



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis del secretoma de *Aspergillus flavus* CECT 2687 y *Aspergillus flavus* NRRL 6541
utilizando como sustrato granos de maíz mexicano

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
SOLÍS CRUZ ANGÉLICA

TUTOR PRINCIPAL
AGUILAR OSORIO JOSÉ GUILLERMO DE JESUS
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
RUÍZ TERÁN FRANCISCO
Facultad de Química, UNAM

ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Instituto de Química, UNAM

Ciudad de México, octubre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Coria Ortega Roberto

VOCAL

Navarro Ocaña Arturo

VOCAL

Martínez Barajas Eleazar

VOCAL

Peraza Reyes Carlos Leonardo

SECRETARIO

Plascencia de la Parra Francisco Javier

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E Laboratorio 312, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Guillermo Aguilar Osorio

SUSTENTANTE

Q.F.B. Angélica Solís Cruz

CONTENIDO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 3. MARCO TEORICO..... | 3 |
| 3.1 Generalidades de los hongos filamentosos..... | 3 |
| 3.2 El género <i>Aspergillus</i> | 4 |
| 3.2.1 <i>Aspergillus flavus</i> | 5 |
| 3.3 Factores de virulencia de <i>Aspergillus flavus</i> | 7 |
| 3.3.1 Aflatoxinas..... | 8 |
| 3.3.2 Oxilipinas..... | 12 |
| 3.3.3 Enzimas hidrolíticas..... | 12 |
| 3.4 La planta de maíz..... | 15 |
| 3.4.1 Aspectos botánicos..... | 15 |
| 3.4.2 Origen y distribución..... | 15 |
| 3.4.3 Descripción botánica de la semilla del maíz..... | 16 |
| 3.4.4 Composición química del grano de maíz..... | 18 |
| 3.4.4.1 Carbohidratos simples..... | 19 |
| 3.4.4.2 Carbohidratos complejos (polisacáridos)..... | 20 |
| 3.4.4.2.1 Almidón..... | 20 |
| 3.4.4.2.2 Celulosa..... | 21 |
| 3.4.4.2.3 Hemicelulosa..... | 21 |
| 3.4.4.2.4 Pectina..... | 22 |
| 3.4.4.3 Lignina..... | 23 |
| 3.4.4.4 Proteínas..... | 24 |
| 3.4.4.5 Lípidos..... | 25 |
| 3.4.4.6 Vitaminas liposolubles..... | 25 |
| 3.4.4.7 Vitaminas hidrosolubles..... | 25 |
| 3.4.4.8 Minerales..... | 26 |
| 3.4.4.9 Antocianinas..... | 26 |
| 3.5 Tipos de maíz..... | 27 |
| 3.6 Microbiota del maíz..... | 29 |
| 3.7 Infección de <i>Aspergillus flavus</i> en los granos de maíz..... | 30 |
| 3.8 Proteómica..... | 31 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. OBJETIVOS..... | 33 |
| 4.1 Objetivo General..... | 33 |
| 4.2 Objetivos particulares | 33 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 34 |
| 6. HIPOTESIS..... | 35 |
| 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 36 |
| 8. METODOLOGIA EXPERIMENTAL..... | 37 |
| 8.1 Recuperación de microorganismos | 37 |
| 8.2 Granos de maíz | 37 |
| 8.3 Cultivo de microorganismos | 37 |
| 8.4 Cosecha y cuenta de esporas | 38 |
| 8.5 Cultivo en medio sólido..... | 38 |
| 8.5.1 Extracción de las enzimas secretadas en el medio solido | 38 |
| 8.6 Cultivo en medio liquido | 39 |
| 8.7 Ensayo de selección de granos resistentes (KSA, “Kernel Screening Assay”)..... | 39 |
| 8.7.1 Cultivo en los granos de maíz | 40 |
| 8.7.2 Extracción de las enzimas secretadas por el hongo en el grano de maíz | 41 |
| 8.8 Determinación de actividades enzimáticas..... | 41 |
| 8.8.1 Determinación de la actividad xilanolítica..... | 42 |
| 8.8.2 Determinación de la actividad exopectinolítica..... | 42 |
| 8.8.3 Actividad celulolítica. | 42 |
| 8.8.4 Determinación de la actividad amilolítica | 43 |
| 8.9 Medición de proteína por el método de Bradford..... | 43 |
| 8.10 Preparación para las muestras de los geles SDS-PAGE | 43 |
| 8.11 Obtención de geles de SDS-PAGE | 44 |
| 8.12 Zimogramas para xilanasas..... | 44 |
| 8.13 Zimogramas para pectinasas | 44 |
| 8.14 Zimograma para pectin-liasas | 45 |
| 8.15 Zimograma para amilasas | 45 |
| 8.16 Identificación de proteínas usando espectrometría de masas..... | 45 |
| 9. RESULTADOS | 47 |
| 9.1 Resultados de la fermentación líquida..... | 47 |

| | | |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9.1.1 | Resultado de la cantidad de azúcares reductores en la fermentación líquida..... | 48 |
| 9.1.2. | Actividad amilolítica, xilanolítica y exo-pectinolítica de la fermentación líquida..... | 49 |
| 9.2 | Resultados del crecimiento de las cepas en medio sólido..... | 51 |
| 9.2.1 | Crecimiento de las de las diferentes cepas en placas de agar con maíz triturado al 1% inoculadas sobre membrana. | 53 |
| 9.3 | Resultado del crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en los diferentes tipos de granos de maíz mexicano. | 55 |
| 9.4 | Resultado del crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en los diferentes tipos de granos de maíz mexicano. | 56 |
| 9.5 | Morfología de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 infectando granos de maíz. | 57 |
| 9.6 | Morfología de <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 infectando el grano de maíz. | 58 |
| 9.7 | Crecimiento de <i>A. flavus</i> CECT 2687 y <i>A. flavus</i> NRRL 6541 con 10 días de incubación sobre los granos de maíz. | 60 |
| 9.8 | Actividad amilolítica en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas <i>A. flavus</i> CECT 2687 y <i>A. flavus</i> NRRL 6541, con 10 días de incubación..... | 61 |
| 9.9 | Actividad de las exopectinasas en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas <i>A. flavus</i> CECT 2687 y <i>A. flavus</i> NRRL 6541 con 10 días de incubación. | 62 |
| 9.10 | Actividad de celulasas en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas <i>A. flavus</i> CECT 2687 y <i>A. flavus</i> NRRL 6541 con 10 días de incubación..... | 63 |
| 9.11 | Actividad de las xilanasas en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas <i>A. flavus</i> CECT 2687 y <i>A. flavus</i> NRRL 6541 y con 10 días de incubación..... | 64 |
| 9.12 | Actividades enzimáticas (U/mg) la cepa <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 y <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en diferentes días de incubación de los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz blanco..... | 65 |
| 9.13 | Análisis electroforético de las enzimas producidas por <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con zimogramas. | 67 |
| 9.14 | Proteínas identificadas por espectrometría de masas en los granos de maíz sin inocular e inoculados con <i>Aspergillus flavus</i> cepa toxigénica y no toxigénica..... | 70 |
| 9.14.1 | Proteínas identificadas por espectrometría de masas de los granos de maíz controles (sin inocular). | 71 |
| 9.14.2 | Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa no toxigénica <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 3 días de incubación. | 72 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 9.14.3 Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la cepa no toxigénica <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 5 días de incubación. | 74 |
| 9.14.4 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa no toxigénica <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 7 días de incubación. | 75 |
| 9.14.5 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa no toxigénica <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 10 días de incubación. | 78 |
| 9.14.6 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa toxigénica <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 con 3 días de incubación. | 83 |
| 9.14.7 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa toxigénica <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 con 7 días de incubación. | 85 |
| 9.14.8 Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la cepa toxigénica <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 con 10 días de incubación. | 86 |
| 9.15 Análisis comparativo del secretoma de las cepas <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 y <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541. | 88 |
| 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. | 92 |
| 11. CONCLUSIONES. | 97 |
| 12. REFERENCIAS. | 98 |
| 13. ANEXOS. | 103 |
| 13.1 Anexo 1. | 103 |
| 13.2 Anexo 2. | 107 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Características macro y microbiológicas de <i>A. flavus</i> | 6 |
| Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas. | 8 |
| Figura 3. Planta del maíz. | 16 |
| Figura 4. Principales partes estructurales del grano de maíz. | 18 |
| Figura 5. Estructura química del almidón (amilosa y amilopectina). | 20 |
| Figura 6. Estructura química de la celulosa. | 21 |
| Figura 7. Representación esquemática de la estructura del xilano. | 22 |
| Figura 8. Representación esquemática dos estructuras de galactoglucomananos. | 22 |
| Figura 9. Representación esquemática de los 4 tipos de polisacáridos de la pectina ramnogalacturonano I (RG-I), xilogalacturonano (XGA), homogalacturonano (HG) y ramnogalacturonano II (RG-II). | 23 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 10. Representación estructural de la lignina..... | 24 |
| Figura 11. Estructura de las principales antocianinas..... | 27 |
| Figura 12. Diferentes tipos de maíz mexicano..... | 28 |
| Figura 13. Crecimiento de diferentes hongos filamentosos en agar Sabouraud de diferentes granos de maíz mexicano..... | 29 |
| Figura 14. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687..... | 37 |
| Figura 15. <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541..... | 37 |
| Figura 16. Fermentación líquida de <i>Aspergillus flavus</i> en los diferentes tipos de granos de maíz..... | 39 |
| Figura 17. Granos de maíz inoculados e incubados a 31°C por 10 días..... | 40 |
| Figura 18. Esquema del proceso de extracción de las enzimas secretadas de <i>Aspergillus flavus</i> en los granos de maíz..... | 41 |
| Figura 19. Evolución del pH de la fermentación líquida en maíz blanco (MB), maíz rojo (MR) y maíz morado (MM) de <i>A. flavus</i> CECT 2687 y <i>A. flavus</i> NRRL 6541..... | 47 |
| Figura 20. Cantidad de azúcares reductores en la fermentación líquida en los tres tipos de maíz con las diferentes cepas..... | 48 |
| Figura 21. Actividad enzimática de la fermentación líquida..... | 50 |
| Figura 22. Crecimiento de la cepa <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado..... | 51 |
| Figura 23. Crecimiento de la cepa <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado..... | 52 |
| Figura 24. Crecimiento de la cepa <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado (inoculados sobre una membrana) | 53 |
| Figura 25. Crecimiento de la cepa <i>A. flavus</i> NRRL 6541 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado (inoculados sobre una membrana) | 54 |
| Figura 26. Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 sobre los granos de maíz de diferentes tipos, incubados durante 7 días a 31 °C inoculados con punción y sin punción..... | 55 |
| Figura 27. Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 sobre los granos de maíz de diferentes tipos, incubados durante 7 días a 31 °C inoculados con punción y sin punción..... | 56 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 28. Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en maíz Blanco con punción..... | 57 |
| Figura 29. Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en maíz Rojo con punción..... | 57 |
| Figura 30. Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en maíz Morado con punción..... | 57 |
| Figura 31. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en maíz blanco..... | 58 |
| Figura 32. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en maíz morado..... | 58 |
| Figura 33. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en maíz blanco..... | 58 |
| Figura 34. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en maíz blanco..... | 58 |
| Figura 35. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en maíz blanco..... | 58 |
| Figura 36. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en maíz morado..... | 58 |
| Figura 37. Crecimiento de las dos cepas en los tres diferentes tipos de granos de maíz inoculados con punción de <i>A. flavus</i> CECT 2687 y <i>A. flavus</i> NRRL 6541, después de 10 días de incubación..... | 60 |
| Figura 38. <i>A. flavus</i> CECT 2687 en granos de maíz morado después de 10 días de incubación..... | 60 |
| Figura 39. <i>A. flavus</i> NRRL 6541 en granos de maíz morado después de 10 días de incubación..... | 60 |
| Figura 40. Actividades amilolíticas específicas en U/mg y U/mL de las dos cepas de <i>Aspergillus flavus</i> | 61 |
| Figura 41. Actividades exopectinasas específicas en U/mg y U/mL de las dos cepas de <i>Aspergillus flavus</i> | 62 |
| Figura 42. Actividades celulasas específicas en U/mg y U/mL de las dos cepas de <i>Aspergillus flavus</i> | 63 |
| Figura 43. Actividades xilanasas específicas en U/mg y U/mL de las dos cepas de <i>Aspergillus flavus</i> | 64 |
| Figura 44. Actividad amilolítica (U/mg) de la cepa toxigénica a <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 diferentes días de incubación..... | 65 |
| Figura 45. Actividad amilolítica (U/mg) de la cepa no toxigénica a <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en diferentes días de incubación..... | 65 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 46. Actividad xilanolítica (U/mg) de la cepa toxigénica a <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 diferentes días de incubación..... | 66 |
| Figura 47. Actividad xilanolítica (U/mg) de la cepa no toxigénica a <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en diferentes días de incubación..... | 66 |
| Figura 48. Actividad exopectinolítica (U/mg) de la cepa toxigénica a <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 diferentes días de incubación..... | 66 |
| Figura 49. Actividad exopectinolítica (U/mg) de la cepa no toxigénica a <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en diferentes días de incubación..... | 66 |
| Figura 50. Resultado del zimograma de amilasas en la cepa <i>A. flavus</i> NRRL 6541 A. Gel de acrilamida al 15%. B. Gel de acrilamida al 12%..... | 67 |
| Figura 51. Resultado del zimograma de xilanasas en la cepa <i>A. flavus</i> NRRL 6541 en Gel de acrilamida al 12%..... | 68 |
| Figura 52. Resultado del zimograma de exopectinasas de la cepa <i>A. flavus</i> NRRL 6541 en gel de acrilamida al 12%..... | 68 |
| Figura 53. Resultado del zimograma de pectin liasas en la cepa <i>A. flavus</i> NRRL 6541 en gel de acrilamida al 12%..... | 69 |
| Figura 54. Gel de electroforesis de los granos control en donde se muestran las bandas compartidas por los tres diferentes tipos de maíz..... | 71 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Límites de aflatoxinas establecidos en NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal..... | 9 |
| Tabla 2 Composición química de las diferentes partes del grano de maíz..... | 19 |
| Tabla 3. Composición aproximada del pericarpio crudo de maíz..... | 19 |
| Tabla 4. Composición proteica de las partes principales de los granos de maíz..... | 24 |
| Tabla 5. Grupos de proteínas identificadas en <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 3 días de incubación. | 72 |
| Tabla 6. Grupos de proteínas identificadas en <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 5 días de incubación. | 74 |
| Tabla 7. Grupos de proteínas identificadas en <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 7 días de incubación. | 76 |
| Tabla 8. Grupos de proteínas identificadas en <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 con 10 días de incubación. | 79 |
| Tabla 9. Grupos de proteínas identificadas en <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 con 3 días de incubación. | 83 |
| Tabla 10. Grupos de proteínas identificadas en <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 con 7 días de incubación. | 85 |
| Tabla 11. Grupos de proteínas identificadas en <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 con 10 días de incubación. | 87 |
| Tabla 12. Análisis comparativo del secretoma de las cepas de <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 y <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 a los 3, 7 y 10 días de incubación en maíz blanco.... | 89 |

1. RESUMEN

La infección de *Aspergillus flavus* en los granos de maíz es un problema de salud muy importante porque la producción de aflatoxinas genera un riesgo muy elevado para la población humana y animal de contraer diversos tipos de cáncer, para resolver el problema de contaminación de este hongo se han desarrollado una gran variedad de estrategias enfocadas en comprender los mecanismos de resistencia y defensa que tienen los granos de maíz, sin embargo los estudios enfocados a los mecanismos de infección de *A. flavus* son escasos, por lo que es de vital importancia el estudio de los factores de virulencia, como son las enzimas secretadas para degradar las distintas partes del grano de maíz (secretoma).

