo que sería difícil observar cambios en el perfil proteico de sus sobrenadantes; además requiere manipulación especial y es de elevado precio. El NO₂⁻ interfirió con el colorante para cuantificar la proteína y cabe destacar, que se utiliza este método por ser sensible (1-15 µg), reproducible, simple, rápido (2 min), barato y pocas sustancias interfieren en su determinación, además se utilizó en concentraciones bajas y se observó que afectó considerablemente el crecimiento del hongo en comparación con el H₂O₂ donde las concentraciones fueron mayores, el NaNO₂ presentó una variable más, siendo difícil discernir entre ERO contra ERN, ya que se sabe que en las plantas y hongos el porcentaje de óxido nítrico regula las respuestas hormonales y de defensa, siendo una fuente potencial de NO, lo que sugiere que las condiciones de estrés nitrosativo inducen modificaciones proteicas tales como nitrosilación o fosforilación (Aguirre *et al.*, 2005). Mientras que el H₂O₂ (30% y 50%) es un agente oxidante barato, de fácil disponibilidad y, por ende, se pueden variar sus concentraciones, permitió obtener una buena cantidad de biomasa, lo que facilitó la obtención de proteína y su manipulación es fácil. Por lo anterior, se optó por utilizar únicamente este último agente para observar el efecto de estrés oxidativo.

7.2.2 Formulación del medio optimizado para la expresión de ANCUT4

Una vez que se seleccionó el agente oxidante, se formuló entonces el medio optimizado (Tabla 14), el cual contiene cutina además de H₂O₂, porque aunque se esperaba que la cutinasa (ANCUT4) se expresara bajo estrés oxidativo con los requerimientos mínimos de carbono y nitrógeno, la cutina sigue siendo el sustrato inductor, por lo que debe estar presente en el medio.

Tabla 14. Composición de medio optimizado en condiciones de estrés oxidativo en *A. nidulans*.

Compuesto	Medios en estrés oxidativo
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L
Arginina	5 mL/L
Biotina	500 µL/L
Metionina	11 mg/L
Cutina	0.5%
Agente H ₂ O ₂	0.5 mM

Como se observa en la Figura 10, tras la incubación de 48 h el crecimiento del hongo fue característico y en forma de esferas blancas, al adicionar H₂O₂ y transcurridas las 6 h, el cultivo adquiere una coloración amarilla típica del daño por estrés oxidativo, generando una disminución de la biomasa (Figura 11).



Figura 10. Crecimiento de *A. nidulans* en medio optimizado utilizando cutícula de manzana como inductor.



Figura 11. Crecimiento de *A. nidulans* en medio optimizado en condiciones de estrés oxidativo.

Utilizando este medio bajo condiciones en EO, Bermúdez en 2018 detectó el transcrito de *ancut4* mediante qRT-PCR por primera vez. Lo que aportó más evidencia de que sería factible encontrar a la proteína con actividad, en estas mismas condiciones.

7.3 Corroboración de condiciones de estrés oxidativo

Para corroborar que en el medio optimizado existían condiciones de EO se identificó mediante PCR punto final al transcrito de la catalasa B (CatB) el cual se expresa únicamente bajo condiciones de EO causado por H₂O₂ (Kawasaki, 1998). La banda que se observa en aproximadamente 500 pb (Figura 12) se identificó mediante secuenciación Sanger en los laboratorios Macrogen (Corea del Sur).

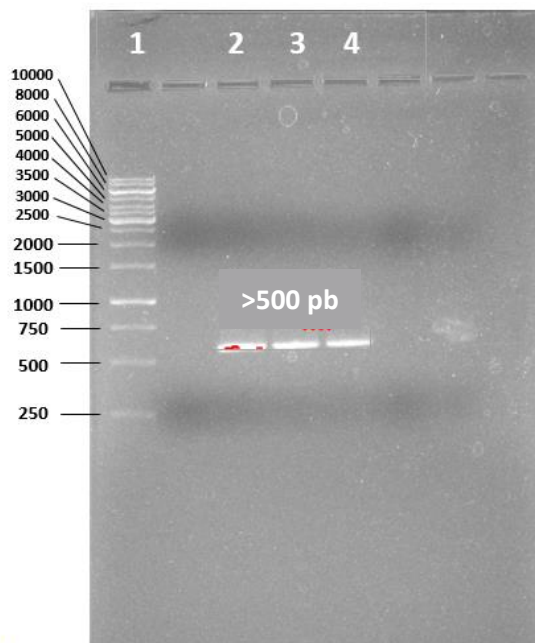


Figura 12. Gel de agarosa al 1%. Carriles 1: MPM Gene Ruler 1kb, 2,3 y 4: productos de amplificación del gen *catB*.

7.3.1 Identificación

Los resultados de la identificación se analizaron con ayuda del programa MultAlin (Toulouse, Francia), comparando con la secuencia reportada (XM_677516.1) en la base de datos del NCBI. En la Figura 13 se observa que la secuencia corresponde al transcrito de la catalasa B, corroborando que la formulación del medio optimizado se logró en condiciones de EO, sin embargo se observó la delección de tres pares de bases “CAG” en una secuencia repetida “CAGCAG” que al analizar la secuencia traducida corresponde a una glutamina (Q), este aminoácido no se ve involucrado en su triada catalítica: arginina, triptófano e histidina (Scherer *et al.*, 2002), amplificando así el producto de la CatB.

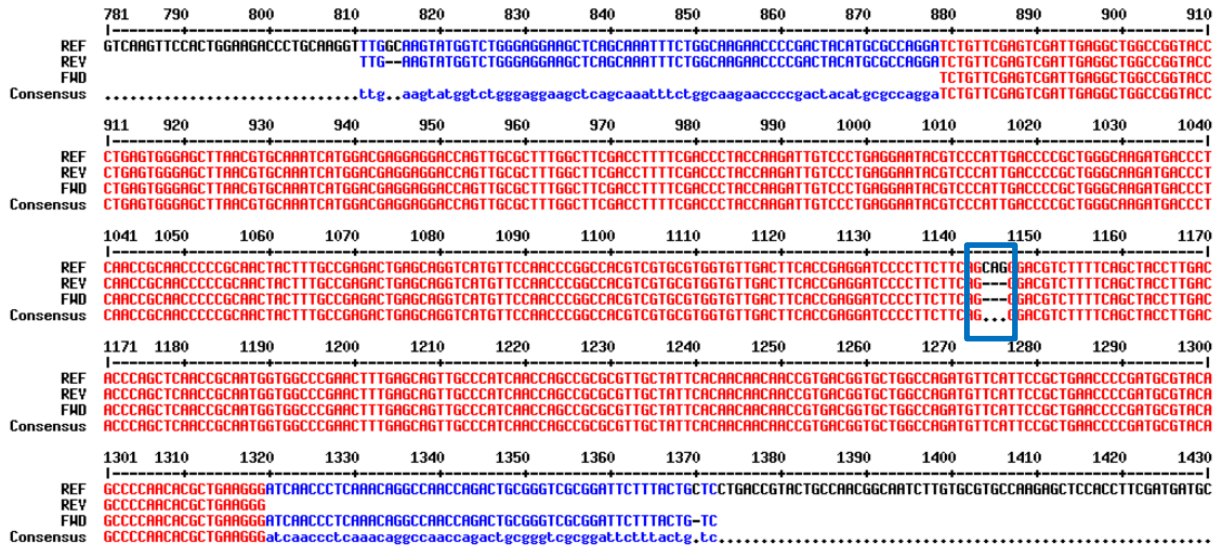


Figura 13. Comparación de la secuencia de CatB con producto amplificado mediante PCR en punto final.

7.4 Concentración de proteína y cuantificación de actividad

Una vez comprobadas las condiciones de EO, el siguiente paso consistió en observar qué proteínas se producían e identificar a la ANCUT4, para ello se concentró 150 veces el extracto crudo para obtener una mayor cantidad de proteína y se midió actividad esterasa. Las muestras presentaron una coloración rojo intenso, por lo cual la actividad se mantuvo después de la ultrafiltración (Figura 14). En la Tabla 15 se presenta la cantidad de proteína de las muestras concentradas, obteniendo aproximadamente 9 veces más proteína, en comparación con el extracto crudo sin concentrar.

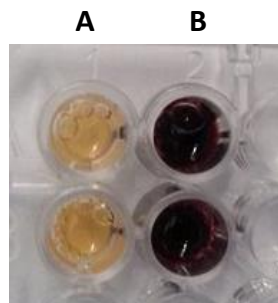


Figura 14. Medición de la actividad cualitativa del extracto concentrado. A)Blanco y B)Cut/H₂O₂ 0.5 mM

Tabla 15. Cuantificación de proteína de extracto concentrado.

	Blanco	Cut/ H₂O₂ 0.5 mM	Cut/ H₂O₂ 0.5 mM
A	<1.60	4.941	3.451
B	<1.60	4.312	3.584
Promedio	<1.60	4.627	3.518
Dilución	---	1:200	1:250
[]_F µg/mL	---	925.30	879.38

7.5 Perfil de proteína y zimograma

Se prosiguió a realizar geles de acrilamida (SDS-PAGE) y zimogramas al 14% para observar el peso molecular de la(s) enzima(s) responsable(s) de la actividad.

Analizados por el software GelDoc de Biorad, en la Figura 15 y 16 se aprecia una banda de 17.5 a 18 kDa, que está alrededor del PM reportado teóricamente para ANCUT4 que es de 19.90 kDa. Además, en la Figura 16 se presenta una banda de actividad en el mismo peso del perfil proteínico (SDS-PAGE). Estas bandas se cortaron y se identificaron en el Laboratorio de Proteómica del Instituto de Biotecnología (IBt), UNAM en Cuernavaca, Morelos.

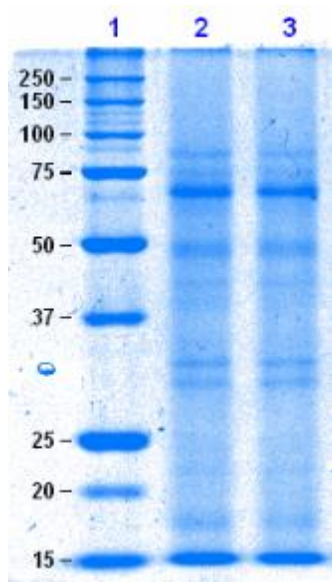


Figura 15. PERFIL DE PROTEÍNAS DE SOBRENADANTES CONCENTRADOS EN GEL SDS-PAGE al 14%. Carriles: 1 MPM Precision Plus (BioRad), 2: SN concentrado de medio cutina/H₂O₂ 0.5 mM. En todos los carriles se cargaron 100 µg de proteína total.



Figura 16. ZIMOGRAMA DE SOBRENADANTES CONCENTRADOS EN GEL SDS-PAGE al 14%. Carriles: 1 MPM Precision Plus (BioRad), 2: SN concentrado de medio cutina/H₂O₂ 0.5 mM, 3: SN concentrado de medio cutina/H₂O₂ 0.5 mM. En todos los carriles se cargaron 100 µg de proteína total.