Con el presente estudio se realizó el análisis comparativo de las enzimas secretadas de dos cepas del hongo, *A. flavus* CECT 2687 (productora de aflatoxinas) y *A. flavus* NRRL 6541 (no productora de aflatoxinas), inoculadas directamente en el endospermo de tres diferentes tipos de granos de maíz mexicano (blanco, rojo y morado), lo que nos permitirá ampliar el conocimiento del mecanismo por el cual este hongo invade diferentes sustratos.

En el análisis comparativo de la actividad de las enzimas secretadas (amilasas, celulasas, xilanasas y exo-pectinasas) por las cepas de *Aspergillus flavus* en tres tipos de maíz mexicano solo se observaron diferencias significativas en las actividades enzimáticas de la cepa no toxigénica, por lo que la identificación de las enzimas con 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma solo se realizó en maíz blanco en diferentes días de incubación, encontrándose las siguientes diferencias entre las cepas: *A. flavus* NRRL 6541 (no toxigénica) se identificaron 33 enzimas, las cuales se agruparon en: 9 proteasas, 6 celulasas, 6 xilanasas, 5 enzimas accesorias, 4 amilasas y 3 pectinasas. En el caso de la cepa *A. flavus* CECT 2687 (cepa toxigénica), se identificaron 23 enzimas, las cuales se agruparon en: 7 proteasas, 4 celulasas, 3 xilanasas, 6 enzimas accesorias, 2 amilasas y 1 pectinasa.

Con el análisis proteómico se tiene evidencia experimental de las enzimas secretadas de las cepas *Aspergillus flavus* cuando infectan el grano de maíz lo anterior sirve de base para dilucidar el mecanismo de infección del hongo en el grano de maíz.

2. INTRODUCCIÓN

Aspergillus flavus, *A. parasiticus* y *A. oryzae* pertenecen a un grupo de hongos filamentosos saprófitos capaces de utilizar un rango muy amplio de sustratos como fuente de carbono. Particularmente, *A. flavus* y *A. parasiticus* se encuentran frecuentemente en cultivos como maíz, cacahuate y algodón. Estas dos especies producen aflatoxinas, las cuales han sido ampliamente estudiadas debido a que son altamente tóxicas y potentes carcinógenos, lo que hace que la presencia de *Aspergillus flavus* y sus toxinas en cualquier tipo de alimento sea poco deseable (Bennet, 2009).

La degradación de materiales complejos requiere que los hongos produzcan y secreten diversas enzimas que les ayudan a utilizarlos para crecer y también, en el caso de las plantas, a colonizar el tejido vegetal.

El estudio de las enzimas (xilanasas, pectinasas y celulasas) que degradan los polisacáridos que constituyen la pared celular de las plantas, secretadas por *A. flavus*, es de gran interés porque juegan un papel importante en el mecanismo de patogenicidad, ya que son consideradas factores de virulencia.

Con base en estudios anteriores se sabe que existe gran variabilidad en el tipo de enzimas secretadas por cepas de *Aspergillus flavus* que dependen del origen de la cepa y el tipo de sustrato que utiliza como fuente de carbono, entre otros factores.

Con el presente estudio se pretende identificar las enzimas de dos diferentes cepas de *Aspergillus flavus* con la finalidad de realizar un análisis comparativo del tipo y cantidad de enzimas secretadas por cada cepa; lo que nos permitirá ampliar el conocimiento del mecanismo por el cual este hongo invade diferentes sustratos como el grano de maíz.

3. MARCO TEORICO

3.1 Generalidades de los hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariontes y heterótrofos, y muchos de estos tienen capacidad saprofítica, por lo que obtienen sus nutrientes de la materia orgánica en descomposición, o bien se alimentan de otros organismos vivos como las plantas (parásitos) (Walker y White, 2011).

Se considera que los hongos son cenocíticos, es decir que tienen un citoplasma continuo a través de todo su cuerpo, el cual está constituido por filamentos tubulares microscópicos que se ramifican y entrecruzan. Su pared celular es muy rígida porque está compuesta de un polisacárido llamado quitina por lo que los hongos no son sensibles a la presión osmótica elevada. Cada filamento se llama hifa y pueden medir de 5 a 10 μm de diámetro, un conjunto de hifas forma lo que se llama micelio (García, 2004; Arenas, 1993).

Las hifas del hongo se pueden clasificar según su función o por la posición que ocupan en el medio en donde se encuentran, de acuerdo con su función pueden ser hifas vegetativas (de crecimiento) o hifas fértiles (de reproducción) y según su posición en el medio pueden ser hifas sumergidas o aéreas (García, 2004).

Su forma de reproducción es asexual y/o sexual, por medio de unas estructuras llamadas esporas, las cuales son cuerpos resistentes que forman los hongos en estado latente. Las esporas sexuales tienen núcleo derivado de las células progenitoras, y sus esporas son haploides; dos núcleos de las células antecesoras se funden para formar un núcleo diploide (zigoto) y las estructuras que producen las esporas sexuales son casi siempre morfológicamente diferenciadas de las esporas asexuales. Por el contrario, las estructuras que producen las esporas asexuales, denominadas conidias, se forman por simple diferenciación en la hifa de crecimiento (Arias y Piñeros, 2008).

Dentro de sus requerimientos nutricionales está la glucosa como principal fuente de carbono, pero muchos hongos filamentosos también son capaces de usar fructosa, manosa y galactosa; así como sustratos complejos como el almidón y la celulosa. Utilizan nitrato y amonio como fuente de nitrógeno, algunos otros utilizan urea, aminoácidos, polipéptidos y proteínas. También necesitan sulfatos o metionina como fuente de azufre (Kendrick, 2000).

Los hongos filamentosos son capaces de crecer en un rango de temperaturas entre 0° a 50°C, y la mayoría tiene un rango óptimo de 25°C a 30°C. El pH también es un factor importante para la proliferación de estos microorganismos pues pueden crecer en un rango de 2 a 9, el pH óptimo es de 4 a 6 (Arias y Piñeros, 2008).

Los hongos filamentosos pueden ser cultivados en el laboratorio en una variedad de medios de cultivo líquidos y sólidos. En agar forman colonias radiales con morfologías que caracterizan a la especie por la forma y el color (Walker y White, 2011).

Muchas especies de hongos filamentosos son patógenos de plantas, animales y humanos, teniendo gran impacto negativo en la salud de la población humana y en pérdidas económicas en la industria agrícola y ganadera. Recientemente se ha incrementado la investigación de los mecanismos de patogenicidad de los hongos filamentosos con ayuda de las técnicas actuales de biología molecular y genética.

3.2 El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece a la División Eumycota subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes en la que la reproducción se realiza solamente por mecanismos asexuales o parasexuales, *Aspergillus* corresponde a la fase asexual o conidial de algunos ascomicetos de los géneros *Eurotium*, *Emericellay* *Neosartorya*, entre otros, es decir, corresponden a los estados conidiales de ascomicetos que nunca desarrollan estados sexuales o ascógenos en condiciones naturales, o que raramente lo hacen y es difícil encontrarlos (Herrera, 2004; Mossel, 2002). En el género *Aspergillus* han sido descritas unas 200 especies y una gran cantidad de variedades (Herrera, 2004).

Los conidióforos de *Aspergillus* terminan en un hinchamiento llamado vesícula, a partir de la cual nace una hilera de fiálides, en las especies monoseriadas, o una de métulas sobre la cual se encuentra una hilera de fiálides, en las especies biseriadas, productoras de cadenas de conidios. A la vesícula junto con las cadenas de conidios se le conoce como cabeza conidial (Herrera, 2004).

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar a los *Aspergillus* en secciones o grupos, como el *Flavi*, *Terrei* y *Nigri*, entre otros (Carrillo, 2003).

Aspergillus no puede importar compuestos poliméricos dentro de la célula, por lo que requiere la degradación enzimática para producir monómeros y fuentes de carbono oligoméricas pequeñas. Debido a las diferencias estructurales de los polisacáridos de las plantas, la eficiente degradación de estas depende de la producción de una amplia variedad de enzimas. Además, se requiere de un sistema regulatorio para asegurar la producción de la mezcla correcta de enzimas en la presencia de un polisacárido en específico (de Vries y Visser, 2001; de Vries, 2003).

Muchas de las especies de este género tienen una gran importancia económica como el *A. oryzae* y *A. sojae*, las cuales han sido usadas por mucho tiempo en Asia para la producción de sake (vino de arroz), miso (pasta de soya) y shoyu (salsa de soya). *A. niger* es otra especie de importancia, pues es usado para la producción de ácido cítrico y numerosas enzimas comerciales. Estos microorganismos tienen la denominación GRAS (“Generally Regarded As Safe”) por la FDA, son microorganismos muy seguros (Bennet, 2009).

Aspergillus terreus es otro miembro del género pues produce el metabolito secundario lovastatina, un fármaco de gran importancia económica y farmacéutica, empleado para el tratamiento de hipercolesterolemia, al inhibir la enzima HMG-CoA reductasa (Bennet, 2009).

Sin embargo, también existen especies que causan pérdidas económicas al contaminar diferentes granos de cereales como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estos hongos son integrantes del grupo *flavi* los cuales son productores de aflatoxinas, unos compuestos altamente cancerígenos (Bennet, 2009).

3.2.1 *Aspergillus flavus*

Es un patógeno oportunista que infecta diversos cultivos agrícolas, principalmente maíz, cacahuate y algodón. Ha sido aislado de unos rangos muy diversos de climas, pero más frecuentemente de zonas con climas húmedos entre latitudes de 16° y 35° (Amaike y Keller, 2011).

La composición atmosférica tiene un alto impacto en su crecimiento, siendo la humedad la variable más importante pues crece mejor con una actividad de agua (a_w) de entre 0.86 y 0.96. La temperatura óptima para su crecimiento es 37°C, pero puede crecer en intervalos de temperatura de 12 a 48°C (Hedayati *et al.*, 2007).

El hongo pasa el invierno ya sea como micelio o como estructura resistente conocida como esclerocio, una masa de hifas compacta, usualmente globosa, la cual puede germinar y producir una hifa adicional o un conidio cuando existen condiciones favorables para su desarrollo. Esta especie ha sido clasificada dentro de dos grupos con base en el tamaño y forma del esclerocio: la forma L (grupo I) con un esclerocio largo >400nm de diámetro y la forma S (grupo II) con un esclerocio pequeño <400nm, ambas formas son productoras de aflatoxinas (Hedayati *et al.*, 2007; Amaike y Keller, 2011; Frisvard *et al.*, 2019).

Los conidióforos tienen paredes gruesas, incoloras, rugosas y miden menos de 1 mm de longitud. Las vesículas son elongadas cuando son jóvenes, más tarde llegan a ser subglobosas o globosas, variando de 10 a 65 µm de diámetro. Las fiálides son uniseriadas o biseriadas, las ramas primarias tienen 10 µm de longitud y las secundarias 5 µm. El conidio es globoso o subgloboso, con un diámetro de 3.5 a 4.5 µm. Forma colonias aterciopeladas de color amarillo a verde y el reverso de la colonia es de color ligeramente dorado a rojo marrón (Figura 1) (Hedayati *et al.*, 2007).

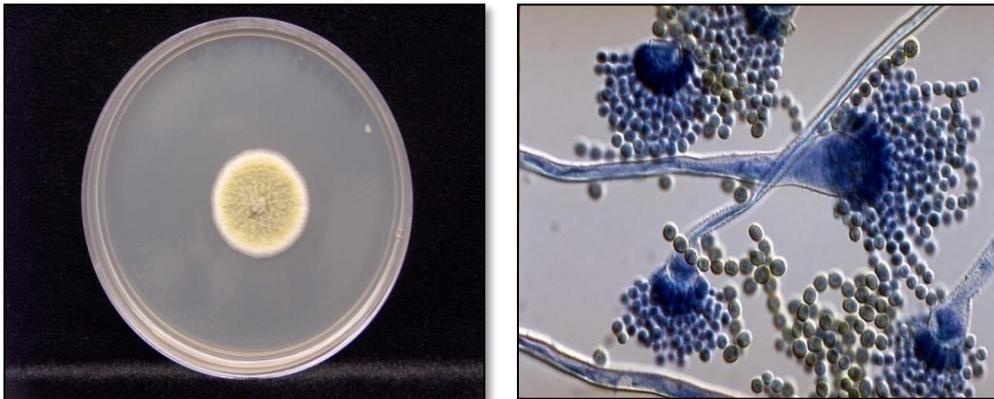


Figura 1. Características macro y microbiológicas de *A. flavus* (<http://www.clt.astate.edu/mhuss/Aspergillus%20flavus%20pict.jpg>)

Aspergillus flavus ha sido descrito como una especie de reproducción asexual, pero también se ha reportado el estado sexual del hongo clasificado como *Petromyces flavus*. En el laboratorio se reproduce de forma exclusivamente asexual, pero en la naturaleza son altamente polimórficas (Amaike y Keller, 2011; Hedayati *et al.*, 2007).

A. flavus es una cepa heterotálica y típicamente contiene uno de los dos tipos de genes de apareamiento MAT1-1 y MAT1-2. La cruce en el laboratorio entre las cepas del tipo de

apareamiento opuesto da como resultado la producción de ascocarpos que contienen ascosporas que están incrustadas dentro de la matriz de los esclerocios. La reproducción sexual en *A. flavus* produce progenie recombinante a través de la distribución independiente de cromosomas y al cruzarse dentro del grupo de genes de aflatoxinas, así como otras partes del genoma. La recombinación probablemente explica la alta variación genética en las poblaciones de campo de *A. flavus*, en las cuales las cepas varían en su capacidad toxigénica, pues hay cepas productoras o no de aflatoxinas (Horn, *et al.*, 2016).

3.3 Factores de virulencia de *Aspergillus flavus*.

Las infecciones por hongos son procesos muy complejos que se desarrollan desde el contacto inicial del hongo con la superficie del huésped, la colonización, la propagación de las células infecciosas hasta el establecimiento de la infección. El progreso y el resultado de la infección dependen de varios factores del hongo y del huésped, incluido el estado inmunológico de este último, la localización del área infectada y la producción de factores de virulencia fúngica. En la mayoría de los casos, esos factores de virulencia son complejos y multifactoriales, pueden clasificarse en dos categorías: las que promueven la colonización e invasión y las que causan daño directo al huésped, como toxinas y enzimas extracelulares (Enguita, *et al.*, 2015).

La virulencia de *Aspergillus flavus* es multifactorial y está íntimamente conectada con el proceso de esporulación y la síntesis de metabolitos secundarios, adaptabilidad a las condiciones de estrés, la intercepción de las moléculas de defensa del hospedero y la interacción planta-hongo (Amaike y Keller, 2011).

Dentro de los factores de virulencia ampliamente estudiados son las aflatoxinas, metabolitos secundarios que son secretados por el hongo, un estudio de microscopía del crecimiento de *A. flavus* en el tejido del grano de maíz mostraron que los componentes celulares, como las paredes celulares, se descomponían antes del micelio. Esto se ha interpretado como indicativo de patogenicidad necrotrófica, sin embargo no todas las investigaciones coinciden con esta conclusión. Investigaciones recientes han comenzado a dilucidar que el propósito específico de su producción es la protección antioxidante para el género *Aspergillus*, pues se han explorado los roles del estrés oxidante en la regulación de la biosíntesis de aflatoxinas, así como de los principales factores reguladores de las vías, sin embargo, el mecanismo de acción antioxidante de la aflatoxina aún no se ha dilucidado por completo (Fountain, *et al.*, 2014).

A. flavus es un hongo saprófito que tiene la habilidad de utilizar un amplio intervalo de sustratos porque tiene una capacidad de producir una gran diversidad de enzimas capaces de degradarlos (Amaike y Keller, 2011). Este complejo conjunto de enzimas constituye un importante factor de virulencia para este hongo, ya que le permite no solo penetrar el tejido del hospedero al mediar la maceración tisular y disgregación de la estructura de la pared celular, sino que es un mecanismo necesario para la obtención de nutrientes (Solis, 2014). Ejemplos de estas enzimas son: amilasas, celulasas, quitinasas, cutinasas (p. ej., Fito cutinasa), lipasas, pectinasas (P2c), proteasas como proteasa alcalina y xilanasas (Fountain, *et al.*, 2014).

3.3.1 Aflatoxinas

A. flavus forma S (con esclerocio largo >400nm de diámetro) y forma L (con esclerocio pequeño <400nm) producen aflatoxinas B₁ y B₂, pero *A. flavus* forma S solo produce aflatoxinas G₁ y G₂. Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia observada bajo la luz UV ("Blue" y "Green"), mientras que los subíndices 1 y 2 indican el componente mayor y menor, respectivamente (Bennet, 2011; Carrillo, 2003). Las aflatoxinas M₁ y M₂ son el producto metabólico hidroxilado de las B₁ y B₂. Alrededor de 1% de las aflatoxinas B₁ consumidas por rumiantes en el forraje es excretada en la leche como M, de ahí su nombre derivado de la palabra "Milk" (Carrillo, 2003).

Estas toxinas contienen un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona, en el caso de aflatoxinas B, que está sustituido por una lactona de seis miembros en aflatoxinas G (Figura 2) (Carrillo, 2003).

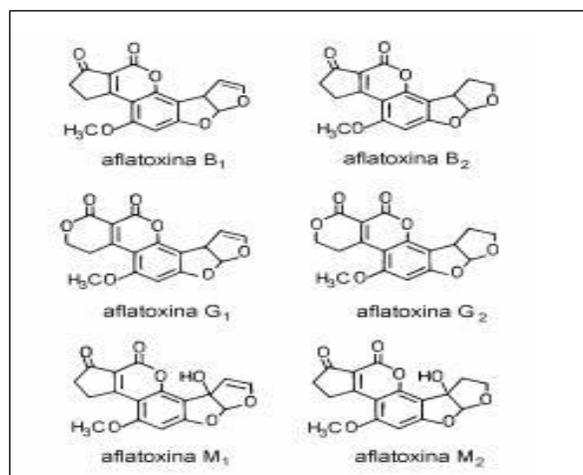


Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas (Carrillo, 2003)

La aflatoxina B₁ es un potente carcinógeno que induce la formación de tumores, en hígado y otros órganos como el riñón, pulmón y colon en humanos y animales. Se ha reportado la muerte de más de 150 personas en Kenya en los años 2004-2005 resultado del consumo de maíz contaminado con *A. flavus* grupo S. En el mismo periodo de tiempo se reportó la muerte de 100 perros en Estados Unidos por alimento compuesto de maíz contaminado con 600 mg/Kg de aflatoxina B₁ por alimento procesado para perro (Amaike y Keller, 2011). La exposición a aflatoxinas es difícil de evitar porque no es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos y otros productos. Los límites a la concentración de aflatoxinas para proteger la salud humana y animal establecida por distintos países e instituciones son diversos. La FDA establece como límites máximos la concentración de 20 µg/kg para granos y otros forrajes destinados a la crianza animal y vacas lecheras, 100 µg/kg para granos destinados a ganado y cerdos reproductores, así como gallinas ponedoras, 200 µg/kg para granos empleados en el engorde de cerdos y 300 µg/kg para destinados en el engorde en hacienda (Carrillo, 2003).

En México la NOM-188-SSA1-2002, establece que los cereales para consumo humano no deben exceder los 20 µg/kg, en el caso de tener concentraciones entre 21- 300 µg/kg el cereal únicamente podrá utilizarse para consumo animal y deberá ajustarse a lo dispuesto en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Límites de aflatoxinas establecidos en NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal.

| Especie/etapa de producción | Límite máximo µg/kg |
|-------------------------------------|---------------------|
| Aves (excepto pollos de engorda) | 100 |
| Cerdos en engorda: | |
| Entre 25 y 45 kg | 100 |
| Mayores de 45 kg | 200 |
| Maduros destinados a reproducción | 100 |
| Rumiantes: | |
| Maduros destinados a reproducción | 100 |
| De engorda en etapa de finalización | 300 |

Tomado de NOM-188-SSA1-2002 (https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=719385&fecha=15/10/2002)

Existen normas más estrictas en Europa donde cultivos de cacahuete con 2 ppb de aflatoxina B₁ son rechazados (Amaike y Keller, 2011). Otras micotoxinas que secreta *Aspergillus flavus* son: la esterigmatocistina, ácido ciclopiazónico, ácido kojico, ácido β-nitropropiónico,

aspertoxina, aflatrem, gliotoxina y ácido aspergílico. Además, también puede producir otros metabolitos secundarios como dihidroxiaflavinona indol, paspalinina y versicolorina A (Carrillo, 2003). La pérdida económica producida por la contaminación de micotoxinas es estimada en aproximadamente un billón de dólares en donde las aflatoxinas representan una gran proporción de la pérdida en Estados Unidos, por ejemplo, en cacahuete 25 millones en los estados de Georgia, E.U.A., y por 15 millones en Texas, E.U.A., por cultivos de maíz en 1999 y en los países en desarrollo se estiman pérdidas más severas (Amaiike y Keller, 2011).

Su biosíntesis es un proceso complejo que implica reacciones multienzimáticas que se han descrito mediante estudios genéticos y bioquímicos, ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas y se forman 15 intermediarios, se involucran 25 genes conglomerados en una región de 70 kb, es regulada positivamente por el gen *aflR*, que codifica una proteína acoplada a DNA con secuencia específica de “dedos de zinc” dicho gen es requerido para la transcripción de la mayoría de los genes estructurales de las aflatoxinas. Luego, el gen regulador *aflJ* (o *aflS*), adyacente a *aflR*, se asocia con la expresión de *pksA*, *nor1*, *ver1* y *omtA*. Por otra parte, la pérdida de toxicidad se basa en la presencia de mutaciones puntuales o deleciones en el conglomerado de genes, por ejemplo la cepa no toxigénica AF36 muestra reemplazo de G por A en el sitio nt591 del gen de sintasa de poliquétido, introduciendo un codón de terminación en la posición 176 del gen, deteniendo la síntesis enzimática y la producción de aflatoxinas. A su vez, la cepa NRRL21882 presenta una deleción en el conglomerado de genes completo desde la región codificadora de *hexA* en el grupo de genes de utilización de azúcares a la región telomérica. También se han observado cepas de *A. flavus* no toxigénicas con todo el grupo de genes que presentan las cepas toxigénicas. En este caso, la atoxigenicidad se explicó debido a defectos a nivel molecular como modificaciones postranscripcionales o proteínicas, aunque aún no se tienen los elementos completos al respecto (Martínez y Hernández, 2013).

Muchos factores afectan la biosíntesis de aflatoxinas incluyendo factores nutricionales como la fuente de carbono y nitrógeno, efectos del medio ambiente como a_w , temperatura y condiciones fisiológicas como el pH y metabolitos de plantas.

Fuente de Carbono: Se ha establecido una relación entre la fuente de carbono y la producción de aflatoxinas, cuando la fuente de carbono es un azúcar simple como la glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa, inducen la formación de aflatoxinas la cual es reprimida en las fuentes de carbono como peptona, sorbosa y lactosa. Se ha reportado una conexión entre la actividad de

la amilasa y la producción de aflatoxinas, el grupo de genes relacionado con la utilización del azúcar en *A. parasiticus* está junto al grupo de genes que codifican para las aflatoxinas, se cree que esta cercanía puede explicar la inducción que tiene la fuente de carbono con la biosíntesis de las aflatoxinas. Los lípidos como los ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico), el ácido esteárico saturado y la oxidación del ergosterol también son una fuente de carbono que induce la formación de aflatoxinas, tal como lo comprueba un estudio donde se clonó el gen *LipA* que codifica para una lipasa en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Yu, 2012; Yu, et al, 2002; Yu, et al, 2003, Yan, et al., 2015).

Fuente de Nitrógeno: Fuentes de nitrógeno como: asparagina, aspartato, alanina, nitrato de amonio, sulfato de amonio, glutamina, glutamato y prolina contenidos en el medio inducen la producción de aflatoxinas, mientras que otros compuestos que reprimen su biosíntesis son el nitrato de sodio y el nitrito de sodio. Se ha reportado un efecto supresor del nitrato sobre la producción de aflatoxinas, en una sobre expresión del gen *afIR* producida por copias adicionales del *afIR* supera la regulación negativa sobre la producción de aflatoxinas (Yu, 2012).

Temperatura: La producción óptima de aflatoxinas ocurre a una temperatura cercana a los 30°C (28°C a 35°C), cuando la temperatura incrementa los 36°C la producción de aflatoxinas es prácticamente inhibida (Yu, 2012).

Humedad, pH, estrés oxidante y metabolitos de plantas: Se ha reportado una alta producción de aflatoxinas en maíz bajo condiciones de calor y sequía. La biosíntesis de aflatoxinas en *A. flavus* ocurre en medio ácido, pero es inhibida en medio básico. Se ha reportado que el tratamiento de *A. flavus* con terbutilhidroperóxido o ácido gálico incrementa significativamente la síntesis de aflatoxinas, al igual que el metabolito octanal aislado de maíz incrementa 500% la producción de aflatoxinas en *A. parasiticus*. Los taninos hidrolizables, ácido ascórbico y ácido cafeíco, al igual que el 13(S)-hidroperóxido derivado del ácido linoleico (resultado de la reacción de la lipo-oxigenasa codificada por L2 LOX del gen de maíz) inhiben significativamente la biosíntesis de aflatoxinas (Yu, 2012).

La síntesis de aflatoxinas tiene un papel ventajoso para la supervivencia de *A. flavus*, la conexión entre el estrés oxidativo y la biosíntesis de aflatoxinas parece indicar la propiedad antioxidante de las aflatoxinas que puede favorecer el crecimiento del hongo. Adicionalmente

se tiene la hipótesis que las células fúngicas o vegetales puedan metabolizar la aflatoxina en subproductos tóxicos (AFB₁-exo-8,9-epóxido) que reaccionan fácilmente con las estructuras del ADN dando como resultado mutaciones y daño oxidativo en varias macromoléculas que puede conducir a la muerte celular localizada, como ha sido demostrado en estudios del metabolismo de la aflatoxina B₁ (AFB₁) en los hepatocitos humanos, donde las monooxigenasas del citocromo p450 son capaces de oxidar la AFB₁. Dado que las monooxigenasas p450 son universalmente abundantes en los organismos eucariotes, incluido el maíz, es posible que la aflatoxina se metabolice de manera similar en el maíz, lo que podría dar como resultado un daño oxidativo de los componentes celulares y su posible papel necrotrófico (Fountain, *et al.*, 2015).

3.3.2 Oxilipinas.

Aspergillus flavus coloniza semillas con alto contenido de grasas saturadas como los ácidos linoleicos (18:2) y oleico (18:1), siendo sustratos de las oxigenasas para producir oxilipinas, estas moléculas están involucradas en la producción de esclerocios, conidios y la producción de aflatoxinas en este hongo. La estructura de las oxilipinas es muy similar a las sintetizadas por las plantas, las cuales funcionan como intermediarios del mecanismo de defensa contra los patógenos y como moléculas de comunicación entre plantas y varios hongos como es el caso específico entre el maíz y *A. flavus*. En un estudio se descubrió que la lipoxigenasa-3 del maíz (ZmLOX3) es necesaria para la resistencia a *A. flavus*, ciertas 9-oxilipinas pueden desempeñar un papel importante en la supresión de la biosíntesis de aflatoxinas, mientras que otras oxilipinas pueden promover la biosíntesis de las mismas lo que parece implicar cierto grado de especificidad en el papel de las enzimas LOX o sus productos en la resistencia a ciertas especies de *Aspergillus* (Amaike, 2011; Scarpari, *et al.*, 2014; Fountain, 2014).

3.3.3 Enzimas hidrolíticas

Existen estudios que demuestran que algunas hidrolasas son determinantes para que el hongo invada los tejidos de las plantas, por lo que varias enzimas hidrolíticas son consideradas factores de virulencia (Mellon, *et al.*, 2007).

a) α -Amilasa

Es una hidrolasa importante involucrada en la degradación del almidón. Un estudio demuestra que al reprimir el gen amy1, que codifica para la α -amilasa en una cepa toxigénica de *A. flavus*,

se reduce el crecimiento en un medio de cultivo con almidón en comparación con una cepa de tipo salvaje. La cepa sin la capacidad de secretar α -amilasa produce aflatoxinas en granos de maíz con su embrión dañado, pero no produce aflatoxinas cuando se inocula en granos con el germen o embrión removido, (considerando que el embrión contiene azúcares simples del cual se alimenta el hongo), por lo que la secreción de esta enzima es un factor crucial para acceder a las fuentes de carbono que son un rol crítico en la inducción de la biosíntesis de aflatoxinas. En este mismo estudio se identificó un inhibidor de tripsina de 14 kDa del maíz capaz de inhibir a la α -amilasa provocando una disminución de la germinación de los conidios y crecimiento de las hifas del hongo (Amaike y Keller, 2011; Mellon, *et al*, 2007).

En otro estudio se compararon cepas de *A. flavus* con baja y alta virulencia encontrando un aumento en los números de isoenzimas de α -amilasa en estas últimas, por lo que desempeñan un papel fundamental en el acceso a las fuentes de carbono del almidón y en la inducción de la biosíntesis de aflatoxinas (Mellon, *et al*, 2007).

b) Pectinasas

Se ha caracterizado una pectinasa de *Aspergillus flavus*, conocida como P2c, codificada por el gen *pecA*, la cual contribuye a la capacidad del hongo de infectar algodón, lo cual fue demostrado en un estudio en donde se alteró genéticamente la expresión de P2c, por adición y delección del gen *pecA* en cepas del hongo, cuando se adicionó el gen para P2c en una cepa que inicialmente no lo tenía, incremento la capacidad de causar daño a la membrana intercarpelar y la habilidad de expandirse, por el contrario la delección del gen *pecA* eliminó la expresión de P2c causando una reducción significativa de la capacidad de causar daño a la membrana intercarpelar y la habilidad de expandirse, comparados con las cepas control (Mellon, *et al.*, 2007; Sheih, *et al.*, 1997).

c) Proteasas

La principal enzima es la elastasa y está directamente relacionada como factor de patogenicidad en la aspergilosis invasiva humana, la cual es una infección en el pulmón causada por la inhalación de esporas de *A. flavus* y *A. fumigatus* en personas inmunosuprimidas. Otras enzimas secretadas son las serin-proteasa y las metaloproteinasas, estas últimas han sido purificadas y caracterizadas con tamaño molecular de 35kD son altamente autocatalíticas dando lugar a la forma activa 23kD muy termoestable y tolerante a

un rango amplio de pH, se cree que dichas enzimas son utilizadas por el hongo como factor invasivo y de defensa. Sustratos naturales sensibles a la escisión por esta proteasa, además de la elastina, incluyen la proteína de almacenamiento de semilla de algodón, zeína (proteína de reserva del grano de maíz), la colágena, la ovoalbúmina y la albúmina de suero bovino (Mellon *et al*, 2007).

d) Cutinasas

Aspergillus flavus puede infectar a los granos de maíz no dañados y producir aflatoxinas antes de la cosecha. Se han realizado ensayos para determinar si *A. flavus* produce cutinasas e investigar su posible papel en la infección de los granos de maíz. Los ensayos *in vitro* han mostrado que *A. flavus* puede crecer en la cutina purificada como única fuente de carbono y secretar una cutinasa. *A. flavus* crece mejor en cultivo líquido a pH 8 que a pH 6 con cutina (butirato de p-nitrofenilo [PNB]) la mayor actividad de hidrólisis del sustrato de la enzima cutinasa se encontró en la fracción de sulfato de amonio al 30 %. Se aislaron dos proteínas con diferente actividad de hidrólisis de PNB, C1 y C2, a partir de los filtrados de cultivo de *A. flavus* utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida. C2 mostró mayor actividad de hidrólisis de PNB que C1. Los pesos moleculares para C1 y C2 fueron 36 kDa y 22 a 23 kDa, respectivamente. Los granos tratados previamente con cutinasa bacteriana o la fracción de sulfato de amonio 30 % del filtrado del cultivo de *A. flavus*, aumento los niveles de producción de aflatoxinas. La actividad de cutinasa fue fuertemente inhibida por el fluorofosfato de diisopropilo (DFP), un inhibidor específico de cutinasa de hongos, lo que indica que la cutinasa de *A. flavus* puede ser una esterasa de serina. Estos datos demuestran que *A. flavus* secreta cutinasa extracelular cuando se cultivan en un medio que contiene cutina y sugieren un posible papel de la enzima en la patogenicidad de *A. flavus* (Mellon *et al*, 2007; Gou, 1996).

e) Lipasas

Las lipasas son codificadas por el gen *lipA* y estas enzimas tienen un pH óptimo de 7.0, son termoestables a los 45°C y tienen una temperatura óptima de 35-40°C, las cuales son secretadas para utilizar los lípidos como fuente de carbono. Un estudio reveló que *A. flavus* prefiere ácidos grasos de cadena corta y aceites que contienen ácidos grasos saturados (Mellon *et al*, 2007).

f) α -D-xilosidasa

Ha sido aislada y purificada de *A. flavus* usada en la fermentación de soya (Mellon *et al*, 2007). Muchas otras hidrolasas involucradas en la degradación de la pared celular han sido aisladas y caracterizadas de múltiples especies de *Aspergillus* incluyendo glucanasas (endo y exo), xilanasas, manasas, ramnogalacturonasas, pectin-lisas, arabinofuranosidasas, galactosidasas, feruloil/acetil/metil esterases, pero no de *Aspergillus flavus* (de Vries and Visser, 2001).