7.5.1 Identificación

Al identificar la muestra mediante LC-MS/MS, se encontraron los siguientes péptidos mayoritarios:

- DGSCHDVTFIFARGSTELGYLGSTVGPATCNVLKLRKPGQVACQGVAPAY
IADLASNFLPQGTNQIAINEAKSLFELAASKCPNTKIVAGGYSQGAAVMHAA
ISTLSSTVQDQIK
- LSSGQVVGAVTFGDPFK

Los cuales se compararon con el programa Protein BLAST® contra la base de datos del NCBI y se encontró que son parte de la secuencia de aminoácidos de la cutinasa CBF83913.1 (ANCUT4) y de la cutinasa CBF82125.1 (ANCUT1), respectivamente. Ambas codificadas en el genoma del hongo *Aspergillus nidulans* FGSC A4, como se muestra en las siguientes tablas:

Tabla 16. Identificación de la cutinasa ANCUT4 de *Aspergillus nidulans*.

Acceso	Descripción	Puntuación	Cobertura	# Péptidos únicos	# Péptidos	# PSMs	PM [kDa]	calc. pI
CBF83913.1	TPA: cutinase, putative (AFU_orthologue; AFUA_2G14420) [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	6.19	7.62	1	1	2	22.7	6.30

Tabla 17. Identificación de la cutinasa ANCUT1 de *Aspergillus nidulans*.

Acceso	Descripción	Puntuación	Cobertura	# Péptidos únicos	# Péptidos	# PSMs	PM [kDa]	calc. pI
CBF82125.1	TPA: cutinase, putative (AFU_orthologue; AFUA_2G09380) [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	87.73	51.64	5	6	28	22.4	7.31

Por tanto se logró identificar por primera vez a la cutinasa ANCUT4 del hongo *A. nidulans*, inducida bajo condiciones de estrés oxidativo utilizando como agente al H₂O₂. Sin embargo la identificación demostró que también está presente la ANCUT1 comigrando en la misma banda, debido a que presentan pesos moleculares casi idénticos (Tabla 16 y 17). Se decidió separarlas mediante sus puntos isoeléctricos, utilizando la técnica de electroforesis bidimensional para discernir entre ellas.

7.6 Optimización de muestra para el IEF (primera dimensión)

La primera dimensión permite la separación de las especies peptídicas de acuerdo a su pl. Antes del análisis proteómico es deseable reducir la complejidad de la muestra por “enriquecimiento”, permitiendo el incremento de la concentración de las proteínas de interés, esto es de gran importancia debido a que usualmente las proteínas de baja abundancia son las responsables de los procesos que se llevan a cabo en la célula (Bodzon-Kulakowska *et al.*, 2006).

7.6.1 Métodos de precipitación de proteínas ensayados

Se ensayaron dos métodos de precipitación diferentes, uno con ácido tricloroacético (TCA) y otro en solventes (acetona-DTT), buscando obtener una cantidad y calidad de proteína suficiente para el IEF.

Se emplearon estos dos métodos, ya que se sabe que los polisacáridos al igual que los ácidos nucleicos, pueden interaccionar con los anfolitos de carga o con proteínas dando lugar a patrones 2D distorsionados. Además, estas macromoléculas pueden incrementar la viscosidad de la solución y obstruir los poros de los geles de poliacrilamida. También, los lípidos pueden formar complejos con los detergentes lo cual reduce considerablemente la separación de las proteínas, ya que su solubilidad se ve disminuida (Görg *et al.*, 2004).

Cabe resaltar que los extractos crudos precipitados, se realizaron con el medio de glucosa, ya que la cutina, al ser un sustrato de difícil obtención, se utilizó hasta haber optimizado este método.

El TCA actúa disociando su ión cloro y produce el ión acetato, que es ácido y ocurre un cambio de pH que conduce a la precipitación de la proteína. La acetona presenta una constante dieléctrica menor que la del agua y produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas, así como una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas lo que trae como consecuencia una disminución en la solubilidad de éstas. Además, el DTT ayuda a desnaturalizar las proteínas y se encuentran más expuestas las cargas, produciendo su precipitación (Whitten *et al.*, 2008).

Las muestras precipitadas se solubilizaron en buffer de rehidratación (RH) y nuevamente se cuantificó proteína, existiendo diferencia entre ambos métodos, obteniendo mayor cantidad de proteína con TCA (Tabla 18), sin embargo se contó con suficiente proteína para llevar a cabo el IEF en los dos métodos ensayados.

Tabla 18. Cuantificación de proteína en medios precipitados con TCA [] y Acetona-DTT []

	Blanco	Glucosa	Glucosa
[] _F µg/mL	---	455.13	391.00
[] _F µg/mL	---	423.93	345.15

7.6.2 Isoelectroenfoque de ensayos de muestras precipitadas

Para la primera dimensión se cargó en cada tira (11 cm, pH 3-10) 250 µg de proteína total. Se programaron las condiciones en el IEF para alcanzar 32000 Volts horas totales (Tabla 19), con una duración aproximada de 20 h. Transcurrido el tiempo, se monitorearon el voltaje y la corriente.

Tabla 19. Programa para el IEF de muestra con glucosa.

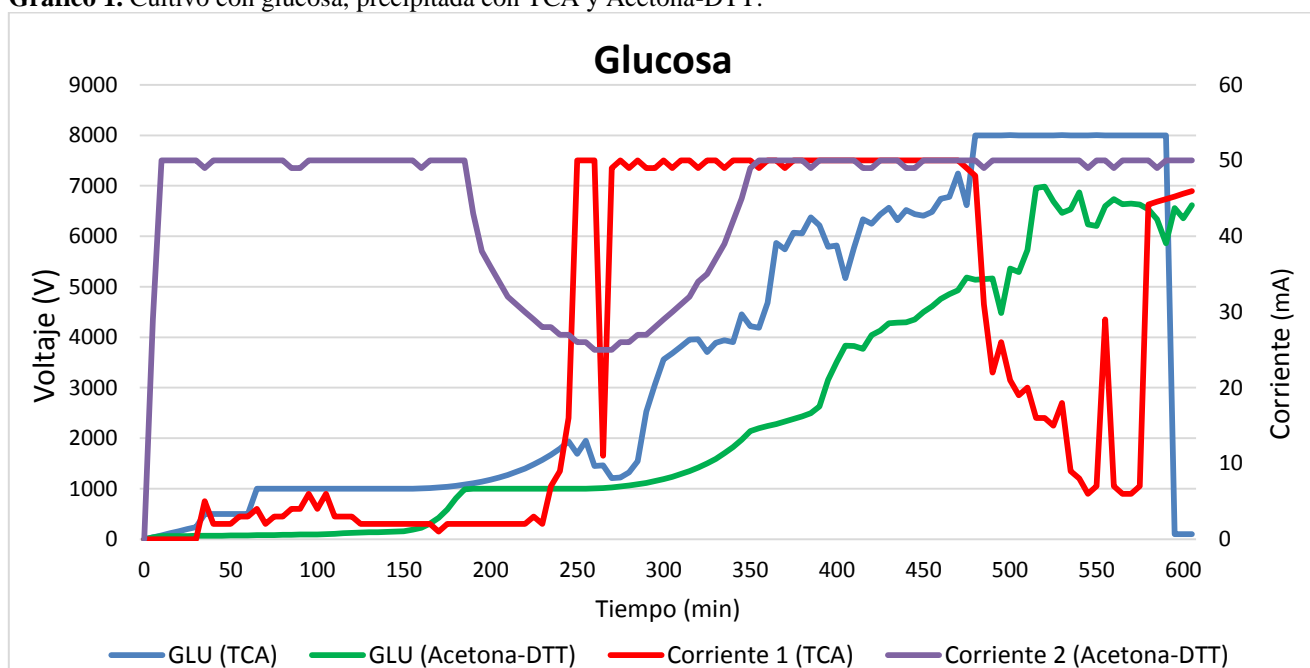
Paso	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	250	Lineal	50	0:30	HH:MM
2	500	Rápido	50	0:30	HH:MM
3	1000	Rápido	50	1500	Volt Hr
4	2500	Gradual	50	2500	Volt Hr
5	8000	Gradual	50	0:30	HH:MM
6	8000	Rápido	50	32000	Volt Hr
7	100	Sostener	50		

En el Gráfico 1 se aprecia que la muestra precipitada con Acetona-DTT no alcanzó el voltaje máximo del programa (Tabla 19), lo que indica que no hubo una adecuada migración de las proteínas a sus respectivos puntos isoeléctricos y que, además de proteínas, se encontraban otros compuestos que son solubles en solventes orgánicos (ej. detergentes, lípidos, etc.) permaneciendo en solución (Whitten *et al.*, 2008). Además la corriente (morado) no tuvo un incremento gradual, esto se pudo deber a que hubo trazas de sales que migraron junto con las proteínas durante el IEF, provocando un aumento en la conductividad. Cuando hay una alta

concentración de sales, algunas regiones de las proteínas no se enfocan, ocasionando distorsiones en los geles finales (Görg *et al.*, 2004).

Sin embargo en la muestra precipitada con TCA se tuvo un incremento de voltaje gradual que se mantuvo hasta los 8000V y que después decayó, lo que probablemente causó una baja migración de las proteínas. La corriente (rojo) se mantuvo en un intervalo constante indicando una menor presencia de sales. Sin embargo, entre el minuto 450 y 500 decayó la corriente manteniéndose así hasta el final, por lo cual se modificó el programa.

Gráfico 1. Cultivo con glucosa, precipitada con TCA y Acetona-DTT.



Con los resultados obtenidos anteriormente, se optó por trabajar únicamente con la precipitación con TCA, ya que se obtuvo una mayor cantidad de proteína y en el IEF permitió obtener proteína más limpia que se reflejó en una mejor resolución.

7.6.3 Precipitación con TCA de medio optimizado

Elegido el método de precipitación, se prosiguió a trabajar con el extracto crudo de la muestra de cutina/H₂O₂ 0.5 mM, sin embargo debido a que se continuó modificando el programa para el IEF, se partió de un volumen de 500 mL de extracto crudo para obtener una mayor cantidad de proteína precipitada con TCA, se solubilizó en buffer de rehidratación (RH) y nuevamente se cuantificó proteína,

obteniendo una cantidad de proteína suficiente para realizar el IEF (Tabla 20), para los dos programas ensayados.

Tabla 20. Cuantificación de proteína en medio optimizado precipitado con TCA.

	Blanco	Cut/ H₂O₂ 0.5 mM	Cut/ H₂O₂ 0.5 mM
[] _F µg/mL	---	698.88	899.38
[] _F µg/mL	---	708.25	968.63

7.7 Optimización de IEF con muestra precipitada

Una vez cuantificada la cantidad de proteína se ensayaron dos programas diferentes, modificando en ambos el voltaje, el gradiente y el valor de tiempo.

Para la primera dimensión se cargó en cada tira (11cm, pH 3-10) 250 µg de proteína. Se ensayaron dos programas para las condiciones en el IEF (Tabla 21 y 22), con una duración aproximada de 20 h, transcurrido el tiempo, se monitoreó el voltaje y la corriente.