3.4 La planta de maíz.

3.4.1 Aspectos botánicos.

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las gramíneas, tribu Maydeae. Se reconocen 6 especies, como sigue: Sección LUXURIANTES: *Zea perennis*, *Zea diploperennis*, *Zea luxurians*. Sección ZEA: *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea mays* ssp. *mays*. Se trata de una planta anual de gran desarrollo vegetativo con un tamaño promedio de 1-2 m (puede alcanzar 4 m de altura), cuyo tallo lleva de 12 a 20 hojas de limbo bien desarrollado (35 a 65 cm de longitud; 2.5 a 10 cm de ancho). El tallo puede emitir varios brotes. El sistema radicular de tipo fasciculado está formado por tres tipos de raíces: las raíces seminales (nacidas de la semilla), las raíces secundarias (que constituyen la casi totalidad del sistema radicular), y las raíces adventicias que aparecen en el último lugar, a nivel de los primeros nudos situados por encima de la superficie del suelo. La inflorescencia masculina mide de 15 a 25 cm de largo y ancho, y las espigas por lo común de varias a muchas, de 5 a 8 cm de largo, cada una envuelta por una sola bráctea. Las espigas femeninas, varias en una vaina, de 5 a 8 cm de longitud y de 1 a 1.5 cm de ancho; pedúnculos hasta de 1.5 cm de largo (Fleury, *et al.*, 1979; Hugh, 1980; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Mc Vaugh, 1983).

3.4.2 Origen y distribución.

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «*lo que sustenta la vida*». El maíz (Figura 3), es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales, es la materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios, materiales de embarque biodegradables y combustible (FAO, 1993).

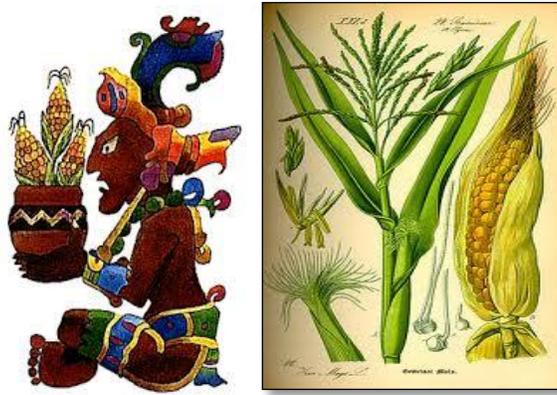


Figura 3. Planta del maíz

(<https://casamejicu.com/blogs/personajes-deidades-y-simbolos/dios-del-maiz>
<https://www.nobbot.com/general/plantas-de-america-dieta/>)

El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta Canadá y hacia el sur hasta Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7 000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz (FAO, 1993)

3.4.3 Descripción botánica de la semilla del maíz.

Está compuesta principalmente de cuatro partes anatómicas que son: el pericarpio y la aleurona, el pedicelo, el endospermo y el germen. En la Figura 4 se muestran las principales partes estructurales del grano.

a) Pericarpio. Éste es la verdadera cubierta o cáscara del grano, compuesta por todas las capas exteriores. El pericarpio está compuesto por una capa de cutícula cerosa (cutina) que cubre a la epidermis para retrasar la absorción de humedad al interior del grano por el mesocarpio, compuesto por células alargadas y estrechamente adheridas con numerosas cavidades que proveen interconexiones capilares entre todas las células y facilitando la absorción de agua. La porción más interna del peso seco del grano. Todas las partes del

pericarpio están compuestas por células muertas que son de forma tubular (Earle *et al*, 1946; Watson, 1988; Jackson y Shandera, 1995).

Esta estructura externa es importante porque le confiere resistencia a los ataques de insectos y posibles patógenos, se ha encontrado una relación positiva entre la composición de ácidos fenólicos (ácido *trans*-ferúlico y ácido *p*-cumárico), ácidos diferúlicos y extensinas (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina) y la resistencia a la infección de insectos como los curculiónidos. Los ácidos ferúlicos forman enlaces éster con los polisacáridos de la pared celular y en conjunto estas moléculas le proporcionan un mecanismo bioquímico para controlar las propiedades mecánicas y limitar la biodegradación de los polisacáridos de la pared celular (García, 2004).

b) Pedicelo. Representa aproximadamente el 0.8% del grano y es la estructura celular con la que el grano se encuentra unida al olote. Está compuesto de haces vasculares que terminan en la porción basal del pericarpio, consta de una capa exterior de abscisión que sella la punta del grano maduro. A esta capa le sigue una serie de células parenquimatosas en forma de estrellas, ligadas por sus puntas, formando una estructura frágil y porosa, conectada con la capa de células cruzadas del pericarpio. Esta estructura es responsable de la absorción de líquidos del pedicelo al pericarpio (Earle *et al.*, 1946; Jackson y Shandera, 1995).

c) Endospermo. Está compuesto por células alargadas con delgadas paredes de material celulósico, empacadas con gránulos de almidón (de 5 a 30 μm) sumergidos en una continua matriz proteica (almidón-proteína), es depositada y contenida en grandes estructuras celulares. La unión e integridad estructural entre la proteína y los gránulos de almidón hace completamente duro al grano de maíz.

El endospermo está compuesto de dos regiones: una harinosa y otra córnea, generalmente en una relación de 2 a 1. La región harinosa del endospermo es caracterizada por células grandes, por gránulos grandes y redondos y una delgada matriz proteica. El endospermo córneo tiene pequeñas células, pequeños gránulos de almidón y una densa matriz proteica. El endospermo constituye aproximadamente el 82.3% del grano en peso seco y está compuesto

principalmente por almidón (86.4%) (Earle *et al.*, 1946; Watson, 1988; Jackson y Shandera, 1995).

d) Germen. Es el embrión u órgano reproductor del grano y está compuesto por plúmula, radícula y escutelo. El escutelo constituye el 90% del germen y funciona como un órgano o almacén de nutrientes y hormonas que son movilizados por enzimas sintetizadas durante la etapa inicial de germinación hacia la plúmula (Earle *et al.*, 1946; Watson, 1988; Jackson y Shandera, 1995). Todas las células del embrión y el escutelo son potencialmente activadas metabólicamente durante la hidratación de la semilla (Watson, 1988).

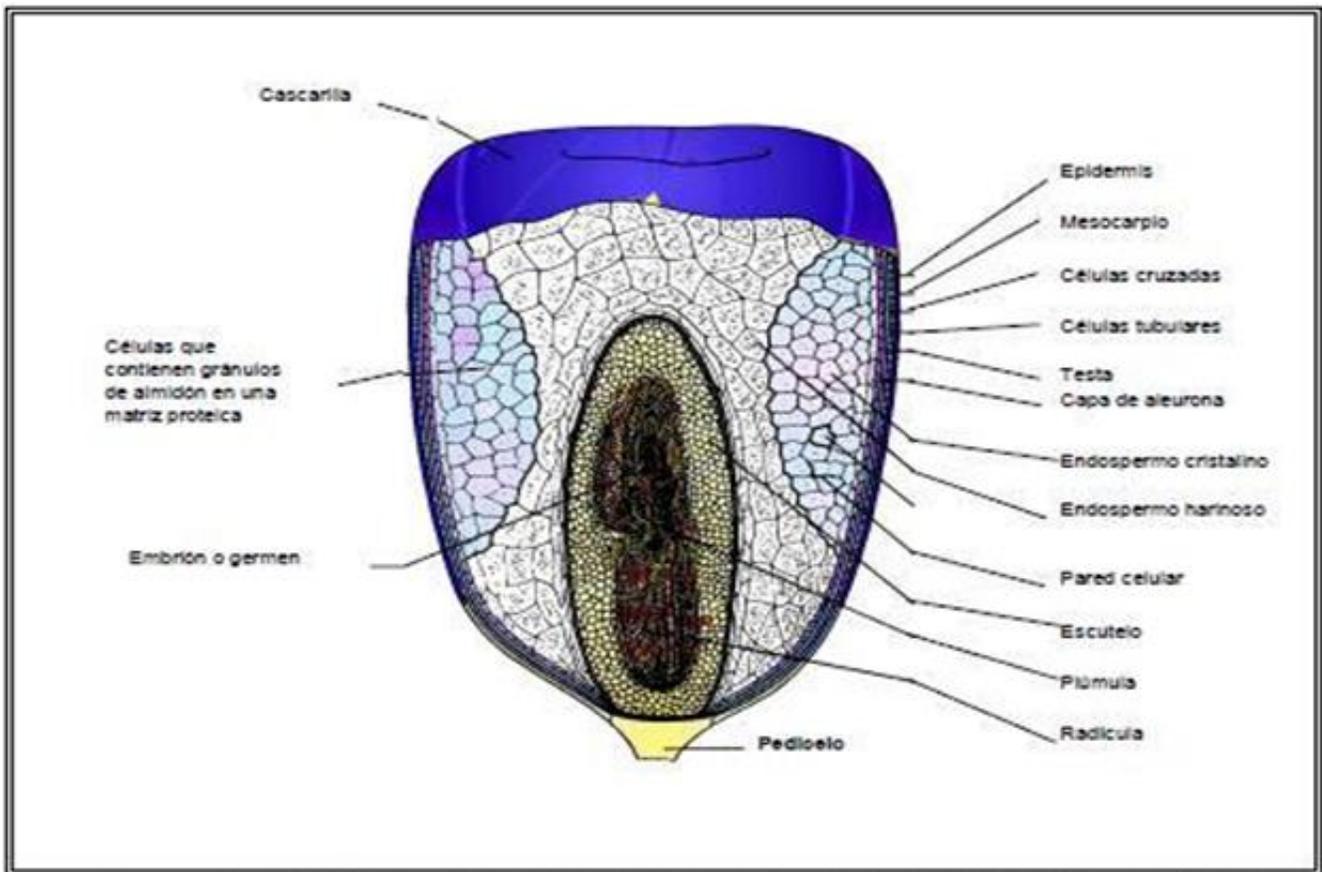


Figura 4. Principales partes estructurales del grano de maíz.

(<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/494/62151s.pdf?sequence=1&isAllowed=y>)

3.4.4 Composición química del grano de maíz.

Como se muestra en el Tabla 2, las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza

por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,1%) (Burge y Duensing, 1989).

Tabla 2 Composición química de las diferentes partes del grano de maíz

| Componentes químicos (%) | Grano entero | Componentes físicos del grano | | | |
|--------------------------|--------------|-------------------------------|--------|------------|-------|
| | | Endospermo | Germen | Pericarpio | Punta |
| Almidón | 72.4 | 86.6 | 8.3 | 7.3 | 5.3 |
| Grasa | 4.7 | 0.86 | 34.4 | 0.98 | 3.8 |
| Proteína | 9.6 | 8.6 | 18.5 | 3.5 | 9.7 |
| Ceniza | 1.43 | 0.31 | 10.3 | 0.67 | 1.7 |
| Azúcar | 1.94 | 0.61 | 11.0 | 0.34 | 1.5 |
| Fibra | 2.66 | -- | -- | -- | -- |

(González, 1995)

El arabinoxilano (59.06 g/Kg) y la xilosa (29.53 g/Kg) son los principales componentes del pericarpio crudo, lo que se muestra en la Tabla 3 (Martínez-Bustos, *et al*, 2001).

Tabla 3. Composición aproximada del pericarpio crudo de maíz

| Componente | Pericarpio crudo |
|----------------------------|------------------|
| Arabinosa (g/Kg CNT) | 2.47 |
| Xilosa (g/Kg CNT) | 29.53 |
| Galactosa (g/Kg CNT) | 0.45 |
| Acido D-glucurónico (g/Kg) | 2.46 |
| Arabinoxilano (g/Kg) | 59.06 |

CNT=Carbohidratos Neutros Totales (Martínez-Bustos, *et al*, 2001)

3.4.4.1 Carbohidratos simples

Los azúcares simples varían de 1 a 3 % del peso total del grano y cerca del 65% de los azúcares del grano se encuentran en el germen y, de ellos, el 69% son glucosa. Además, contienen monosacáridos (D-fructuosa y D-glucosa en igual proporción) libres del endospermo; disacáridos como sacarosa y maltosa; trisacáridos como rafinosa, y oligosacáridos (Boyer y Shannon, 2001; Jackson y Shandera, 1995; Serna, 2001).

3.4.4.2 Carbohidratos complejos (polisacáridos).

Generalmente representan un poco más del 71.5% del peso total del grano. Los polisacáridos de mayor importancia en el maíz son los estructurales y los de reserva. Los carbohidratos estructurales son aquellos componentes que forman parte de la estructura de las paredes celulares del grano. Estos carbohidratos son sustancias como las pectinas, hemicelulosa y celulosa (Jackson y Shandera, 1995). Los carbohidratos de reserva (almidón) son polisacáridos de almacenamiento energético de gran importancia en el maíz, constituyen aproximadamente el 70 al 75% del grano (Serna, 2001).

3.4.4.2.1 Almidón

El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Figura 5), unidos por dos diferentes ligaduras, $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$. La amilosa es una molécula esencialmente lineal de unidades de glucosa, que constituye hasta el 25-30% del almidón. El polímero amilopectina también consiste en unidades de glucosa, pero en forma ramificada y constituye hasta el 70-75% del almidón. La composición del almidón es determinada genéticamente. En el maíz, ya sea con un endospermo de tipo dentado o córneo, el contenido de amilosa y amilopectina del almidón es tal como se ha descrito anteriormente, pero el gen que produce maíz ceroso contiene un almidón formado totalmente por amilopectina. Un mutante del endospermo, denominado diluyente de la amilosa (da), hace aumentar la proporción de amilosa del almidón hasta el 50% y más. Otros genes, solos o combinados, pueden modificar la composición del almidón al alterar la proporción entre la amilosa y la amilopectina (Boyer y Shannon, 2001).

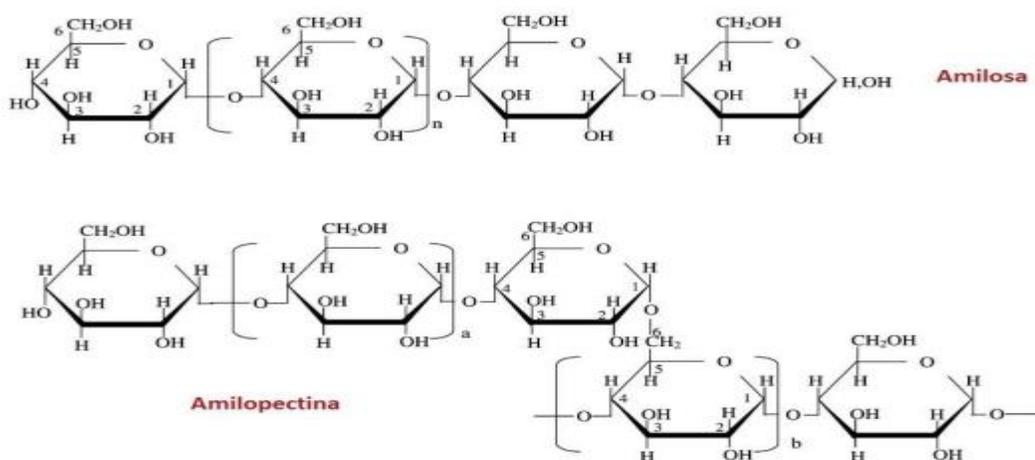


Figura 5. Estructura química del almidón (amilosa y amilopectina) (adaptado de Tester *et al.*, 2004).

3.4.4.2.2 Celulosa

La celulosa es el constituyente principal de la pared celular, está formada por un polímero lineal de D-glucosa unida por enlaces β -1,4, no presenta ramificaciones y los polímeros se presentan como estructuras ordenadas, esto es en fibras (Figura 6). Los múltiples grupos hidroxilo de la glucosa de una cadena forman puentes de hidrógeno con los oxígenos de las cadenas vecinas uniendo las cadenas firmemente y formando una estructura cristalina llamada microfibrillas con una alta resistencia a la tracción, estas microfibrillas están constituidas por cadenas con más de 250 residuos de glucosa unidas por hemicelulosa (de Vries, 2001). La celulosa cristalina es un sustrato insoluble y su degradación por enzimas bacterianas o fúngicas en general es limitada. Además de las regiones cristalinas, la celulosa contiene regiones amorfas no cristalinas dentro de las microfibrillas (de Vries, 2001).

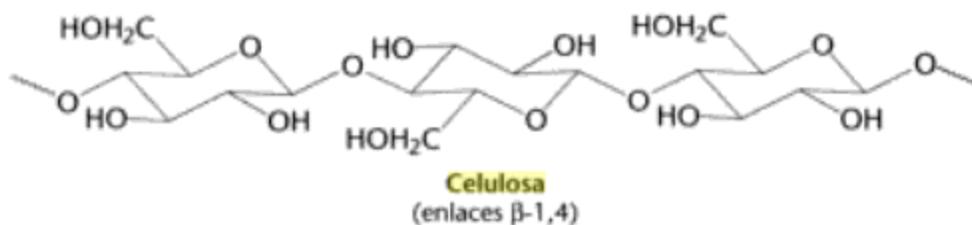


Figura 6. Estructura química de la celulosa (Berg, *et al.*,2007)

3.4.4.2.3 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo y el segundo compuesto orgánico más abundante en la pared celular. Tiene la función de aglutinar las fibras cristalinas de celulosa, dando consistencia a la pared celular (Paz-Lago y Hernández, 2000).

En cereales y maderas duras, el principal compuesto hemicelulósico es el xilano (Figura 7), el cual está formado por una cadena principal de D-xilosa unida por enlaces β -1,4. La cadena principal de xilosa puede estar sustituida con diferentes grupos laterales, como L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido glucurónico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico. La L-arabinosa se encuentra como monómero o como cadenas cortas unidas a la cadena principal de xilosa por enlace α -1,2 o α -1,3. A estos residuos o cadenas cortas de L-arabinosa puede unirse D-xilosa mediante enlace β -1,2. A su vez, residuos de D-galactosa pueden unirse a los residuos de L-arabinosa por enlace β -1,5 o bien unirse a los residuos laterales de D-xilosa por enlace β -1,4.

También se encuentran residuos de acetilo unidos a la cadena principal de xilosa en la posición O-2 u O-3. El ácido glucurónico es otro residuo que se encuentra unido a la cadena principal de xilosa mediante enlace α -1,2. Los residuos feruloil y p-cumaroil se encuentran en el xilano como residuos terminales de las cadenas secundarias unidos a la posición O-5 de L-arabinosa.

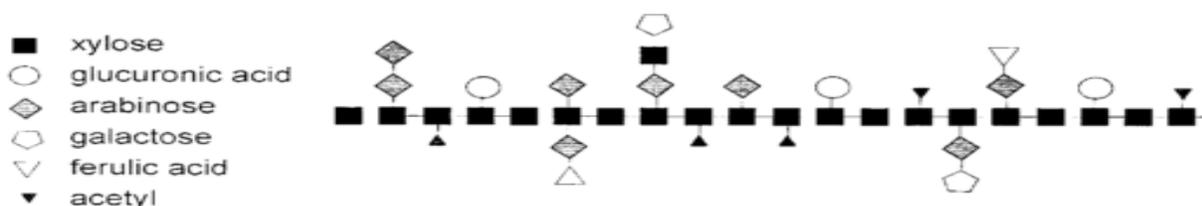


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del xilano (de Vries, 2001)

Un segundo compuesto de la hemicelulosa son los galacto- y gluco-mananos (Figura 8) que consisten en una cadena principal de manosa y glucosas unidas por enlace β -1,4, las maderas blandas generalmente contienen galactoglucomananos, mientras que la madera dura generalmente contiene glucomananos (de Vries, 1999)

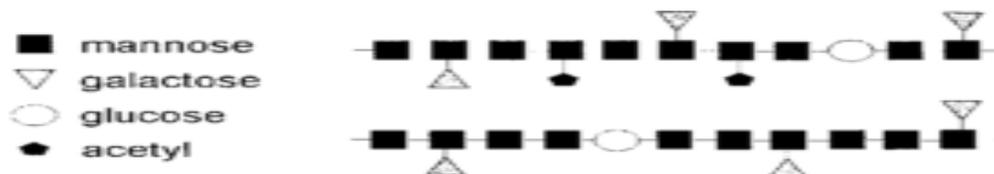


Figura 8. Representación esquemática dos estructuras de galactoglucomananos (De Vries, 2001)

3.4.4.2.4 Pectina

La pectina es otro grupo de heteropolisacáridos, está formado por una cadena principal de ácido galacturónico unido por enlaces α -1,4 la cual puede estar metilada o acetilada. Está compuesto por tres dominios estructurales distribuidos en dos regiones: la región “lisa” y la región “ramificada” (de Vries, 1999)

Los polisacáridos de pectina tienen una estructura compleja o ramificada (Figura 9), pero pueden ser divididos generalmente en homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RGI), ramnogalacturonano II (RGII) y xilogalacturonano (XGA). Aparentemente estos polisacáridos suelen estar presentes en todas las células, pero su abundancia relativa y detalles estructurales difieren entre tipos de células y especies (de Vries, 1999).

El HG representa la cadena principal de la molécula de pectina, que contiene enlaces α -1,4 entre residuos de ácido-D-galacturónico que pueden estar metilados en la posición 6 (Yadav *et al*, 2009). Es conocido como la región lisa de la pectina. RGI se compone de la repetición del disacárido ramnosa-ácido galacturónico. Los residuos galacturónicos pueden ser acetilados y ambos residuos puede llevar cadenas laterales de azúcares neutros como galactosa, arabinosa y xilosa. RGII es, a pesar de su nombre, una cadena de homogalacturonano con cadenas laterales de complejos unidos a los residuos de ácido galacturónico (Biscaro *et al*, 2009).

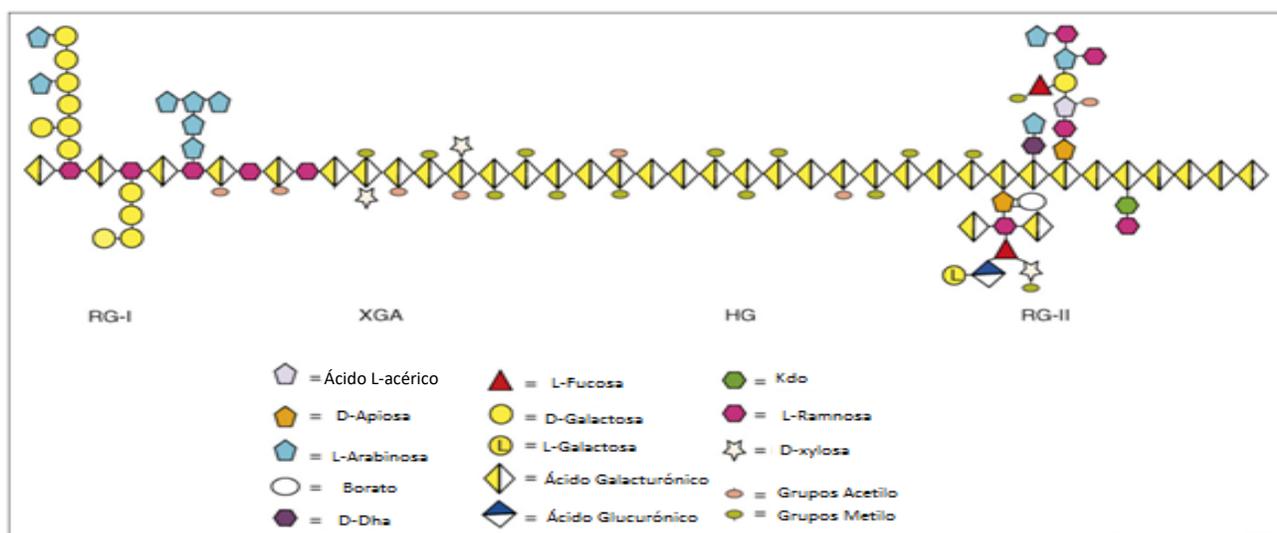


Figura 9. Representación esquemática de los 4 tipos de polisacáridos de la pectina ramnogalacturonano I (RG-I), xilogalacturonano (XGA), homogalacturonano (HG) y ramnogalacturonano II (RG-II) (Mohnen, 2008).

3.4.4.3 Lignina

La lignina es un biopolímero aromático complejo; constituye cerca del 15% de la biomasa terrestre y su fuente natural es la madera. Es importante para el soporte mecánico de las plantas, el transporte del agua y como sistema de defensa. La lignina consta de una red hidrofóbica compleja formada de unidades fenilpropanoides, los cuales son el resultado de la polimerización oxidativa de uno o más de tres tipos de alcoholes hidroxinamílicos precursores (Figura 10). La composición, cantidad y distribución de la lignina depende del tipo de planta, especie y tejido, pero en general representa del 10 al 25% de la pared celular de residuos agroindustriales, y de ello depende el uso que se le pueda dar (Jung y Ni, 1998; Wong *et al.*, 2000; Grabber, 2005; Quintero *et al.*, 2006).

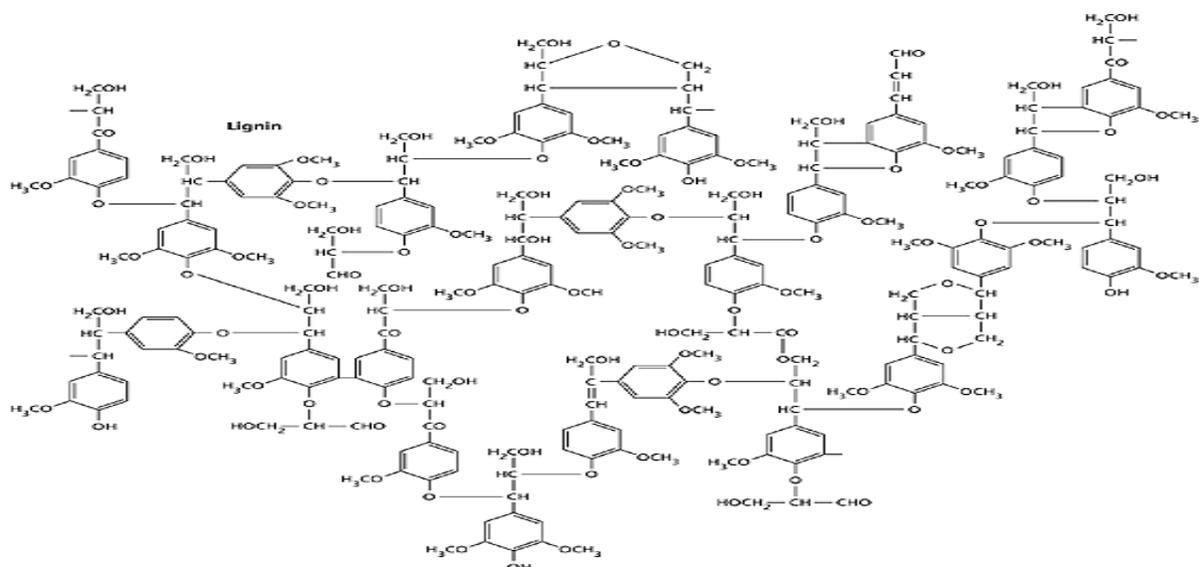


Figura 10. Representación estructural de la lignina
 (https://www.palermo.edu/ingenieria/pdf2015/15/CyT_15_11.pdf)

3.4.4.4 Proteínas.

Después del almidón las proteínas constituyen el siguiente componente químico del grano por orden de abundancia. En las variedades comunes el contenido de proteínas puede oscilar entre 8 y 11 % del peso del grano y en su mayor parte se encuentra en el endospermo (Serna, 2001).

La distribución de las proteínas en el maíz es de 8% albúminas (proteínas solubles en agua), 9% de globulinas (solubles en soluciones salinas), 40% de glutelinas (solubles en hidróxido de sodio) y 39% de prolaminas (zeína), ver Tabla 4 (Paredes-López y Saharópulos-Paredes, 1983).

Tabla 4. Composición proteica de las partes principales de los granos de maíz

| Componente | Grano entero % | Endospermo % | Germen % | Pericarpio y pedicelo % |
|-------------------|----------------|--------------|----------|-------------------------|
| Proteína Total | 9.8 | 8.8 | 19.0 | 5.1 |
| Fracción proteica | | | | |
| Albuminas | 8.0 | 4.0 | 30.0 | - |
| Globulinas | 9.0 | 4.0 | 30.0 | - |
| Zeínas | 39.0 | 47.0 | 6.0 | - |
| Glutelina | 40.0 | 39.0 | 25.0 | - |

Tomado de *Watson y Ramstad, 1987.*

3.4.4.5 Lípidos

Constituyen aproximadamente el 4.8% del peso total del grano. Se encuentran en mayor proporción en el germen, conteniendo el 84% de los lípidos del grano y el 16% restante se encuentra en el endospermo. Casi todos los lípidos del maíz son triacilglicéridos libres y los principales ácidos grasos que los componen son el linoleico (18:2) con 50% de los lípidos del grano, el oleico (18:1) con 35%, palmítico (16:0) 13%, el esteárico (18:0) menos del 4% y el linolénico (18:3) menos del 3%. El maíz no es considerado una oleaginosa, pero es una excelente fuente de ácidos grasos. Los lípidos en el maíz son altamente poliinsaturados y estables porque contienen altos niveles de antioxidantes naturales y muy poco ácido linolénico (Watson, 1988; Weber, 1988; Jackson y Shandera, 1995).