Tabla 21. Programa I para el IEF.

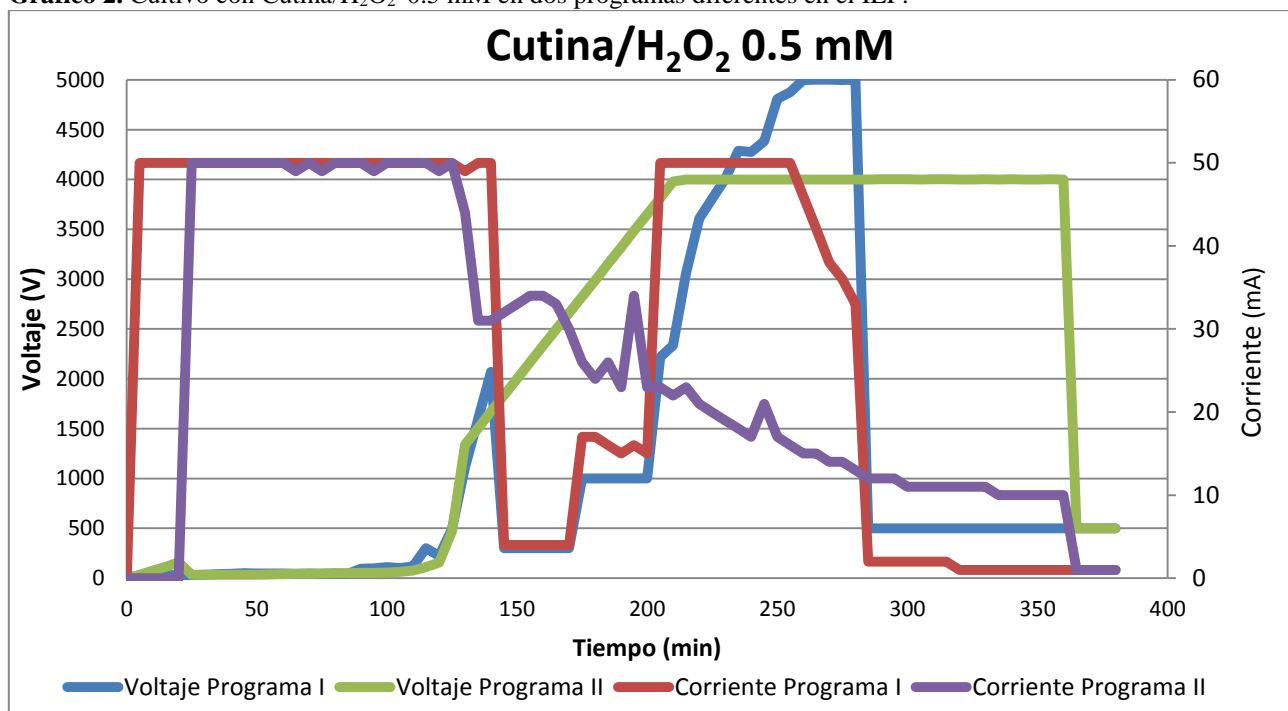
Paso	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	300	Rápido	50	0:30	HH:MM
2	1000	Gradual	50	0:30	HH:MM
3	5000	Rápido	50	1:20	HH:MM
4	300	Rápido	50	0:30	HH:MM
5	1000	Rápido	50	0:30	HH:MM
6	5000	Rápido	50	1:20	HH:MM
7	500	Sostener	50		

Tabla 22. Programa II para el IEF.

Paso	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	250	Lineal	50	0:30	HH:MM
2	500	Rápido	50	0:30	HH:MM
3	1000	Rápido	50	0:30	HH:MM
4	4000	Lineal	50	2:00	HH:MM
5	4000	Rápido	50	10000	Volt Hr
6	500	Sostener	50		

En el Gráfico 2 se observó que la muestra en los dos programas alcanzó el voltaje máximo. Sin embargo, en el paso 6 para el programa I y en el paso 5 para el programa II, el voltaje decae en forma brusca y no gradual. El programa II arrojó mejores resultados, ya que la migración de las proteínas se mantuvo a 4000V, por lo cual se propuso modificar la velocidad de los últimos pasos del programa II para que la migración de las proteínas lograra una resolución ideal para los geles en doble dimensión.

Gráfico 2. Cultivo con Cutina/H₂O₂ 0.5 mM en dos programas diferentes en el IEF.



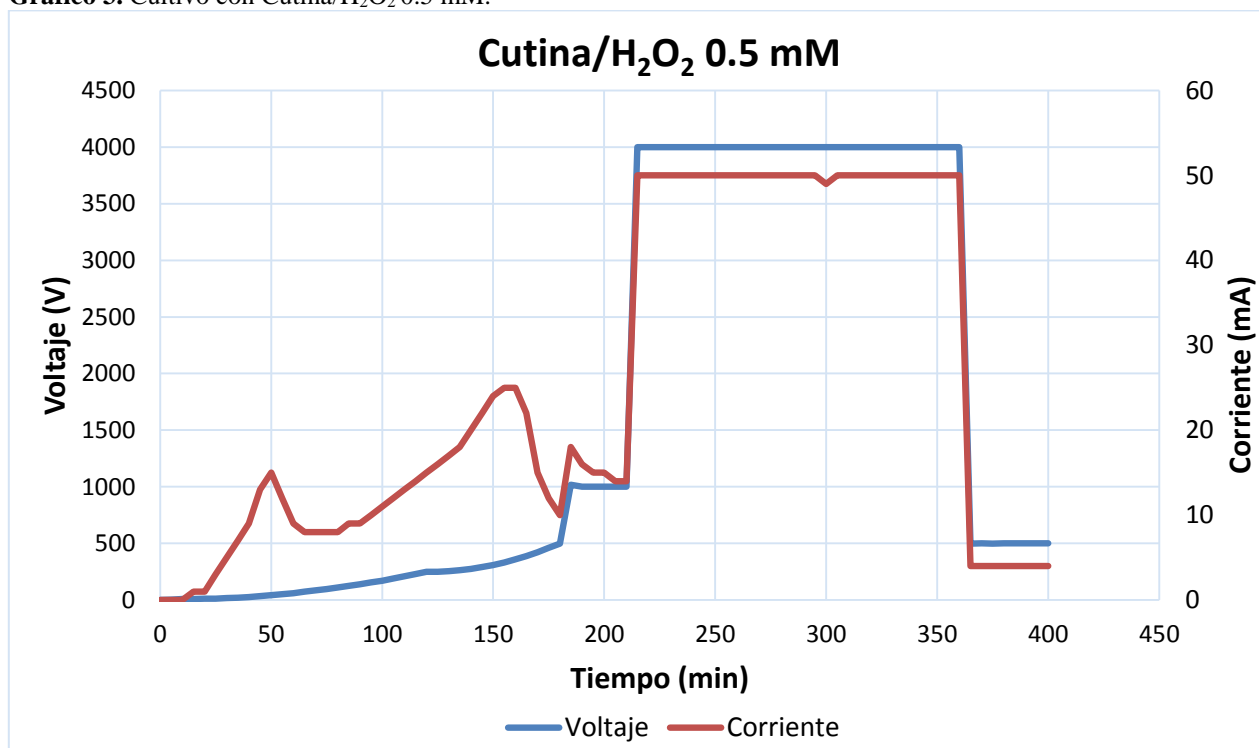
Nuevamente se modificó el programa para obtener una resolución adecuada, como se observó en el Gráfico 2 la corriente incrementó rápidamente cambiando el gradiente y además para permitir que las proteínas migren a su punto isoeléctrico el valor de tiempo se incrementó en los dos primeros pasos. Se cargó en una tira (7 cm, pH 3-10) 100 µg de proteína. Se ensayó el siguiente programa (Tabla 23), con una duración aproximada de 22 h; transcurrido el tiempo, se monitorearon el voltaje y la corriente.

Tabla 23. Programa para el IEF con muestra de Cutina/H₂O₂ 0.5 mM.

Paso	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	250	Gradual	50	2:00	HH:MM
2	500	Gradual	50	1:00	HH:MM
3	1000	Rápido	50	0:30	HH:MM
4	4000	Lineal	50	2:00	HH:MM
5	4000	Rápido	50	10000	Volt Hr
6	500	Sostener	50		

En el Gráfico 3 se obtuvo el programa ideal para la muestra de Cutina/H₂O₂ 0.5 mM, ya que en los primeros minutos el incremento de las proteínas fue gradual, no hubo decrementos ni incrementos abruptos tanto en el voltaje como en la corriente, por lo cual un mayor tiempo en los primeros pasos es ideal para la óptima migración de las proteínas a sus respectivos puntos isoeléctricos. La muestra precipitada con TCA permitió eliminar sales e impureza que se vio reflejado en el voltaje, ya que se mantuvo a 4000V. Para la utilización de tiras de 11 y 17 cm se modificó únicamente la cantidad de proteína (ver Tabla 10 de materiales y métodos experimentales) y los pasos del voltaje 4, 5 y 6 (Anexo E).

Gráfico 3. Cultivo con Cutina/H₂O₂ 0.5 mM.



7.8 Geles en 2D (segunda dimensión)

La segunda dimensión permite la separación de las especies peptídicas de acuerdo con su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

7.8.1 Perfil de proteína y zimograma

Se prosiguió a realizar geles de electroforesis (SDS-PAGE) y zimogramas al 12% para observar el peso molecular y punto isoeléctrico de la(s) enzima(s) responsable(s) de la actividad.

En la Figura 17 las proteínas focalizadas se encuentran en una zona de pH entre 5 a 7 y una abundancia mayor entre 15 y 37 kDa, por lo cual se cortaron 9 spots que fueron reproducibles, con una buena intensidad y una adecuada resolución en los geles. Se enviaron a identificar al Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal (IRCM), en Montreal (Quebec) Canadá.

En la Figura 18 la migración de las proteínas en el gel 2D cambia completamente, ya que para la realización del zimograma no se llevó a cabo el tratamiento con buffer de equilibrio después del IEF, si se realizara las proteínas de interés pierden su actividad completamente debido a la utilización de agentes reductores como es el DTT, por lo cual la resolución del gel es diferente en comparación con el gel SDS-PAGE, sin embargo se obtuvieron spots con presencia de actividad en mayor abundancia a un pH de 5 a 7, donde se presentan las enzimas de interés y se observó que la actividad de esterasa se mantiene.

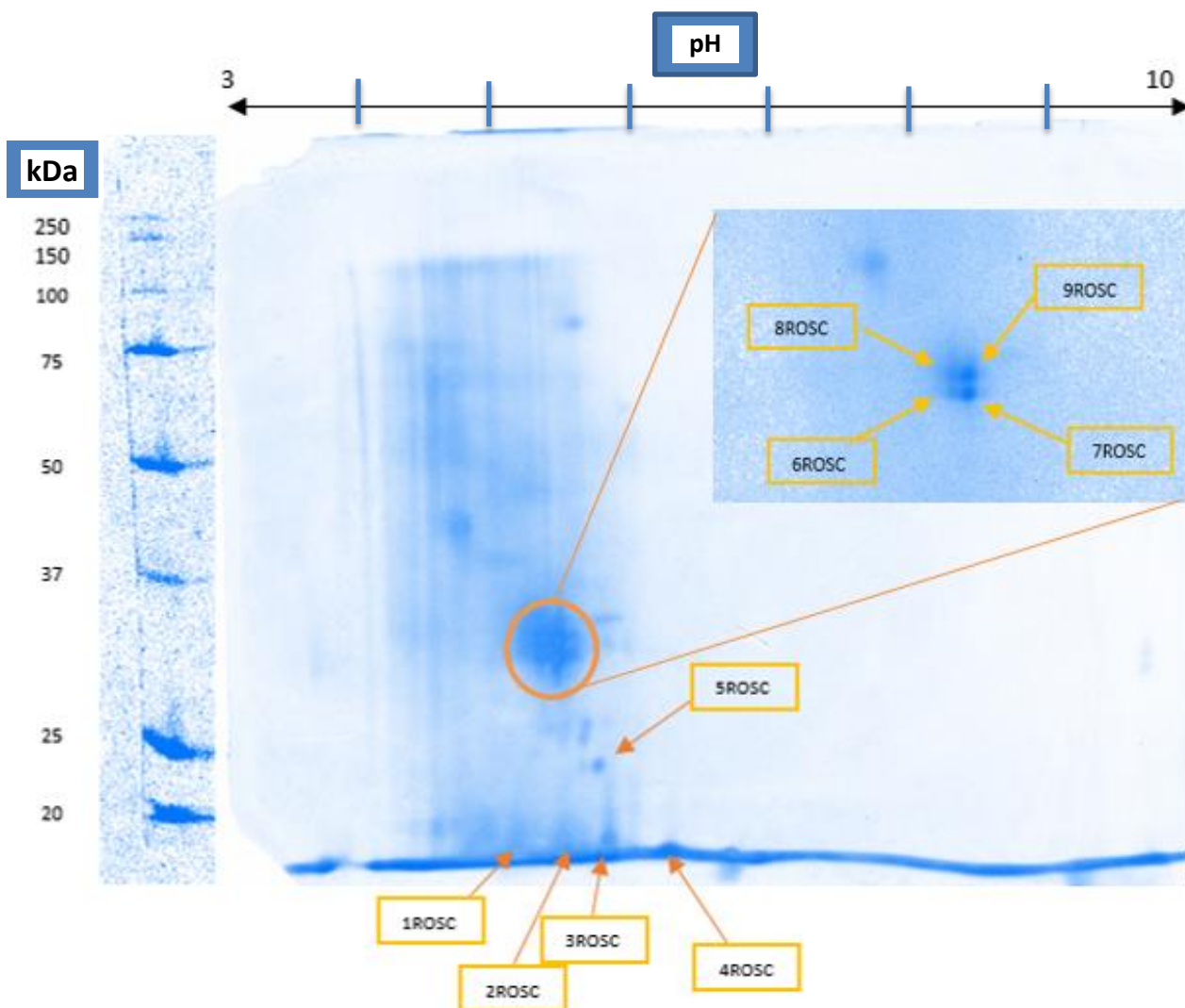


Figura 17. PERFIL DE PROTEÍNAS EN GEL 2D SDS-PAGE al 12%. Carriles: 1 MPM Precision Plus (BioRad). En la tira se cargaron 100 μg de proteína total (Cutina/ H_2O_2 0.5 mM).

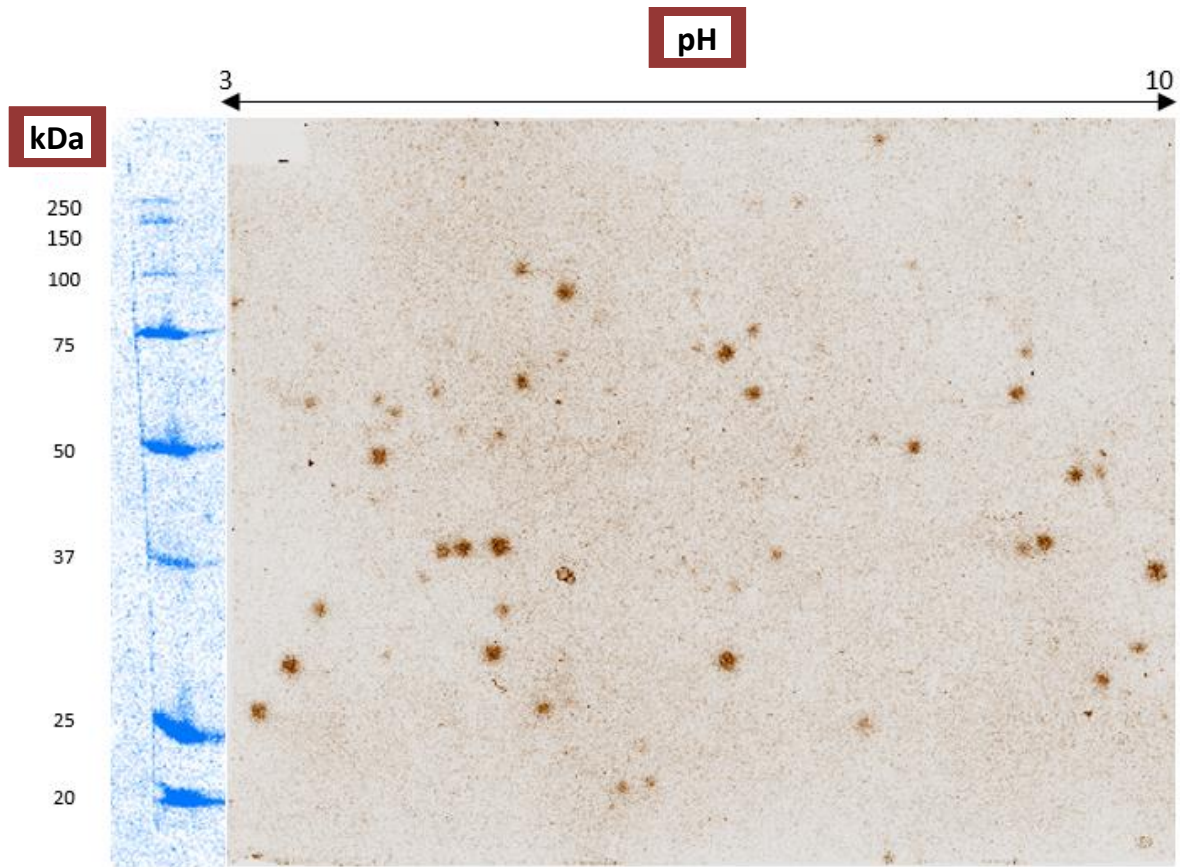


Figura 18. ZIMOGRAMA DE SOBRENADANTES CONCENTRADOS EN GEL 2D SDS-PAGE al 12%. Carriles: 1 MPM Precision Plus (BioRad). En todos los carriles se cargaron 100 μg de proteína total (Cutina/ H_2O_2 0.5 mM).

7.8.2 Identificación

Los resultados obtenidos con ayuda del programa Scaffold que verifica las identificaciones de péptidos asignados por SEQUEST, Mascot y otras listas de otros motores de búsqueda utilizados para derivar los datos importados, se resumen en la Tabla 24, en los siguientes tres grupos: 1) factores de transcripción de estrés oxidativo, 2) reacciones de óxido-reducción (REDOX) y 3) hidrolíticas/invasión (cutinasas) y en el Anexo F se presentan los resultados completos de los nueve spots.

Tabla 24. Análisis de gel 2D SDS-PAGE.

Especie	Función/Proteína identificada	Gen/Acceso	Spot detectado	No. péptidos únicos identificados
<i>Aspergillus nidulans</i>	Factores de transcripción de EO			
	hogA ortólogo, AtfA	AN1017	2	1
	Ytp1	AN3714	1-3	1
	Factor hipotético de respuesta a estrés oxidativo	AN1390	1	1
	REDOX			
	Catalasa B	XP_682608.1	1-9	19
	Oxidorreductasa	AN7193	1-5	5
		AN5563	2-4 y 7	7
	Peroxiirredoxina	XP_681961.1	1	1
	SOD	XP_657845.1	1-5	11
	Tiorredoxina	XP_657774.1	1-3	3
		XP_681899.1	2	1
	Tiorredoxina reductasa	XP_661185.1	2 y 3	3
		XP_681487.1	3 y 5	2
	Hidrolíticas/Invasión			
ANCUT1	AN5309	1-5 y 8	14	
ANCUT1-ANCUT2	AN5309, AN7541	1-5	2	
ANCUT4	AN10346	1-3	2	

Se identificaron enzimas que actúan en contra de las especies reactivas de oxígeno como la catalasa B, peroxirredoxinas, SOD, oxidorreductasas, tiorredoxinas y tiorredoxinas reductasas, estas últimas tres con dos genes diferentes. Estos mecanismos antioxidantes actúan de forma cooperativa, en reacciones secuenciales y responden frente a la defensa de las plantas. También se identificaron tres factores de transcripción para elementos regulatorios de EO para *ancut4*. Además, el hongo secretó las enzimas hidrolíticas como las cutinasas que le permiten invadir a la planta, por lo cual en la Tabla 24 se observa una gran variedad de proteínas existiendo una relación e interacción entre la planta y el patógeno. Se detectó nuevamente la presencia de la cutinasa ANCUT1, de la que se encontraron 14 péptidos, esto se debe a que en el medio optimizado como inductor se encuentra la cutina que sigue siendo el sustrato principal de la ANCUT1, aunque el medio se encuentre expuesto a condiciones de estrés oxidativo.

Se identificó la cutinasa ANCUT4 en los primeros tres spots, identificando 2 péptidos con 100% de homología, 2.19% y 3.79% de cobertura, un pH entre 5-6, un PM entre 17 a 18 kDa y está regulada por presencia de especies reactivas de oxígeno. Se sabe que tres de las cutinasas expresadas en el hongo *A. nidulans* responden a fuentes de carbono, pero esta cuarta cutinasa se induce de forma distinta. Esto implica que el papel que desempeña en la invasión del tejido vegetal es diferente al de las otras tres cutinasas, ya que ANCUT4 responde a defensa(s) de la(s) planta(s), que consiste en la producción de especies reactivas de oxígeno, utilizando esta cuarta enzima como último recurso.

Hasta hoy en día hay pocas cutinasas o hidrolasas de pared vegetal que se comportan e inducen en respuesta al estrés oxidativo, un ejemplo es el gen de cutinasa (*MfCUT1*) de *Monilia fructicola* que se sobreexpresa en condiciones de EO aumentada por H₂O₂ (Lee *et al.*, 2010), por lo cual con este trabajo se aumenta la información que se tiene sobre este tipo de enzimas y el papel que juega esta cuarta cutinasa en el hongo *A. nidulans*.