3.4.4.6 Vitaminas liposolubles

El grano de maíz contiene dos vitaminas solubles en grasa, la pro-vitamina A, o carotenoide y la vitamina E. Los carotenoides se hallan sobre todo en el maíz amarillo, en cantidades que pueden ser reguladas genéticamente, en tanto que el maíz blanco tiene un escaso o nulo contenido de ellos. La mayoría de los carotenoides se encuentran en el endospermo duro del grano y únicamente pequeñas cantidades en el germen. El beta-caroteno es una fuente importante de vitamina A, aunque no totalmente aprovechada pues los seres humanos no consumen tanto maíz amarillo como maíz blanco (Squibb, Bressani y Scrimshaw, 1957) determinaron que el beta-caroteno equivalía aproximadamente al 22% del total de carotenoides (11.3 µg/g) de tres muestras de maíz amarillo. El contenido de criptoxantina equivalía al 51% del total de carotenoides. La proporción de vitamina A variaba de 1.5 a 2.6 µg/g.

3.4.4.7 Vitaminas hidrosolubles

Las vitaminas solubles en agua se encuentran sobre todo en la capa de aleurona del grano de maíz, y en menor medida en el germen y el endospermo. Se han encontrado cantidades variables de tiamina y riboflavina en el grano del maíz; su contenido está determinado en mayor medida por el medio ambiente y las prácticas de cultivo que por la estructura genética, aunque se han encontrado diferencias en el contenido de estas vitaminas entre las distintas variedades. La vitamina soluble en agua a la cual se han dedicado más investigaciones es el ácido nicotínico y la niacina con valores medios de aproximadamente 20 µg/g (Patterson *et al.*, 1980).

El maíz no tiene vitamina B₁₂ y el grano maduro contiene sólo pequeñas cantidades -en caso de que las haya- de ácido ascórbico. Yen, Jensen y Baker (1976) hallaron un contenido de aproximadamente 2.69 mg/Kg de piridoxina asimilable. Otras vitaminas, como la colina, el ácido fólico y el ácido pantoténico, se encuentran en concentraciones pequeñísimas.

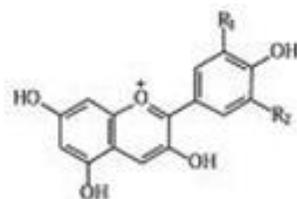
3.4.4.8 Minerales.

La mayor parte (78%) de los minerales del maíz se encuentran en el germen, probablemente porque estos son esenciales para el desarrollo del embrión. El más abundante es el fósforo que representa el 0.08% del grano integral, este mineral se encuentra principalmente almacenado en forma de sal fósforo-magnesio del ácido fítico y es liberado por la enzima fitasa. El azufre es uno de los cuatro elementos más abundantes en el grano, se encuentra en forma inorgánica como un constituyente de los aminoácidos metionina y cistina. Otro elemento inorgánico que constituyen al grano es el potasio, que se encuentra en forma orgánica como componente de los aminoácidos azufrados. Metales de alta toxicidad se encuentran presentes en cantidades por abajo del nivel que causan toxicidad, a menos que el maíz se encuentre en la etapa de maduración o que el maíz sea cultivado en tierras que son expuestas a lodos de aguas residuales con un contenido alto de estos minerales (Watson, 1988).

3.4.4.9 Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos* flor y *kyanos* azul), son el grupo más importante de pigmentos solubles al agua visibles para el ojo humano. Las antocianinas forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos (Figura 11). Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos. Las antocianinas se localizan principalmente en la piel de frutas como manzanas, peras, uvas, zarzamoras, ciruelas, de flores como la jamaica, rosas y verduras como col y maíz morado. La función que cumplen es la de atraer seres vivos (principalmente insectos y pájaros) para propósitos de polinización y dispersión de semillas. La diferencia de color entre las frutas, flores y verduras depende de la naturaleza y concentración de antocianinas. Existen factores adicionales que afectan el color como el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura, luz, etc. Las antocianinas, al igual que otras sustancias polifenólicas, se encuentran en la naturaleza en forma de glucósidos, siendo conocidas sus agliconas como antocianidinas, a las cuales se les une un azúcar por medio de un enlace β -glicosídico. Se trata de flavonoides, es decir, sustancias

derivadas del núcleo flavano, con un anillo-A benzoil y un anillo-B hidroxicinamoil. La estructura de la antocianina es el 2- fenilbenzopirilio de la sal de flavilio (Cuevas-Montilla *et al.*, 2008).



| | R1 | R2 |
|----------------------|------------------|------------------|
| Cianidina | OH | H |
| Peonidina | OCH ₃ | H |
| Delfinidina | OH | OH |
| Petunidina | OCH ₃ | OH |
| Malvidina | OCH ₃ | OCH ₃ |
| Pelargonidina | H | H |

Figura 11. Estructura de las principales antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).

Un estudio reciente revela que antocianidinas, precursores y flavonoides relacionados, fueron probados en concentraciones 0.3-9.7 mM (0.1-3.0 mg / mL) resultando tener actividad contra el crecimiento y la biosíntesis de aflatoxina B₁ de *Aspergillus flavus* NRRL 3357. La producción de aflatoxina B₁ fue inhibida por todas las antocianidinas probadas, los compuestos 3-hidroxi son más activos que las formas 3-desoxi. Los dos glucósidos principales que se producen en el maíz (pelargonidina y cianidina 3-glucósido) fueron evaluados resultando inhibitorios de la síntesis de aflatoxinas, pero la concentración combinada de estos dos compuestos en el tejido de aleurona de los granos de maíz maduro es muy baja para producir el efecto inhibitorio. Sin embargo, otras cepas de *A. flavus* podrían ser más sensibles y las posibles interacciones de estos compuestos con copigmentos y otros flavonoides pueden mejorar su actividad inhibitoria (Norton, 1999).

3.5 Tipos de maíz

La diversidad genética del maíz se distribuye en razas. En América se han originado el 90% de todas las razas. Según Goodman y Brown (1988), en América hay 260 razas (Figura 12). Dos factores son la causa de esa gran diversidad: la variación en usos y la gran variación ecológica. La diversidad fenotípica del maíz se expresa en una extraordinaria variabilidad en color, tamaño, forma, textura del grano y de la mazorca. El maíz es un elemento cultural de la

misma importancia que el lenguaje, el vestido, la música, la culinaria, las costumbres y otras manifestaciones culturales. La vigencia de las razas de maíz es universal. Las razas se mantienen en el tiempo. Hay muchas evidencias de que las razas de maíz son más perennes que otras manifestaciones culturales. Se mantienen porque constituyen un fuerte elemento cultural. Si desaparecen las culturas desaparecen también las razas de maíz. En México el maíz es uno de los cultivos más importantes constituyendo uno de los alimentos básicos de la población, actualmente el desarrollo de la tecnología en este país ha permitido explotar el maíz como una materia prima de gran importancia para la industria, tanto en lo básico como en la complementaria (Cuevas-Montilla., *et al*, 2008).



Figura 12. Diferentes tipos de maíz mexicano (<https://chemazdamundi.wordpress.com>)

El maíz morado es una variedad de maíz que posee la coronta y los granos de color morado y es originario del altiplano andino (Bolivia y Perú). Contiene diferentes tipos de antocianinas, siendo la cianidina-3- β -glucósido, su pigmento mayoritario el cual es un importante antioxidante. También el extracto de maíz morado puede ser usado en productos ácidos (p. ej. bebidas, jugos) donde se desee un color rojo. Además del pigmento principal cianidina-3- β -glucósido, se han encontrado en variedades de maíz morado: pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-maloilglucósido, pelargonidina-3-malonilglucósido, y peonidina-3-malonilglucósido en extractos comerciales de maíz morado y granos de este. Además, cianidina - 3-dimalonilglucósido como compuesto minoritario en algunas variedades. Las antocianinas del maíz morado son más estables que la enocianina de la uva, a la luz, al

calor y principalmente a los cambios de pH. Las antocianinas del maíz morado a un pH entre 3 y 3.5 permanecen de un color rojo amarillento, mientras que la enocianina se torna azulada en esa condición (Cuevas-Montilla., *et al*, 2008).

3.6 Microbiota del maíz

Los hongos productores de micotoxinas están distribuidos en el medio ambiente y son contaminantes frecuentes de los alimentos, especialmente los de origen vegetal (Figura 13). Entre los hongos toxigénicos de mayor importancia se encuentra el género *Fusarium*. Dentro de este género las especies de mayor interés en el grano de maíz son *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. *F. verticillioides* es endémico del maíz causando en la planta pudrición de tallo, raíz y mazorca, también se caracteriza por producir diversos tipos de micotoxinas como las fumonisinas, la más importante es la fumonisina B₁ porque comprende más del 70% de las fumonisinas totales presentes en el maíz (Gallardo, *et al.*, 2006).

Un estudio realizado en el norte de México sobre el microbiota presente en el grano de maíz determinó que los géneros de hongos aislados con mayor frecuencia son: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Penicillium*, en menor proporción se aisló a *Rhizopus*, *Mucor* y levaduras (Gallardo, *et al.*, 2006).

Las especies *Fusarium* más frecuentes fueron *F. verticillioides* y *F. solani*. Del género *Aspergillus* se aisló con mayor frecuencia *A. flavus*, *A. terreus*, y con menor incidencia *A. oryzae* y *A. fumigatus*. La única especie que se aisló del género *Penicillium* fue *P. notatum* y del género alternaría se aisló *A. alternata* (Gallardo, *et al.*, 2006).



Figura 13. Crecimiento de diferentes hongos filamentosos en agar Sabouraud de diferentes granos de maíz mexicano.

3.7 Infección de *Aspergillus flavus* en los granos de maíz.

Para resolver el problema de la contaminación en los granos de maíz se han desarrollado una gran variedad de estrategias que deben ser usadas simultáneamente para evitar la contaminación de *Aspergillus flavus* en los granos de maíz almacenados y asegurar que estén libres de aflatoxinas (Cary, *et al*, 2011).

La mayoría de estos estudios se enfocan en comprender los mecanismos de resistencia y defensa que tienen los granos de maíz, se sabe que hay una resistencia nativa de algunas variedades del maíz la cual es compleja. Hay una necesidad continua de identificar y darle utilidad adicional a las variedades resistentes del maíz. Para identificar y evaluar las variedades de los granos de maíz resistentes a la contaminación de aflatoxinas se ha desarrollado un ensayo rápido de selección en el laboratorio llamado KSA por sus siglas en inglés (Kernel Screening Assay), los resultados de este ensayo indican la presencia de dos niveles de resistencia, una en el pericarpio y otra en el subpericarpio. Este ensayo permite seleccionar los genotipos de maíz resistente a la contaminación de *A. flavus* para posteriormente estudiar las proteínas de los granos resistentes y compararlos con los granos susceptibles, de esta forma se han encontrado moléculas, principalmente proteínas, a las cuales se les atribuye un papel importante en la resistencia y la defensa de los granos de maíz contra la infección de *Aspergillus flavus* (Cary, *et al*, 2011).

Las primeras proteínas que están potencialmente involucradas en la resistencia del grano de maíz son: las inductoras de la germinación proteína de inactivación de ribosoma (RIP) por sus siglas en inglés y las zeamatinas. Estas proteínas han mostrado una inhibición del crecimiento *in vitro* de *A. flavus*. En otro estudio en la variedad Tex6 de maíz resistente se identificó una quitinasa de 28 kDa que inhibe el crecimiento de *A. flavus* y otra proteína de 100 kDa que inhibe la formación de la toxina con un pequeño efecto en el crecimiento del hongo. En otro estudio en donde se analizaron 13 genotipos de maíz revelo la presencia de una proteína de 14 kDa identificada como proteína inhibidora de tripsina (TI) su mecanismo de acción es inhibir la α -amilasa del hongo (Cary, *et al*, 2011).

La β -1,3-glucanasa demostró tener un papel importante en la inhibición del crecimiento de *A. flavus* en los granos de maíz de la variedad Tex6 (Lozovaya, *et al.*, 1998).

Los estudios enfocados a los mecanismos de infección de *Aspergillus flavus* sobre todo en lo que se refiere a la producción de enzimas que degradan la pared celular de las plantas son escasos, en el laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos se ha purificado e identificado una pectin liasa producida por *A. flavus* CECT 2687 con la finalidad de entender el mecanismo de infección de este hongo en los granos de maíz (Camacho, 2014).

3.8 Proteómica

En 2005 el genoma de *Aspergillus flavus* fue secuenciado, tiene 37 Mb en 8 cromosomas, con alrededor de 12,000 genes funcionales de un total de 43,165 y se encuentra disponible en <http://www.aspergillusflavus.org/genomics/>. Un estudio de la comparación de número de genes por familia CAZy involucrados en la degradación de biomasa de la planta, reveló que *A. flavus* cuenta con 16 genes codificantes para celulasas, 18 xilanasas, 12 para mananasas, 8 para xiloglucanasas, 73 para pectinasas; mayor numero reportado en comparación con otras especies del género, 4 para inulinasas y particularmente, al menos con 25 genes codificantes de diversas isoenzimas de amilasas comprendidas en familias como GH13, GH15, GH31 y GH 113 (de Vries *et al.*,2017).

La información arrojada por el estudio del genoma no es suficiente para comprender la complejidad de los sistemas eucariotes, pues la presencia de un gen no conlleva necesariamente su expresión para producir un RNA mensajero, que a su vez, de lugar a una proteína activa, la cual está sujeta a un riguroso control de activación y demás modificaciones postraduccionales. La proteómica estudia mezclas complejas de proteínas que proceden los cultivos de microorganismos y nos da información sobre la síntesis, distribución, vías de secreción y la respuesta fisiológica de un organismo a la variación de las condiciones ambientales. Estas diferencias son representadas en forma de patrones de proteína obtenidas bajo diferentes condiciones y se denomina patrones de expresión diferencial, que son aprovechados para identificar proteínas útiles en diversas funciones. (Amaike, 2011; Torres y Aguilar, 2012).

En un estudio reciente se creció *A. flavus* en tres diferentes de fuentes de carbono: flavonoide rutina (quercetina-3-O-glucosido), glucosa y papa dextrosa, se analizaron las proteínas secretadas en cada medio, como resultado encontraron 10 proteínas secretadas exclusivas en el medio con rutina, 5 proteínas en glucosa, una en papa dextrosa, 16 proteínas comunes en

los tres medios y 14 proteínas de función desconocida. La información que obtuvieron indica que las proteínas producidas en las tres condiciones son tan diversas que no fue posible relacionarlas para establecer un patrón particular de proteínas para cada condición (Medina, *et al.*, 2005).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar las enzimas secretadas de dos cepas de *Aspergillus flavus* cuando invade granos de maíz mexicano, con la finalidad de realizar un análisis comparativo del tipo, orden y cantidad de enzimas secretadas por cada cepa en los diferentes tipos de granos de maíz mexicano; lo que nos permitirá ampliar el conocimiento del mecanismo por el cual este hongo invade diferentes sustratos.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar el medio de cultivo óptimo entre la infección directa del grano de maíz, el medio de cultivo sólido y el medio de cultivo líquido para desarrollar el análisis enzimático de las siguientes cepas: *Aspergillus flavus* CECT 2687 (productora de aflatoxinas) y la cepa *Aspergillus flavus* NRRL 6541 (no productora de aflatoxinas).
- Realizar un análisis comparativo de la actividad de las enzimas secretadas (amilasas, celulasas, xilanasas y pectinasas) por las dos cepas de *Aspergillus flavus* en tres tipos de granos de maíz mexicano (blanco, rojo y morado).
- Identificar las enzimas secretadas de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 y la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en granos de maíz mexicano secretadas en diferentes días de incubación para determinar el orden en que son secretadas.
- Realizar un análisis comparativo de las enzimas identificadas por espectrometría de masas de ambas cepas en los diferentes días de incubación.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