8. CONCLUSIONES

- En un medio en que se genera estrés oxidativo y se encuentra cutina como inductor, se obtuvo por primera vez una banda proteínica correspondiente al producto del gen AN10346.4 que codifica para la cutinasa ANCUT4 de *Aspergillus nidulans* PW1. Presentó un peso molecular experimental de 17.5 kDa y comigró con otra de las cutinasas ya identificadas (ANCUT1) en el grupo de trabajo. Se detectó el transcrito de la catalasa B, lo que permite afirmar que si se lograron las condiciones de estrés oxidativo, ya que esta enzima sólo se expresa en estas condiciones.
- Mediante una técnica proteómica (electroforesis en doble dimensión), se logró identificar la presencia de diversas proteínas, como factores de transcripción de estrés oxidativo, proteínas que actúan en contra de las especies reactivas de oxígeno obteniendo reacciones de óxido-reducción y enzimas hidrolíticas/invasión como las cutinasas. Esto relaciona los mecanismos de invasión del hongo con los mecanismos de respuesta al EO, generado por las plantas como forma de defensa frente al ataque, proponiendo un modelo de acción entre la planta contra el hongo.
- Los resultados obtenidos permiten proponer que la producción de la enzima ANCUT4 en *A. nidulans* ocurre como respuesta a los mecanismos de defensa de la planta y no al crecimiento como saprófito, lo que lograría mediante el empleo de las otras cutinasas codificadas en el genoma.

9. PERSPECTIVAS

Mediante la realización del presente trabajo de investigación se logró identificar por primera vez la cutinasa ANCUT4, se formularon las condiciones de su producción y se dilucidó el papel que juega en comparación con las otras tres cutinasas, por lo que a continuación se plantean algunos puntos de interés para profundizar en el conocimiento de la cutinasa ANCUT4 del hongo *A. nidulans*:

- Purificar la enzima para llevar a cabo una caracterización bioquímica más fina.
- Realizar ensayos de inmovilización para conocer su potencial biocatalítico y poder facilitar la recuperación y reutilización de la enzima.
- Lograr una mayor producción de la enzima ANCUT4, mediante clonación y expresión de la proteína en sistemas heterólogos.
- Optimizar las condiciones del IEF, probando con tiras de IPG en longitudes de pH más cortos, para obtener una mejor resolución en el gel 2D.
- Realizar un estudio más profundo sobre la regulación de esta cuarta cutinasa, ya que se induce en respuesta al estrés oxidativo, ensayando un estudio *in vivo*, donde exista una interacción entre el hongo y la planta.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abu Bakar FD, Murad AMA, Hamidi AA, Zamrod Z, Mahadi NM & Sullivan P (2005). Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. *Asia Pac J Mol Biol Biotech* 13:63-69.
- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D & Hansberg W (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiol* 13(3):111-118.
- Ames BN, Shigenaga MK & Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915-22.
- Andrianopoulos A & Hynes MJ (1990). Sequence and functional analysis of the positively acting regulatory gene *amdR* from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 10:3194–3203.
- Andrianopoulos A, Kourambas S, Sharp JA, Davis MA & Hynes MJ (1998). Characterization of the *Aspergillus nidulans nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J Bacteriol* 180:1973–1977.
- Arst HN Jr & Cove DJ (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 126:111–141.
- Arst HN Jr & Bailey CR (1980). Genetic evidence for a second asparaginase in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 121:243–247.
- Arst HN, Brownlee AG & Cousen SA (1982). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* – a farewell to *tamA*? *Curr Genet* 6:245–257.
- Bahn YS, Kojima K, Cox GM & Heitman J (2005). Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* 16:2285–2300.
- Bahn YS, Kojima K, Cox GM & Heitman J (2006). A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* 17:3122–3135.
- Barnett JA (1976). The utilization of sugars by yeasts. *Adv Carbohydrate Chem Biochem* 32:125-134.

- Barnett JA (1981). The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv Carbohydrate Chem Biochem* 39:347-404.
- Barros DPC, Fonseca LP & Cabral JMS (2007). Cutinase-catalyzed biosynthesis of short chain alkyl esters. *J Biotechnol* 131:109-110.
- Benocci T, Aguilar-Pontes MV, Zhou M, Seiboth B & P. de Vries R (2017). Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels* 10:152.
- Bermúdez-García EP (2013). Bases bioquímicas y moleculares para el estudio del sistema cutinolítico en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Bermúdez E, Peña-Montes C & Farrés Amelia (2018). Mechanistic expression of the *Aspergillus nidulans* cutinolytic system by multiplex Qpcr molecular biotechnology. Sometido.
- Bodzon-Kulakowska A, Bierzynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik, A, Suder P, Nogan M, Jarzebinska J & Silberring J (2006). Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatogr B*. 849:1-31.
- Bowler RP & Crapo JD (2002). Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 110(3):349-56.
- Burger G, Strauss J, Scazzocchio C & Lang BF (1991). *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol Cell Biol* 11:5746–5755.
- Burns RA (2003). Fundamentos de química. Editorial Pearson Educación. México. pp. 168.
- Caddick MX (2004). Nitrogen regulation in mycelial fungi. In: Brambl R, Marzluf GA (eds). *The Mycota: biochemistry and molecular biology*, vol III, 2nd edn, The Mycota. Springer, Berlin, pp. 349–368.
- Cambou B & Klibanov A (1984). Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media. *J Am Chem Soc* 106(9):2687-2692.

- Carvalho CML, Serralheiro MLM, Cabral JMS & Aires-Barros MR (1997). Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. *Enzyme Micro Technol* 21(2):117-123.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR & Cabral JMS (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng* 66(1):17-34.
- Casado CG & Heredia A (1999). Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). *J Exp Bot* (50): 175–182.
- Castro-Ochoa LD, Peña-Montes C, González-Canto A, Alva-Gasca A, Esquivel-Bautista R, Navarro-Ocaña A & Farrés-González Sarabia A (2012). AN CUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Appl Biochem Biotechnol* 166:1275-1290.
- Castro-Ochoa LD, Peña-Montes C, Farrés-González Sarabia A (2010). Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 13(1):16-20.
- Cerniglia CE (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol* 30:31-71.
- Chang PK, Yu J, Bhatnagar D & Cleveland TE (2000). Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene, *areA*. *Biochim Biophys Acta* 1491:263–266.
- Chang PK & Todd RB (2004). Metabolic pathway regulation. In: Arora DK (ed.) *Handbook of fungal biotechnology*, vol 20, 2nd edn, Mycology series. Marcel Dekker, New York, pp. 25–37.
- Chen S, Tong X, Woodward RW, Du G, Wu J & Chen J (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem* 283:25854-25862.
- Chen Z, Franco CF, Baptista RP, Cabral JMS, Coelho AV, Rodrigues Jr. CJ & Melo EP (2007). Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1306–1313.

- Chen S, Su L, Chen J & Wu J (2013). Cutinases: characteristics, preparation and application. *Biotechnol Adv* 19, 1754-1767.
- Coleman M, Henricot B, Arnau J & Oliver RP (1997). Starvation-induced genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are also induced during growth in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 10:1106–1109.
- Cooper TG (1982). Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Vol. 2, *Metabolism and Gene Expression* (Ed. by JN Strathern, EW Jones & JR Broach) pp. 399-461. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Croteau R & Kolattukudy PE (1974). Direct evidence for the involvement of epoxide intermediates in the biosynthesis of the cl, family of cutin acids. *Arch Biochem Biophys* 162:471-480.
- Davies KJ (2000). An overview of oxidative stress. *IUBMB Life* 50(4-5):241-4.
- Davies KJ (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50(4-5):279-89.
- Deacon JW (1984). Introduction to Modern Mycology, 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Deas AHB, Baker EA & Holloway PJ (1974). Identification of 16-hydroxyoxohexadecanoic acid monomers in plant cutins. *Phytochem* 13:1901-1905.
- Donofrio NM, Oh Y, Lundy R, Pan H, Brown DE, Jeong JS, Coughlan S, Mitchell TK & Dean RA (2006). Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* 43:605–617.
- Du C, Sarfati J, Latge JP & Calderone R (2006). The role of the sakA (Hog1) and tcsB (sln1) genes in the oxidant adaptation of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 44:211–218.
- Dutta K, Sen S & Veeranki VD (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Proc Biochem* 44:127-134.

- Egmond, MR & de Vlieg J (2000). *Fusarium solani* cutinase. *Biochimie* 82:1015-1021.
- Empel J, Sitkiewicz I, Andrukiewicz A, Lasocki K, Borsuk P & Weglenski P (2001). *arcA*, the regulatory gene for the arginine catabolic pathway in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 266:591–597.
- Esqueda-Domínguez KL (2012). Producción, identificación y caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Farah Diba AB *et al.* (2005). Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. *Asia Pacific J Biol Biotechnol* 13(2):63-69.
- Fett WF, Wijey C, Moreau RA & Osman SF (1999). Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730. *J Appl Microbiol* (86):561–568.
- Fett WF, Wijey C, Moreau RA & Osman SF (2000). Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Lett Appl Microbiol* 31:25-9.
- Fiechter A, Fuhrmann GF & Kappeli O (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microb Physiol* 22:123-183.
- Flipsen JAC, van der Hijden HTWM & Verheij HM (1996). Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterization of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop densitometer as a tool to lipase kinetics. *Chem Phys Lipids* 84:105-115.
- Flipsen JAC, Appel ACM, van der Hijden HTWM & Verrips CT (1998). Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in a sequential laundry wash process. *Enzyme Micro Technol* 23(3-4):274- 280.
- Forment JV, Flipphi M, Ventura L, Gonzalez R, Ramon D & MacCabe AP (2014). High affinity glucose transport in *Aspergillus nidulans* is regulated by the products of two related but differentially expressed genes. *PLoS One* 9, e94662.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Bastürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scazzocchio

C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fisher R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA & Birren BW (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* (438):1105-15.

- Garraway MO & Evans RC (1984). *Fungal Nutrition and Physiology*. Wiley, New York.
- Gerik KJ, Bhimireddy SR, Ryerse JS, Specht CA & Lodge JK (2008). PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 7:1685–1698.
- Gonçalves AM *et al.* (1999). Stability studies of a recombinant cutinase immobilized todextran and derivatized silica supports. *Enzyme Microb Technol* 24(1-2):60-66.
- Gonçalves APV, Lopes JM, Lemos F, Prazeres DMF, Cabral JMS & Aires-Barros MR (1996). On the importance of the support material for the hydrolysis of triglycerides with a recombinant cutinase. Proceedings of the III Congreso Ibérico de Biotecnología. Valladolid, Spain. pp. 217-220.
- Görg A, Weiss W & Dunn MJ (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4:3665-3685.
- Gostincar C, Grube M, de Hoog S, Zalar P & Gunde-Cimerman N (2010). Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS Microbiol Ecol* 71:2–11.
- Guo BZ, Russin JS, Cleveland TE, Brown R & Damann KE (1996). Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Phytopathol* 86:824-829.
- Hagiwara D, Sakamoto K, Abe K & Gom K (2016). Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the

post-genomic era. *Biosci, Biotechnol and Biochem*. Vol. 80, No. 9, 1667-1680.