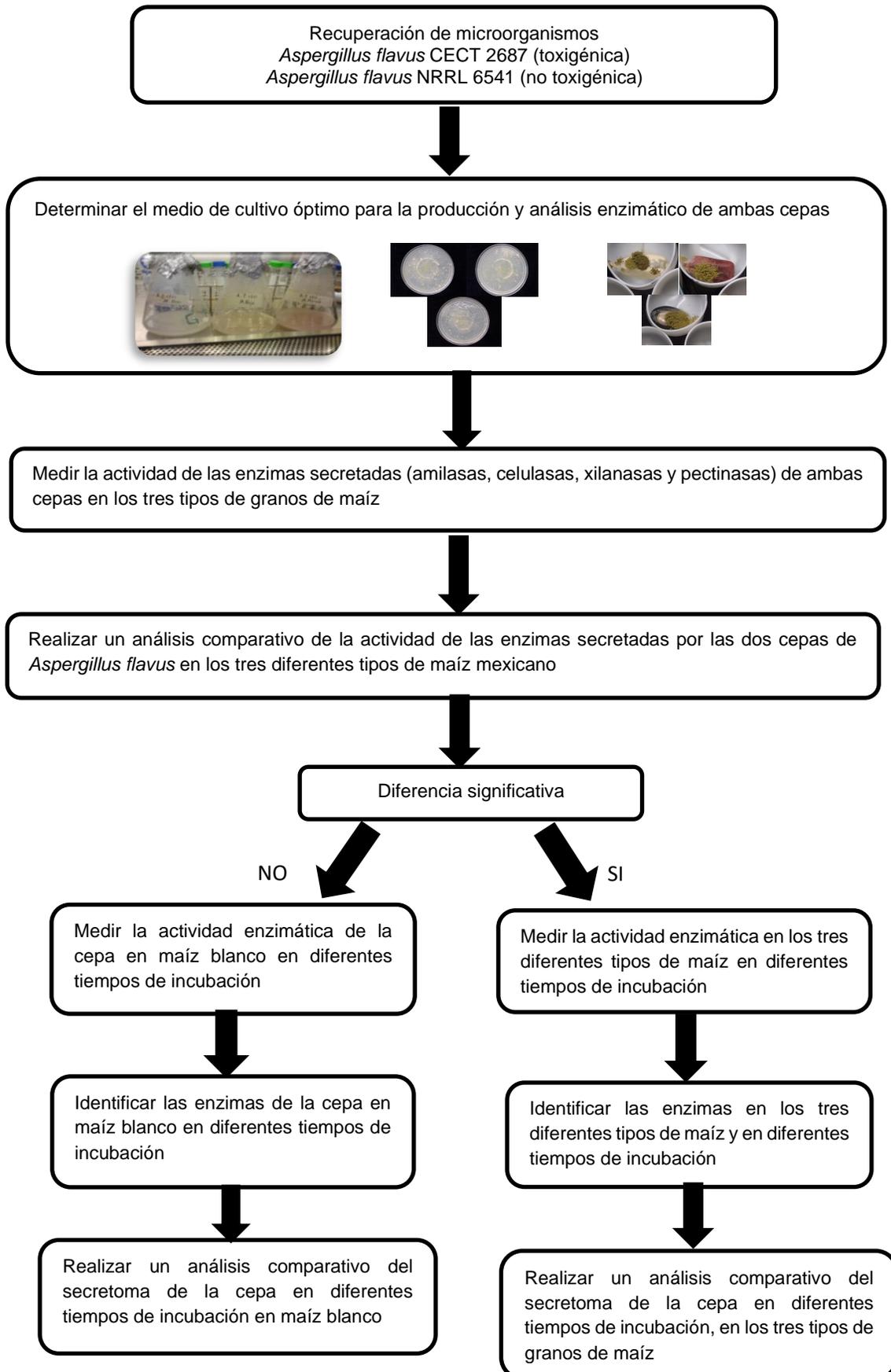
El maíz es el cultivo más representativo de México por su importancia económica, social y cultural pues históricamente es la base de la alimentación de la mayoría de la población y es consumido de diversas formas principalmente como tortilla y también es poseedor de una gran variedad de tipos de maíz. Se estima que el consumo promedio de maíz blanco per cápita al año es de 196.4 Kg (SAGARPA, 2017).

La infección de *A. flavus* en los granos de maíz es un problema de salud muy importante porque la producción de aflatoxinas genera un riesgo muy elevado para la población humana y animal de contraer diversos tipos de cáncer. Además las pérdidas económicas que se generan por la infección de *A. flavus* se han estimado en millones de dólares en los últimos años, para resolver el problema de la contaminación en los granos de maíz se han desarrollado estudios enfocados en comprender los mecanismos de resistencia y defensa que tienen los granos de maíz a la infección del hongo, sin embargo no existen estudios suficientes para entender los factores de virulencia de estos hongos como son las enzimas secretadas para degradar la pared celular y demás partes del grano de maíz, dilucidar el secretoma del hongo en la infección del grano de maíz es el inicio de estudios enfocados en entender los mecanismos de patogenicidad del mismo.

6. HIPOTESIS

Los perfiles de producción de las enzimas hidrolíticas secretadas por las cepas de *Aspergillus flavus* CECT 2687 (productora de aflatoxinas) y *Aspergillus flavus* NRRL 6541 (no productora de aflatoxinas) serán diferentes durante la colonización de los granos de tres diferentes tipos de maíz mexicano (blanco, rojo y morado).

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

8.1 Recuperación de microorganismos

Como primera etapa se recuperaron las cepas del cepario del laboratorio, el cual está constituido por 78 cepas del género *Aspergillus*. Parte del cepario está conformado por cepas autóctonas mexicanas.

Las cepas se encontraban preservadas por desecación a temperatura ambiente en silica gel. Se recuperaron las siguientes cepas: *Aspergillus flavus* CECT 2687, obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo, Parque Científico de la Universidad de Valencia, en Paterna España, productora de aflatoxinas y la cepa *Aspergillus flavus* NRRL 6541 (no toxigénica), se sembraron en medios sólidos agar Sabouraud a 37°C por cuatro días (Figuras 14 y 15).

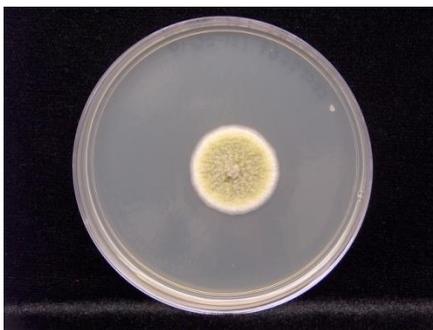


Figura 14. *Aspergillus flavus* CECT 2687



Figura 15. *Aspergillus flavus* NRRL 6541

8.2 Granos de maíz

Se utilizó maíz criollo blanco, rojo y morado originario de sembradíos de la alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México.

8.3 Cultivo de microorganismos

Se realizó una siembra masiva del microorganismo en medios PDA o Sabouraud con la finalidad de obtener una suspensión de esporas con una concentración conocida para la posterior inoculación de los medios sólidos y líquidos. Con un asa micológica se tomó una asada de las esporas de cada cepa. Esta asada se inoculó por picadura central en los medios, las esporas se esparcieron en toda la superficie del medio con un asa Drigalsky. Este cultivo se incubó por 4 días a 37 °C, al final de este periodo se cosecharon las esporas y esta suspensión fue utilizada para la inoculación de resguardos.

8.4 Cosecha y cuenta de esporas

Se propagó cada microorganismo en medio sólido PDA o Sabouraud por siembra masiva. La caja se incubó por 4 días a 37 °C. La cosecha de esporas se obtuvo deslizando un asa Digiralsky sobre las esporas germinadas. Las esporas se suspendieron en 10 mL de solución salina de NaCl al 0.9% (m/v) con Tween 80 al 0.005% v/v, después se lavó tres veces por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, finalmente las esporas se resuspendieron en un volumen igual al original de solución salina.

Se determinó la concentración de esporas mediante el método de cuenta directa en la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución pertinente de la cosecha con la finalidad de obtener de 10 a 50 esporas por cuadrante, se tomaron 20 µL de la dilución y se colocaron en la cámara. Se contaron 16 cuadros de uno de los cuatro cuadrantes y con este valor se realizó el cálculo de la siguiente manera:

[Esporas / mL] = Promedio de esporas contadas por cuadro X 4 (cuadrantes) X factor de dilución X 2500 (factor de la cámara)

8.5 Cultivo en medio sólido

Para observar el crecimiento de las cepas en medio sólido, se trituraron los granos de maíz con ayuda de una licuadora y se prepararon cajas petri con agar bacteriológico y maíz triturado al 1% ajustando a un pH de 6.0. Se inocularon las cajas por picadura central y se incubaron las cajas a 37°C por cuatro días y se observó el crecimiento.

8.5.1 Extracción de las enzimas secretadas en el medio solido

Para medir la actividad enzimática en el medio solido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado, como única fuente de nutrientes en agar bacteriológico 15% y maíz triturado al 1% ajustados a pH=6.0. Se inoculó sobre una membrana porosa de policarbonato (Isopore™ Membrane filters 0.2 µm) con 2 µL de una suspensión de esporas de 5000 esporas/µL y se delimitó un área circular en el agar de 4 cm de diámetro Se incubaron por 4 días a 37°C. Se retiraron las membranas con el hongo y se extrajo el cilindro de agar de 4 cm, el cual se trituró con ayuda de Micro-Dismembrator en un ciclo de 1 a 2 min. El agar homogéneo resultante se colocó en un tubo de 15 mL y se agregó 5 mL de Buffer de acetatos 100 mM pH=6.0 frio. Posteriormente se agitaron 1 min en el vortex y se centrifugaron 10 min a 15000 r.p.m. El

sobrenadante se decantó, se colocó en un tubo y se conservó en congelación (Castañeda, 2013).

8.6 Cultivo en medio líquido

Se prepararon matraces de 500 mL con 100 mL de medio líquido que contenía 1% (m/v) de maíz triturado y agua destilada a un pH igual a 6. Se esterilizaron los matraces y se inocularon con una cantidad total de 1×10^6 esporas en el total de volumen, de las diferentes cepas. Se incubaron por 72 h a una temperatura de 37°C con agitación rotacional de 300 rpm para favorecer la aireación y homogenización del medio. Se muestrearon 5 mL del medio a las 0, 24, 48 y 72 horas de fermentación (Figura 16).



Figura 16. Fermentación líquida de *Aspergillus flavus* en los diferentes tipos de granos de maíz

8.7 Ensayo de selección de granos resistentes (KSA, “Kernel Screening Assay”)

Es un estudio desarrollado y usado para evaluar la resistencia a la producción de aflatoxinas en diferentes poblaciones de granos de maíz. EL KSA está dirigido al hecho de que el hongo infecta al grano maduro y no en desarrollo. La semilla es el blanco primario del hongo aflatoxigénico y es la porción comestible del maíz, el objetivo del KSA es seleccionar a las especies resistentes a la infección de *Aspergillus flavus* (Brown, *et al.*, 1995).

La mitad de los granos de cada tipo se punzaron con una aguja estéril a través del pericarpio y el germen a una profundidad de 1 mm y luego se desinfectaron con una solución de etanol al 70% y agitación constante por 4 minutos. Posteriormente se lavaron con agua estéril tres veces por un periodo de 3 min, con agitación. Se secaron sobre una caja petri estéril y papel filtro Whatman N°1 y se sumergieron en una suspensión de esporas con una concentración de

4×10^6 esporas/ mL. Cada grano de maíz inoculado se depositó en una tapa de vial de plástico estéril (20mm de diámetro y 6 mm de altura) y se introdujeron 7 tapas en una caja petri estéril.

Las cajas de petri con los granos inoculados se introdujeron en un recipiente hermético que contenía una cama de papel filtro Whatman N°1 humedecido con 30 mL de agua estéril (Figura 17).

Se incubaron los granos 24h a 37° C y después los siguientes días a 31°C, la humedad alta se mantiene adicionando al papel 30 mL de agua destilada estéril cada tercer día. (Brown R.L. *et al.*, 1995).

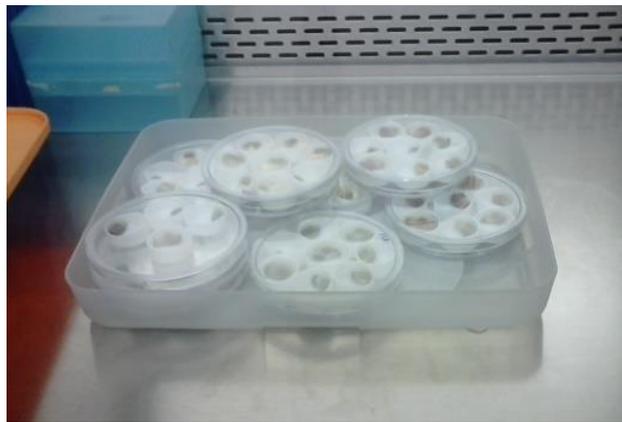


Figura 17. Granos de maíz inoculados e incubados a 31°C por 10 días

8.7.1 Cultivo en los granos de maíz

Basándonos en el KSA (Brown, *et al.*, 1995) los granos de maíz se sometieron a un tratamiento antes de inocularlos. Se preparan lotes de 20 granos de maíz y se registró el peso de cada lote, después fueron punzados en el germen y fueron esterilizados a 120°C por 20 min con la finalidad de esterilizar e inactivar las enzimas contenidas en el grano de maíz.

Después se enfriaron los granos y cada uno se inoculó en la zona de punción con 2 μ L de una suspensión de concentración conocida (5000 esporas / μ L). Cada grano de maíz inoculado se depositó en una tapa de vial de plástico estéril (20mm de diámetro y 6 mm de altura) y se introdujeron 7 tapas en una caja petri estéril.

Las cajas de petri con los granos inoculados se introdujeron en un recipiente hermético que contenía una cama de papel filtro Whatman N°1 humedecido con 30 mL de agua estéril.

Se incubaron los granos 24h a 37° C y después los siguientes días a 31°C, la humedad alta se mantuvo adicionando al papel 30 mL de agua destilada estéril cada tercer día.

8.7.2 Extracción de las enzimas secretadas por el hongo en el grano de maíz

Después del tiempo de incubación a los granos se les retiró el crecimiento manualmente con ayuda de un algodón y espátula hasta que fueron retirados todos los micelios posibles. Los granos fueron envueltos en papel aluminio y sumergidos 1 min en nitrógeno líquido. Posteriormente el lote de granos se trituró en molino de granos de café con un ciclo de 40 s. Se pesaron muestras de 2 g y se agregaron 10 mL de Buffer de fosfatos pH=6.0, se agitaron 1 min en el vortex, se centrifugaron 10 min a 1500 r.p.m. y se filtraron con papel filtro whatman N°1, por último se colocaron en un tubo que fue sumergido inmediatamente en nitrógeno líquido para conservarlo en congelación (Figura 18).



Granos de maíz morado infectados después de 10 de días de incubación



Granos de maíz después de retirarle el hongo.



Granos de maíz antes de triturarlos



Extractos enzimáticos obtenidos

Figura 18. Esquema del proceso de extracción de las enzimas secretadas de *Aspergillus flavus* en los granos de maíz.

8.8 Determinación de actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades enzimáticas xilanolíticas, celulolíticas, exopectinolíticas y amilolíticas, las tres primeras cuantificando los azúcares reductores liberados por la actividad

enzimática con la técnica de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El producto de reacción se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 575 nm. Todos los blancos se incubaron con filtrado enzimático, el cual se agregó a la mezcla después de la adición del reactivo DNS (Miller, 1959).