- Halliwell B (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31(4):261-72.
- Hansberg W (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 26:19-54.
- Hijden V, Marugg HTJD, Warr JF, Klugkist J, Musters W & Hondmann DHA. Enzyme- containing surfactants compositions. Unilever patent WO 9403578. 94.02.
- Hiscock SJ, Dewey FM, Coleman JOD & Dickinson HG (1994). Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* 193:377-384.
- Hoffmeister D (2016). The Mycota III. K. Esser (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology* 3rd Edición. Suiza, Springer. pp. 105-107, 281-284, 321-324.
- Holloway P (1973). Cutins of *Malus pumila* fruits and leaves. *Phytochem*. 12:2913-2920.
- Huang SJ (1995). Polymer waste management-biodegradation, incineration, and recycling. *J Macromol Sci A* 32:593-597.
- Inderjeet K, Mathur RP, Tandon SN & Prem D (1997). Identification of metabolites of malathion in plant, water and soil by GC-MS. *Biomed. Chromatogr*. 11:352-355.
- Jennings DH (1984). Polyol metabolism in fungi. *Adv Microb Physiol* 25:149-193.
- Jeong GT & Park DT (2008). Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol. *Appl Biochem Biotechnol* 148:131-139.
- Käfer E (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and chromosomal aberrations. *Adv Genet*. 19:33-131.
- Kamata H & Hirata H (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11(1):1-14.

- Kawasaki WL (1998). Las catalasas y la respuesta antioxidante durante el crecimiento y la diferenciación en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Kawasaki L, Sanchez O, Shiozaki K & Aguirre J (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 45:1153–1163.
- Kim Y, Jeewon L & Seung-Hyeon M (2003). Uniqueness of microbial cutinases in hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters. *J Microbiol Biotech* 13:57-63.
- Kim YH, Ahn JY, Moon SH & Lee J (2005). Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Chemosphere* 60:1349-1355.
- Kim H & Woloshuk CP (2008). Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 45:947–953.
- Kinghorn JR & Pateman JA (1975). Studies of partially repressed mutants at the *tamA* and *areA* loci in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 140:137–147.
- Kolattukudy PE (1970). Biosynthesis of a lipid polymer, cutin: the structural component of plant cuticle. *Biochem Biophys Res Commun* 41:299-305.
- Kolattukudy P *et al.* (1991). Cutinase cleaning compositions. US Patent 4, 981, 611.
- Kroll K, Pätz V & Kniemeyer O (2013). Elucidating the fungal stress response by proteomics. *Proteomics* 97:151-163.
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martinez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davies RW & Arst HN Jr (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBOJ* 9:1355–1364.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Lamb TM, Finch KE & Bell-Pedersen D (2012). The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor ASL-1 contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes. *Fungal Genet Biol* 49:180–188.
- Langrand G, Triantaphylides C & Barratti J (1988). Lipases catalized formation of flavour esters. *Biotechnol Lett* 10(8):549-554.
- Lara-Rojas F, Sánchez O, Kawasaki L & Aguirre J (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol Microbiol* 80:436–454.
- Lee D & Whiteley C (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme Micro Technol.* 38:291-316.
- Lee MH, Chiu CM, Roubtsova T, Chou CM & Bostock RM (2010). Overexpression of a Redox-Regulated Cutinase Gene, MfCUT1, Increases Virulence of the Brown Rot Pathogen *Monilia fructicola* on *Pronus spp.* *Phytopathology* 23(2):176-186.
- Lee SC, Ni M, Li W, Shertz C & Heitman J (2010). The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(2):298-340.
- Lee IR, Chow EW, Morrow CA, Djordjevic JT & Fraser JA (2011). Nitrogen metabolite repression of metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 188:309–323.
- Lin TS & Kolattukudy PE (1978). Induction of a Biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *J Bacteriol* 133(2):942-951.
- Lin TS & Kolattukudy PE (1980^a). Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. *Phys Plant Pathol* 17:1-15.
- Liu L, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss GL, Kong X, Gross R & Montclare JK (2009). Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and

hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J Am Chem Soc* 131:15711–15716.

- Lopez-Berges MS, Rispaill N, Prados-Rosales RC & Di Pietro A (2010a). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell* 22:2459–2475.
- Maeda H, Yamagata Y, Abe K, Hasegawa F, Machida M, Ishioka R, Gomi K & Nakajima T (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:778–788.
- Maiti IB, Kolattukudy PE & Shaykh M (1979). Purification and characterization of a novel cutinase from Nasturtium (*Tropaeolum majus*) pollen. *Arch Biochem Biophys* 196:412–423.
- Mark CG & Romano AH (1971). Properties of the hexose transport systems of *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 249, 216-226.
- Martínez C, de Geus P, Lauwereys M, Matthyssens G & Cambillau C (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* 356:615-618.
- Marzluf GA (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:17–32.
- Masaki K, Kamini NR, Ikeda H & Lefuji H (2005). Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus sp.* strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and others biodegradable plastics. *Appl Environ Microbiol* 71(11):7548-7550.
- May GS (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways in *Aspergillus*. In: Goldman GH, Osmani SA (eds) *The Aspergilli genomics, medical aspects, biotechnology and research methods*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 143–175.
- Mihlan M, Homann V, Liu TW & Tudzynski B (2003). AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* 47:975–991.
- Missall TA, Pusateri ME, Donlin MJ, Chambers KT, Corbett JA & Lodge JK (2006). Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric

oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. *Eukaryot Cell* 5:518–29.

- Montibus M, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F, Barreau C & Ponts N (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit Rev Microbiol* 41(3):295-308.
- Morales-García SL (2015). Purificación y caracterización de la enzima recombinante AN CUT2 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Murphy CA, Cameron JA, Huang SJ & Vinopal RT (1996). *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl Environ Microbiol* 62(2): 456-460.
- Nardini M & Dijkstr BW (1999). α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struc Biol* 9:732-737.
- Nawrath C (2006). Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr Opin Plant Biol* 9:281-287.
- Nyon MP, Rice DW, Berrisford JM, Hounslow AM, Moir AJG, Huang H, Nathan S, Mahadi NM, Abu Bakar FD & Craven CJ (2009). Catalysis by *Glomerella cingulata* cutinase requires conformational cycling between the active and inactive states of its catalytic triad. *J Mol Biol* 385:226–235.
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa LD & Farrés A (2008). Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(4):603-12.
- Peña-Montes C *et al.* (2009). Differences in biocatalytic behavior between two variants of Stc1 esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. *J Mol Catal B: Enzym* 61(3-4):225-234.
- Pio TF & Macedo GA (2007). Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporium* using response Surface methodology. *Enzyme Micro Technol* 41:613-9.
- Pio TF & Macedo GA (2009). Cutinases: properties and industrial applications. *Adv App Microbio* 66:77-95.

- Pokorska A, Drevet C & Scazzocchio C (2000). The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation sequence. *J Mol Biol* 298:585–596.
- Purdy RE & Kolattukudy PE (1975). Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and nonspecific esterase from *Fusarium solani* f.sp. *pisii*. *Biochem* 14:2824-2831.
- Rettich F (1980). Residual toxicity of wall-sprayed organophosphates, carbamates, and pyrethroids to mosquito. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 24, 110-117.
- Richmond DV & Martin JT (1959). Studies on plant cuticle: the composition of the cuticle of apple leaves and fruits. *Ann Appl Biol* 47:583–592.
- Rittenour WR, Si H & Harris SD (2009). Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol Rev* 23:20–29.
- Scherer M, Wei H, Liese R & Fischer R (2002). *Aspergillus nidulans* Catalase-Peroxidase Gene (*cpeA*) is Transcriptionally Induced during Sexual Development through the Transcription Factor StuA. *Eukaryot Cell*. 1(5):725-735.
- Schönig B, Brown DW, Oeser B & Tudzynski B (2008). Cross-species hybridization with *Fusarium verticillioides* microarrays reveals new insights into *Fusarium fujikuroi* nitrogen regulation and the role of AreA and NMR. *Eukaryot Cell* 7:1831–1846.
- Sebastian J & Kolattukudy PE (1988). Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Arch Biochem Biophys* 263:77-85.
- Seo HS *et al.* (2007). *Pseudozyma jejuensis* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Res* 7(6):1035-1045.

- Sharma R, Chisti Y & Banerjee UC (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19(8):627-662.
- Skamnioti P, Furlong RF & Gurr SJ (2008). Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. *New Phytol* 180:711-21.
- Solis-Baez I (2015). Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante AN CUT1 producida en *Pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Speranza P, de Oliveira P, Alves G (2011). Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium sp.* *J Mol Catal B: Enzymatic* 72:181-186.
- Stamatis H, Sereti V & Kolisis FN (1999). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 76(12): 1505-1510.
- Stamatis H, Sereti V & Kolisis FN (2001). Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J Mol Catal B: Enzym* 11:323-328.
- Stark RE & Tian S (2006). The cutin biopolymer matrix. In: M Riederer, C Müller, eds. *Biol Plant Cut*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford. pp. 126–144.
- Stewart GG & Russell I (1983). Aspects of the biochemistry and genetics of sugar and carbohydrate uptake by yeasts. In: *Yeast Genetics-Fundamental and Applied Aspects* (Ed. by JFT Spencer, DM Spencer & ARW Smith) pp. 461-484. Springer-Verlag, New York.
- Suarez T, de Queiroz MV, Oestreicher N & Scazzocchio C (1995). The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14:1453–1467.

- Taiz L & Zeiger E (2002). *Plant Physiology*. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. pp. 690.
- Tollervey DW & Arst HN Jr (1982). Domain-wide, locus-specific suppression of nitrogen metabolite repressed mutations in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 6:79–85.
- Trail F & Koller W (1990). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiol Mol Plant Pathol* 36:495-508.
- Trail F & Köller W (1993). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 42:205–220.
- Tudzynski B, Homann V, Feng B & Marzluf GA (1999). Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol Gen Genet* 261:106–114
- Vasudevan PT & Briggs M (2008). Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:421- 430.
- Vega Pérez FP (2013). Purificación y caracterización de la cutinasa AN CUT1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura, Química en Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
- Vergara-Barroso P (2010). Inmovilización de esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis Maestría en Ciencias. Facultad de Química, UNAM.
- Vitalini MW, de Paula RM, Goldsmith CS, Jones CA, Borkovich KA & Bell-Pedersen D (2007). Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18223–18228.
- Voegelé RT, Struck C, Hahn M & Mendgen K (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus. *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8133–8138.
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA & Riederer M (2004). Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-

long--ketoacyl-CoA synthase. *J Exp Bot* 55:1401-1410.

- Walton TJ & Kolattukudy PE (1972). Determination of the structure of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochem* 11:1885-1897.
- Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD, Lee YM & Bostock RM (2000). Affinity purification and characterization of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Arch Biochem Biophys* 382:31–38.
- Wei HK, Vienken R, Weber R, Bunting S, Requena N & Fischer R (2004). A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet Biol* 41:148–156.
- Welsh WW, Murray WD & Williams RE (1989). Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Crit Rev Biotechnol* 9:105-169.
- Whitten KW, Davis RE, Peck ML & Stanley GG (2008). Química, 8° Edición. Cengage Learning. pp. 348-357, 784-786.
- Wong KH, Hynes MJ & Davis MA (2008). Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryot Cell* 7:917–925
- Zhang Y, Lamm R, Pillonel C, Lam S & Xu JR (2002). Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* *os-2* gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Environ Microbiol* 68:532–538.

ANEXO A

Tabla A1. Composición del medio mínimo para el crecimiento de *A. nidulans* PW1 (Käfer, 1977).

Compuesto	Concentración	Solución stock
Sales 20x	50 mL/L	
Elementos traza	1 mL/L	
Glucosa	10 g	
Agar	12.5 g	
Requerimientos		
Arginina	5 mL/L	16.8% w/v
Biotina	0.5 mL/L	0.05%
Metionina	1 g/L	---

La composición de la solución de sales 20x y de elementos traza 100x se especificaran en las siguientes tablas:

Tabla A2. Composición de la solución de sales 20x para el crecimiento de *A. nidulans* PW1 (Käfer, 1977).

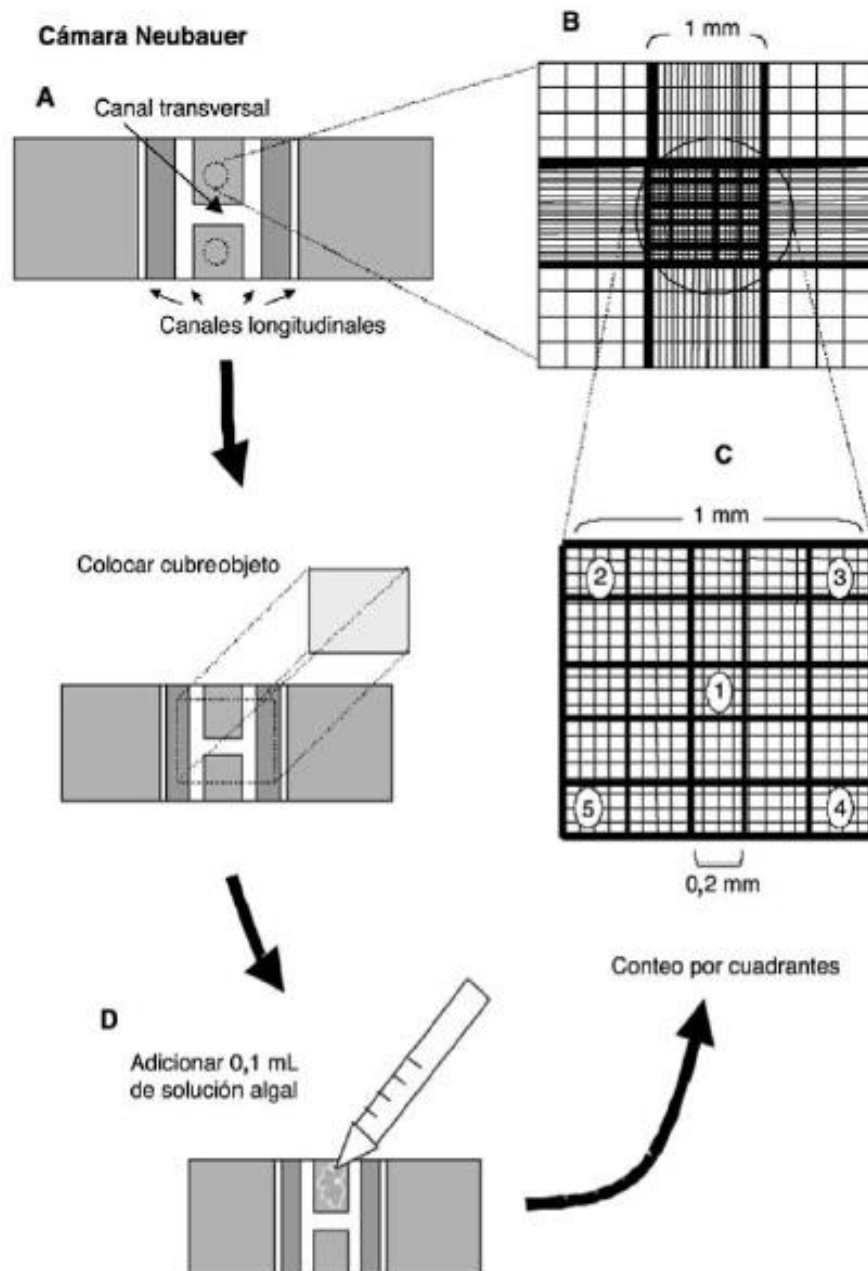
Compuesto	Concentración
NaNO ₃	120 g/L
KCl	10.4 g/L
MgSO ₄ • 7H ₂ O	10.4 g/L
KH ₂ PO ₄	30.4 g/L

Tabla A3. Composición de la solución de elementos traza para el crecimiento de *A. nidulans* PW1 (Käfer, 1977).

Compuesto	Cantidad por 100 mL
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	2.20 g
H ₃ BO ₃	1.10 g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.50 g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.50 g
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.16 g
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	0.11 g
Na ₄ EDTA	5 g

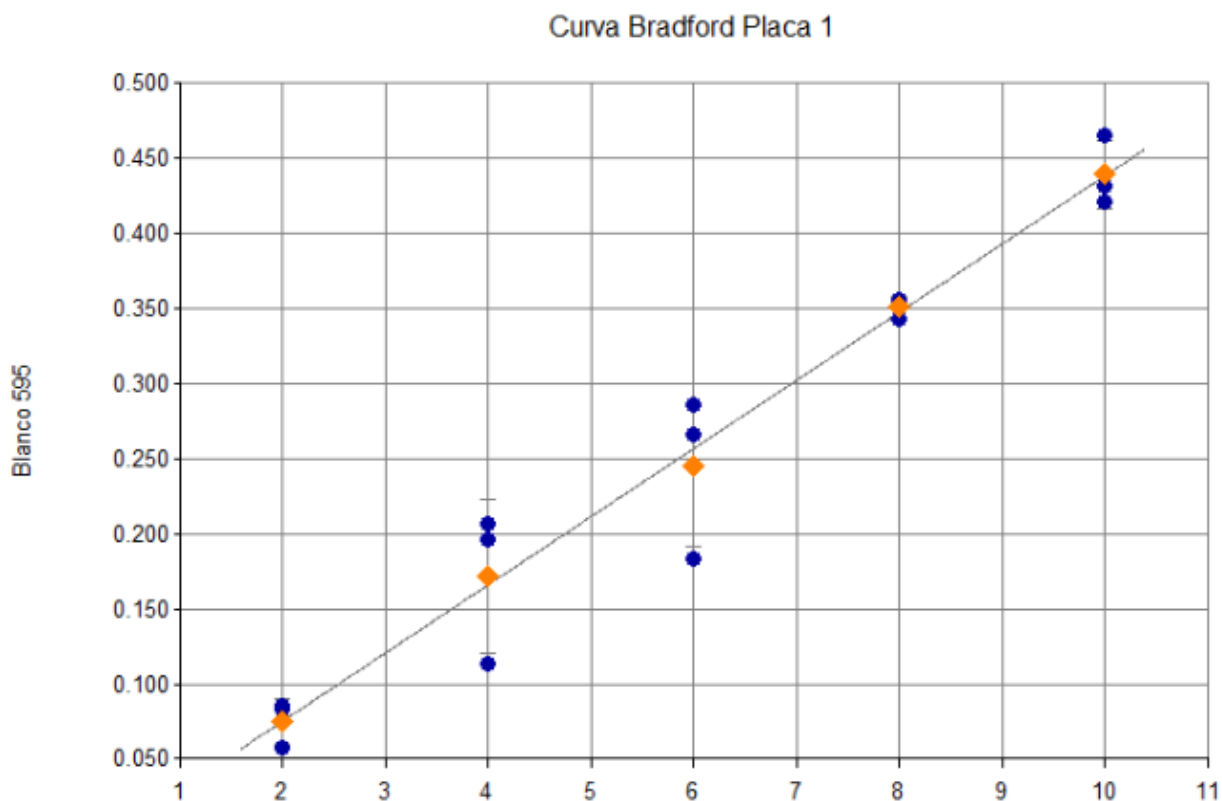
ANEXO B

Cámara de Neubauer o Hematocitómetro para conteo de esporas.



ANEXO C

Curva de calibración para cuantificación de la concentración de proteína por método el método de Bradford.



Curva	Formula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
Bradford (BSA)	$Y = A \cdot X + B$	0.0454	-0.0158	0.998

ANEXO D

Tabla D1. Composición del buffer de rehidratación (RH)

Reactivo	Concentración
Urea	8 M
DTT	10 mM
Chaps	0.5-2%
Anfolitos	1%

Se realizó en campana, con una parrilla en agitación, hasta la disolución completa de cada reactivo.

ANEXO E

Tabla E1. Programa para el IEF, para tiras de 11cm.

Paso	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	250	Gradual	50	2:00	HH:MM
2	500	Gradual	50	1:00	HH:MM
3	1000	Rápido	50	0:30	HH:MM
4	8000	Lineal	50	2:00	HH:MM
5	8000	Rápido	50	10000	Volt Hr
6	750	Sostener	50		

Tabla E2. Programa para el IEF, para tiras de 17cm.

Paso	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	250	Gradual	50	2:00	HH:MM
2	500	Gradual	50	1:00	HH:MM
3	1000	Rápido	50	0:30	HH:MM
4	10000	Lineal	50	2:00	HH:MM
5	10000	Rápido	50	10000	Volt Hr
6	1000	Sostener	50		

ANEXO F

Tabla F1. Resultados analizados del gel 2D, con el programa Scaffold.

No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología
Entre: 17-18 pH 5 Spot 1ROSC	ANCUT1	AN5309	QITGNELR	87.80	100
			TKIICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGKL	87.80	100
			LRKPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	87.80	100
			KPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	87.80	100
			GSTELGYLGSTVGPATCNVLK	87.80	100
			IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGK	87.80	100
			SLFELAASKPNTK	87.80	100
			QDGGRIPIFNPTDK	87.80	100
			NKQDGGRIPIFNPTDK	87.80	100
			IVAGGYSQGAAVMHAAISTLSSTVQDQIK	87.80	100
			IPNPTDKTK	87.80	100
IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGKL	87.80	100			
DGSCHDVTFIFAR	87.80	100			
IVAGGYSQGAAVMHAAISTLSSTVQDQIKGVVLFGDTR	87.80	100			
			87.80	100	
	ANCUT1-ANCUT2	AN5309 AN7541	GVVLFGDTR SLFELAASK	87.80 87.80	100 100
	ANCUT4	AN10346	GTTEIGNMGTVVGPK	2.19	99.10
	Catalasa B	XP_682608.1	GSTLLEDFIFR FSTVAGSR FDHERVPER DVHGFATR	4.99 4.99 4.99 4.99	96.10 100 100 100
	Oxidorreductasa	AN7193	EVAEGIKR	2.40	100
	Peroxirredoxina	XP_681961.1	ANGVKNDLILFLSDPEAK	10.70	99.10
	SOD	XP_657845.1	LIGAESVLGR TLVVHAGTDDLGRGDSEESK	5.62 11.20	99.10 99.60
	Tiorredoxina (Trx)	XP_657774.1	VSDVVGANPGALEAGIK FAQTYTDASFYQIDVDELSEVAELGIR AIAPTVEK	48.20 48.20 48.20	100 100 100
	Ytp1	AN3714	YGLITLLR	24.30	100
	Factor hipotético de respuesta a EO	AN1390	TVNAGEADGEAKDV	17.30	97.80
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología
Entre: 17-18 pH 5.5 Spot 2ROSC	ANCUT1	AN5309	IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGKL	87.80	100
			DGSCHDVTFIFAR	87.80	100
			QITGNELR	87.80	100
			TKIICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGKL	81.70	100
			LRKPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	81.70	100
			KPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	87.80	100
			GSTELGYLGSTVGPATCNVLK	81.70	100
			SLFELAASKPNTK	81.70	100
			QDGGRIPIFNPTDK	87.80	100
			NKQDGGRIPIFNPTDK	81.70	100
			IVAGGYSQGAAVMHAAISTLSSTVQDQIK	87.80	100
			IPNPTDKTK	81.70	100
			IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGKL	81.70	100
			DGSCHDVTFIFAR	87.80	100
			IVAGGYSQGAAVMHAAISTLSSTVQDQIKGVVLFGDTR	81.70	100
			QDGGRIPIFNPTDKTK	87.80	100
			KPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAKSLF ELAASK	81.70	100
			TKIICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGK	81.70	100
			ANCUT2	AN7541	YTAGLAENALPQGTSSAINEAK

	ANCUT1-ANCUT2	AN5309 AN7541	GVVLFGDTR SLFELAASK	87.80 87.80	100 100	
	ANCUT4	AN10346	GTTEIGNMGTVVGPK SQKPDNIDQFK	3.79 3.79	100 100	
	Catalasa B	XP_682608.1	GSTLLEDFIFR FSTVAGSR FDHERVPER DVHGFATR	4.99 4.99 4.99 4.99	100 100 100 100	
	Oxidorreductasa	AN7193	EVAEGIKR HLDLATIYQNQR	5.99 5.99	100 100	
		AN5563	LSNGVTIPAVGFGTFASEGASGETYR TLNEIAQK	8.00 2.46	98.90 93.30	
	SOD	XP_657845.1	LIGAESVLGR TLVVHAGTDDLGRGDSEESK TLVVHAGTDDLGRGDSEESKK HVGDLGNFKTDAEGNSK	5.62 21.30 21.30 21.30	98.90 100 100 100	
			XP_657774.1	VSDVVGANPGALEAGIK	15.50	99.70
			XP_681899.1	FENVNGTVNETGR	9.49	98.90
	Tiorredoxina reductasa	XP_661185.1	TADAVIIATGANAR FGTEVITETISR	7.30 7.30	100 100	
	hogA ortólogo, AtfA	AN1017	ELKLLKHLR	2.37	94.80	
Ytp1	AN3714	YGLITLLR	29.00	100		
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología	
Spot 3ROSC	Entre: 17-18 pH 6	ANCUT1	AN5309	QITGNELR	87.80	100
				TKIICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGKL	87.80	100
				LRKPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	87.80	100
				KPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	87.80	100
				GSTELGYLGSTVGPATCNVLK	87.80	100
				IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGK	87.80	100
				SLFELAASKCPNTK	87.80	100
				QDGGRIPNFPTDK	87.80	100
				NKQDGGRIPNFPTDK	87.80	100
				IVAGGYSQGAAVMHAIAISTLSSTVQDQIK	87.80	100
IPNFPTDKTK	87.80	100				
IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGKL	87.80	100				
DGSCHDVTFIFAR	87.80	100				
IVAGGYSQGAAVMHAIAISTLSSTVQDQIKGVVLFGDTR	87.80	100				
QDGGRIPNFPTDKTK	87.80	100				
KPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAKSLF	87.80	100				
ELAASK						
TKIICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGK	87.80	100				
ANCUT1-ANCUT2	AN5309 AN7541	GVVLFGDTR SLFELAASK	87.80 87.80	100 100		
ANCUT4	AN10346	GTTEIGNMGTVVGPK	2.19	98.50		
Catalasa B	XP_682608.1	GSTLLEDFIFR FSTVAGSR HVDGFGVHTFR	4.16 4.16 4.16	100 100 100		
Oxidorreductasa	AN7193	EVAEGIKR HLDLATIYQNQR AYKDIPGLKR	8.98 8.98 8.98	100 100 100		
		AN5563	TLNEIAQK KALEVGYR GYVVLPK ALEVGYR LSNGVTIPAVGFGTFASEGASGETYR	15.10 15.10 15.10 15.10 8.00	100 100 100 100 98.60	
			SOD	XP_657845.1	LIGAESVLGR TLVVHAGTDDLGRGDSEESK TLVVHAGTDDLGRGDSEESKK HVGDLGNFKTDAEGNSK TLVVHAGTDDLGR	32.60 32.60 32.60 32.60 32.60

			THGAPEDEVHRVGDLDGNFKTDAEGNSK THGAPEDEV HVGDLGNFK	32.60 32.60 32.60	100 100 100	
	Tiorredoxina (Trx)	XP_657774.1	VSDVVGANPGALEAGIK	15.50	98.50	
	Tiorredoxina reductasa	XP_661185.1	TADAVIATGANAR FGTEVITETISR VVIIGSGPAAHATAIYLSR	12.60 12.60 12.60	100 100 100	
		XP_681487.1	ATDSTGAEY TAR	3.12	98.50	
	Ytp1	AN3714	YGLITLLR	23.10	100	
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología	
Spot 4ROSC	En:17 pH 6.3	ANCUT1	AN5309	QITGNELR	87.80	100
				LRKPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	87.80	100
				KPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK	87.80	100
				GSTELGYLGSTVGPATCNV LK	87.80	100
				IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGK	87.80	100
				SLFELAASKCPNTK	87.80	100
				QDGGGRIPNFPTDK	87.80	100
				NKQDGGGRIPNFPTDK	87.80	100
				IVAGGYSQGAAMHAAISTLSSTVQDQIK	87.80	100
				IPNFPTDKTK	87.80	100
IICAFGDLVCEGLVITAHAHLSYIDDPDAADFLVGK	87.80	100				
DGSCHDVTFIFAR	87.80	100				
QDGGGRIPNFPTDKTK	87.80	100				
ANCUT1-ANCUT2	AN5309 AN7541	GVLFGDTR SLFELAASK	87.80 87.80	100 100		
Catalasa B	XP_682608.1	GSTLLEDFIFR FSTVAGSR	2.63 2.63	100 100		
Oxidorreductasa	AN7193	HLDLATIYQNQR	15.30	100		
		AVAEASKR AIGVSNHTVEHLEAIINATGVVPAANQIER	15.30 15.30	100 100		
	AN5563	TLNEIAQK	19.10	100		
		KALEVGYR GYVVLPK ALEVGYR	19.10 19.10 19.10	100 100 100		
		LSNGVTIPAVGFGTFASEGASGETYR LYEDKLAR VSENKTLNEIAQK	19.10 19.10 19.10	100 100 100		
SOD	XP_657845.1	LIGAESVLGR TLVVHAGTDDLGRGDSEESK TLVVHAGTDDLGRGDSEESKK HVGDLGNFKTDAEGNSK THGAPEDEVHRVGDLDGNFKTDAEGNSK TLVVHAGTDDLGR THGAPEDEV HVGDLGNFK HVGDLGNFKTDAEGNSKGSK GSKTDKLIK GFHIIHQFGDNTNGCTSAGPHFNPF GK	52.20 52.20 52.20 52.20 52.20 52.20 52.20 52.20 52.20 52.20 52.20	100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100		
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología	
Entre: 23-25 pH 6	ANCUT1	AN5309	QITGNELR	62.90	100	
			LRKPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK KPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTNQAINEAK GSTELGYLGSTVGPATCNV LK SLFELAASKCPNTK NKQDGGGRIPNFPTDK IVAGGYSQGAAMHAAISTLSSTVQDQIK IPNFPTDKTK	62.90 62.90 62.90 62.90 62.90 62.90 62.90	100 100 100 100 100 100 100	
ANCUT1-ANCUT2	AN5309 AN7541	GVLFGDTR SLFELAASK	62.90 62.90	100 100		

Spot 5ROSC	Catalasa B	XP_682608.1	GSTLLEDFIFR LVTEDGSTKLVK FGFDLFDPTK FLDRFALDSDE	4.57 4.57 4.57 1.52	100 100 100 99.40
	Oxidorreductasa	AN7193	EVAEGIKR HLDLATIYQNQR	5.99 5.99	100 100
	SOD	XP_657845.1	TLVVHAGTDDLGRGDSEESK TLVVHAGTDDLGRGDSEESKK HVGDLGNFKTDAEGNSK	21.30 21.30 21.30	100 100 100
	Tiorredoxina reductasa	XP_681487.1	ATDSTGAEY TAR KVVLATGVVDILPSTPGLIEGFGK	9.35 9.35	100 100
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología
Entre: 29-33 pH 5-5.5	Catalasa B	XP_682608.1	FENANVK FGKPVAALGSGSTAFDNAGINTAVEGVYVADAVDESFA NNLEEGTLVFK LQSLAGLK AELSNDNLDVIVVAER ISNDLATR QFVVNAIR SAANSSSTLYPAGRPLEILVDAFR SDVVKNNVIVQLNR	18.60 18.60 18.60 18.60 18.60 18.60 18.60 18.60 18.60	100 100 100 100 100 100 100 100 100
Spot 6ROSC					
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología
Entre: 29-33 pH 5.5	Catalasa B	XP_682608.1	FSTVAGSR FLDRFALDSDE FGKPVAALGSGSTAFDNAGINTAVEGVYVADAVDESFA NNLEEGTLVFK LQSLAGLK	9.00 8.31 9.00 9.00 9.00	100 100 100 100 100
Spot 7ROSC	Oxidorreductasa	AN5563	TLNEIAQK	2.46	93.70
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología
Entre: 29-33 pH 5-5.5	ANCUT1	AN5309	IPNFPTDKTK	4.69	98.90
Spot 8ROSC	Catalasa B	XP_682608.1	FLDRFALDSDE	19.70	100
			FENANVK	19.70	100
			FGKPVAALGSGSTAFDNAGINTAVEGVYVADAVDESFA	19.70	100
			NNLEEGTLVFK	19.70	100
			LQSLAGLK	19.70	100
			AELSNDNLDVIVVAER	19.70	100
			ISNDLATR	19.70	100
			NNVIVQLNR	19.70	100
			QFVVNAIR	19.70	100
			SAANSSSTLYPAGRPLEILVDAFR	19.70	100
SDVVKNNVIVQLNR	19.70	100			
TANGNLVR	19.70	100			
No. spot/ PM (kDa) pI	Proteína identificada	Código	Péptidos	% Cobertura	% Homología
Entre: 29-33 pH 5.5	Catalasa B	XP_682608.1	FSTVAGSR FENANVK FGKPVAALGSGSTAFDNAGINTAVEGVYVADAVDESFA NNL LQSLAGLK	9.97 9.97 9.97 9.97	100 100 100 100
Spot 9ROSC					