8.8.1 Determinación de la actividad xilanolítica

Se incubó en un baño a 50 °C por 20 minutos la mezcla de reacción que consistió en 0.5 mL de xilano de abedul al 1% p/v, 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático. Al término de la incubación se agregó 1 mL del reactivo DNS. La mezcla se calentó a ebullición por 5 minutos. Finalmente se añadieron 5 mL de agua destilada y las muestras se agitaron en vórtex a máxima velocidad. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm y la concentración de azúcares reductores se calculó con una curva patrón de xilosa. Se definió como unidad de actividad xilanolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de xilosa en 20 minutos en las condiciones de ensayo (Ruedas, 2012)

8.8.2 Determinación de la actividad exopectinolítica

Para la medición de la actividad exopectinolítica se incubó en un baño a 45 °C por 20 minutos la mezcla de reacción que consistió en 0.5 mL de pectina cítrica al 1% p/v, 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático. Al término de la incubación se agregaron 2 mL del reactivo DNS. La mezcla se calentó a ebullición por 5 minutos. Se añadieron 5 mL de agua destilada y se agitaron los tubos en un vórtex a máxima velocidad. Las muestras fueron centrifugadas 5 minutos a 500 rpm. Finalmente el producto de reacción se separó de la pectina residual y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm. El valor se interpoló en una curva patrón de ácido galacturónico. Se definió como unidad de actividad pectinolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de ácido galacturónico en 20 minutos en las condiciones dadas. (Ruedas, 2012)

8.8.3 Actividad celulolítica.

La actividad celulolítica se determinó a partir de la cuantificación de azúcares reductores utilizando una curva patrón de glucosa. Se usó como sustrato 0.5 mL de una solución de carboximetilcelulosa (1% p/v) en 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0) y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células. Se incubó la mezcla a 50 °C durante 1 hora. Al término se añadió 1 mL de reactivo DNS para detener la reacción, se calentó a ebullición durante 5

minutos y se adicionaron 5 mL de agua destilada. Las muestras se agitaron y finalmente se leyeron a 575 nm. Para el blanco el filtrado enzimático fue adicionado después del reactivo de DNS. Se definió como una unidad de celulasas (U) como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de glucosa a partir de una solución de carboximetilcelulosa en dichas condiciones (Ruedas, 2012).

8.8.4 Determinación de la actividad amilolítica

La actividad amilolítica se midió con el método de tinción de yodo empleando una curva patrón de almidón soluble. La mezcla de reacción contenía 0.1 mL del filtrado enzimático y 1.0 mL de una solución de almidón al 1% p/v en buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0). La mezcla se incubó durante una hora a 40°C. Para detener la reacción se agregó 0.1 mL de HCl 1M. A tubos de ensayo con 2.4 mL de una solución de lugol (5g I₂/10g KI) diluida 1/100 se añade 0.1 mL de la mezcla de reacción, se agitó e inmediatamente midió la absorbancia a 620 nm. En el caso del blanco, las enzimas se agregan después del HCL 1M. Una unidad de actividad amilolítica (U) se definió como la cantidad necesaria de enzima que hidroliza 1 mg de almidón en las condiciones de ensayo (Solis, 2014).

8.9 Medición de proteína por el método de Bradford

Se preparó una solución stock de albúmina (0.1 mg/mL) para hacer una curva estándar. La curva se hizo por duplicado empleando las cantidades adecuadas en los pozos de una microplaca de policarbonato.

Las muestras a las que se les midió la concentración de proteína se diluyeron, agregando 20 µL de muestra y 80 µL de agua en cada pozo. Finalmente, se agregaron 200 µL del reactivo de Bradford a todos los pozos de reacción, incluyendo a la curva estándar. Se dejó reaccionar durante 5 minutos medidos a partir de agregado el reactivo al último pozo y se leyó a 595nm. (Camacho, 2014)

8.10 Preparación para las muestras de los geles SDS-PAGE

A 5 mL del filtrado enzimático obtenido en el punto anterior se dializaron 2 h en agua destilada para posteriormente someterlas a proceso de liofilización para concentrar todas las enzimas posibles. El liofilizado obtenido se re suspendió en un máximo de 100 µL de buffer Tris-SDS 5X. (Romo, 2012).

8.11 Obtención de geles de SDS-PAGE

La preparación de los geles de poliacrilamida de 8x8 cm con SDS se realizó en condiciones desnaturizantes. Se tomaron 5 µL de muestra concentrada a la cual se adicionó un volumen equivalente de buffer de tratamiento desnaturizante (SDS 4%, glicerol 20%, 2-β-mercaptoetanol 10%, buffer Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.005%) 2X. El gel separador se preparó al 12 % de acrilamida. La electroforesis se corrió a corriente constante (15 mA/gel), por alrededor de 1 hora, a través de una unidad de geles verticales de 1.0 mm Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los geles para determinar peso molecular se sumergieron en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.025%, metanol al 40% v/v y ácido acético al 7% v/v durante una hora con agitación suave (70 rpm) para teñir la proteína y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% v/v (Romo, 2012).

8.12 Zimogramas para xilanasas

Cada vez que se corrió un gel para determinar proteína, uno análogo se corrió para generar su zimograma. Después de la electroforesis SDS-PAGE, el gel para zimograma se incubó en una solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 10mM, pH 7.5) a 37°C por 1 h con un recambio a los 30 minutos; luego se incubó a 37°C durante 30 minutos en una solución amortiguadora de acetatos 100mM (pH 5.0); en seguida se sumergió en el sustrato correspondiente (xilano de abedul) al 1% p/v en buffer de acetatos (pH 5.0) e incubó a 37°C por 1 hora. Después se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el exceso de sustrato, se deshidrató con alcohol etílico (96°) a temperatura ambiente por 15 min y finalmente se rehidrató con agua destilada por 20 min., el gel se tiñó con una solución de rojo Congo (0.1% p/v) durante 30 min con agitación suave y se destiñó con una solución de NaCl 1M por 15 min, y posteriormente se acidificó con ácido acético (10% v/v) (Romo, 2012).

8.13 Zimogramas para pectinasas

Después de la electroforesis SDS-PAGE, el gel para zimograma se incubó en una solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 10mM, pH 7.5) a 37°C por 1 h con un recambio a los 30 minutos; luego se incubó a 37°C durante 30 minutos en una solución amortiguadora de acetatos 100mM (pH 5.0); en seguida se sumergió en el sustrato correspondiente (pectina cítrica al 1% m/v en buffer de acetatos (pH 5.0), se incubó a 37°C por 1 hora. Después se

enjuagó con agua destilada hasta eliminar el exceso de sustrato, se deshidrató con alcohol etílico (96°) a temperatura ambiente por 15 min y finalmente se rehidrató con agua destilada por 20 min. El gel se tiñó con una solución de rojo de Rutenio (0.05% p/v) por 30 min con agitación suave y se destiño con agua destilada (Romo, 2012).

8.14 Zimograma para pectin-liasas

Los geles de acrilamida, por separado, se incubaron en buffer de renaturalización (Tris-HCl 10 mM pH 7.5) a 37°C por 1 h; se decantaron e incubaron en buffer de Tris- acetatos 100 mM (pH 9.0) a 37°C durante 30 min. Se decantaron y se incubaron, para observar la actividad de las pectin liasa, en una mezcla 50:50 de pectina cítrica al 1% p/v (pH 5) y buffer Tris-acetatos 100mM (pH 9.0), a 37°C por 1 h. Se decantaron y se eliminó el exceso de sustrato con agua destilada; se deshidrataron en etanol al 96% a temperatura ambiente por 15 min, y se rehidrataron con agua destilada por 20 min. El gel se tiñó con una solución de rojo de Rutenio al 0.05% p/v por 30 min con agitación suave, y se lavó con agua destilada para remover el exceso de colorante (Romo, 2012).

8.15 Zimograma para amilasas

Después de la electroforesis SDS-PAGE, el gel para zimograma se incubó en una solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 10mM, pH 7.5) a 37°C por 1 h con un recambio a los 30 minutos; luego se incubó a 37°C durante 30 minutos en una solución amortiguadora de acetatos 100mM (pH 5.0); en seguida se sumergió en el sustrato correspondiente (almidón) 1% p/v en buffer de acetatos (pH 5.0) e incubó a 37°C por 1 hora. Después se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el exceso de sustrato. El gel se tiñó con una solución de lugol (5g I₂/10g KI) diluida 1/10, inmediatamente después de escanea en el equipo BIO-RAD (Solis, 2014).

8.16 Identificación de proteínas usando espectrometría de masas.

Las muestras para identificación de proteínas fueron recortadas directamente de los geles de electroforesis 1D y se enviaron al Laboratorio Universitario de Proteómica IBT/UNAM, servicios de identificación, caracterización estructural y cuantificación de proteínas a través de Espectrometría de masas de alta resolución. El informe técnico fue realizado el 22 de Octubre del 2014 por la M.I. Lorena Hdz. Orihuela Técnico Académico del LUP.

Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida (obtenida con Sigma-Aldrichy) digerida "in gel" con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 se utilizan para calibrar Thermo Scientific LTQ Velos de trampa de iones y Orbitrap espectrómetros de masas en el modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender a menor rango de calibración de masas) esto permite determinaciones con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μm y 10cm largo RP-C18) . El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2+, 3+ y 4+ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1+, superiores a 5+ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda restringida contra PDB de UniProt de *Aspergillus* y *Zea mays* en el Proteome Discoverer1.4 (datos reportados).

9. RESULTADOS

9.1 Resultados de la fermentación líquida

Con la finalidad de determinar la producción de las enzimas secretadas por las cepas de *Aspergillus flavus* en medio líquido se inocularon medios conteniendo maíz triturado y se fermentaron durante 72 horas. Se observó el crecimiento y se cuantificaron las actividades enzimáticas (exo-pectinasas, amilasas y xilanasas) en los tres tipos de maíz con diferentes cantidades de antocianinas.

Después de muestrear el líquido de la fermentación en el tiempo correspondiente se midió el pH de cada muestra obteniendo los siguientes resultados.

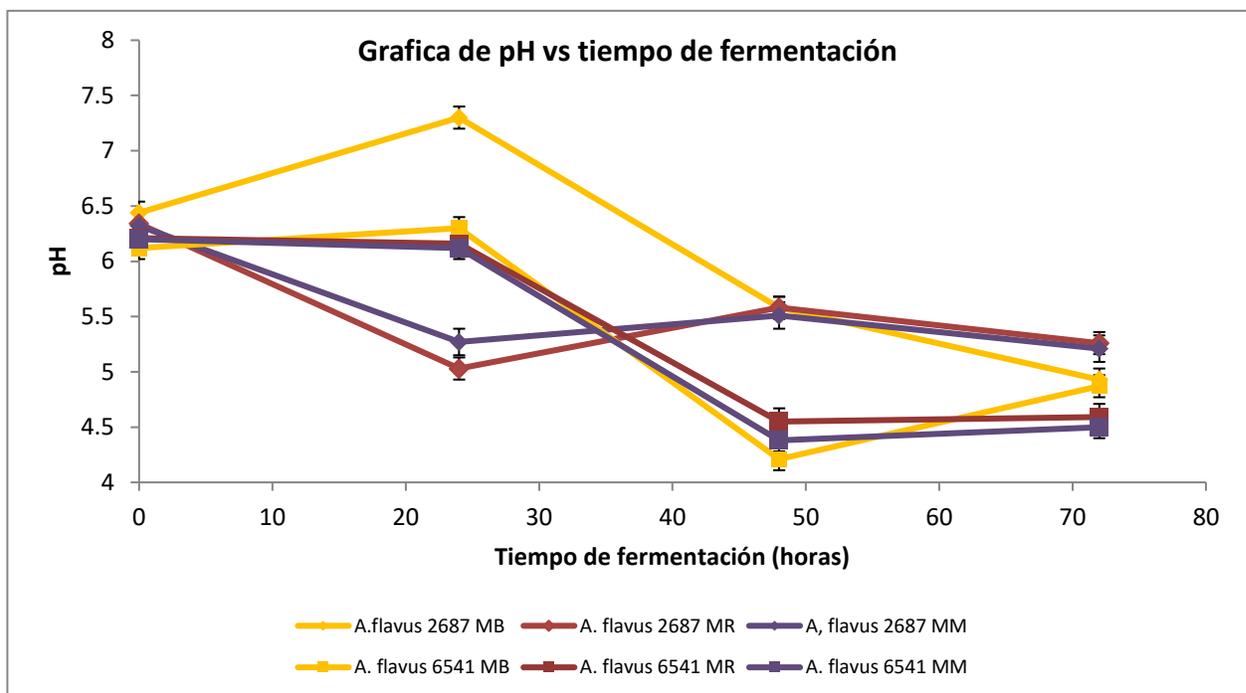


Figura 19. Evolución del pH de los cultivos líquidos en maíz blanco (MB), maíz rojo (MR) y maíz morado (MM) de *A. flavus* CECT 2687 (*A. flavus* 2687) y *A. flavus* NRRL 6541 (*A. flavus* 6541).

Como se observa en la Figura 19, las dos cepas tienden a acidificar el medio conforme pasa el tiempo, siendo la cepa no toxigénica (*A. flavus* NRRL 6541) la que acidifica un poco más en los maíces rojo y morado, lo que nos muestra una diferencia en el metabolismo entre las cepas.

9.1.1 Resultado de la cantidad de azúcares reductores en la fermentación líquida

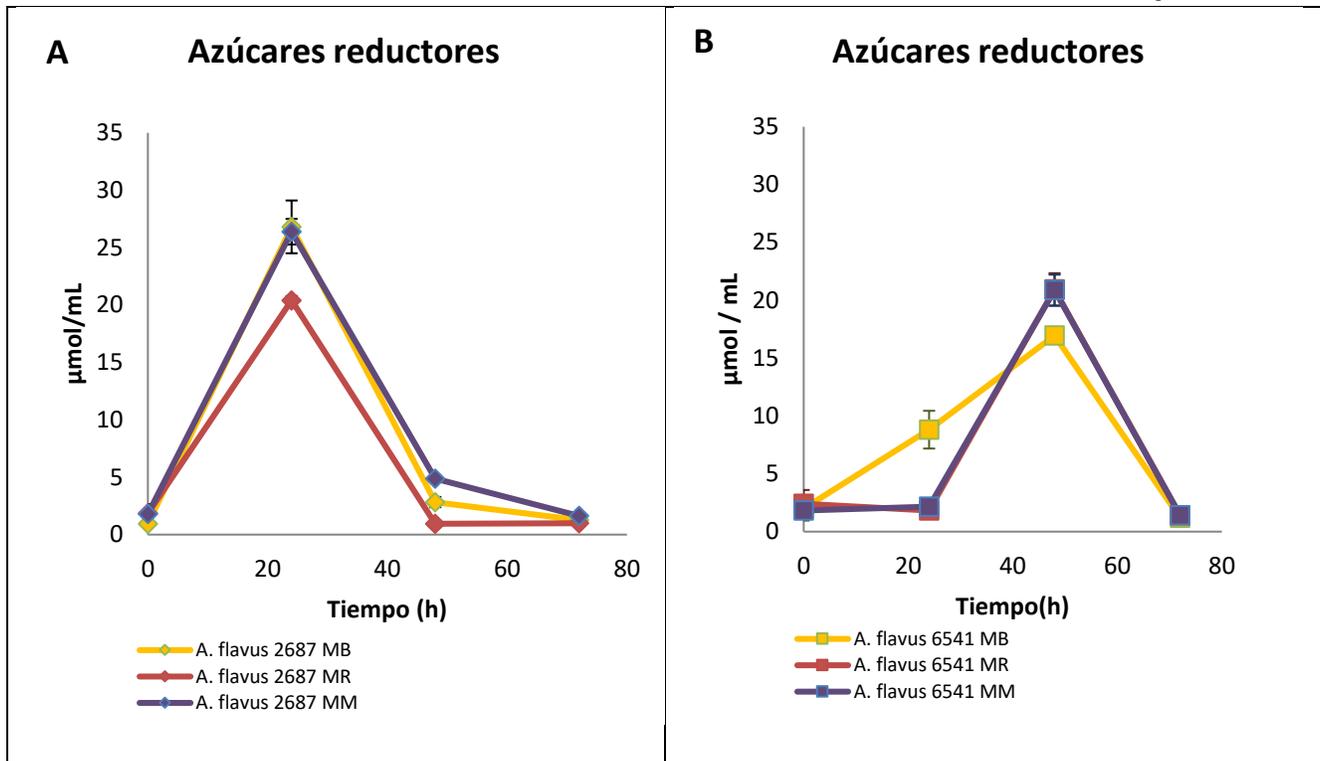


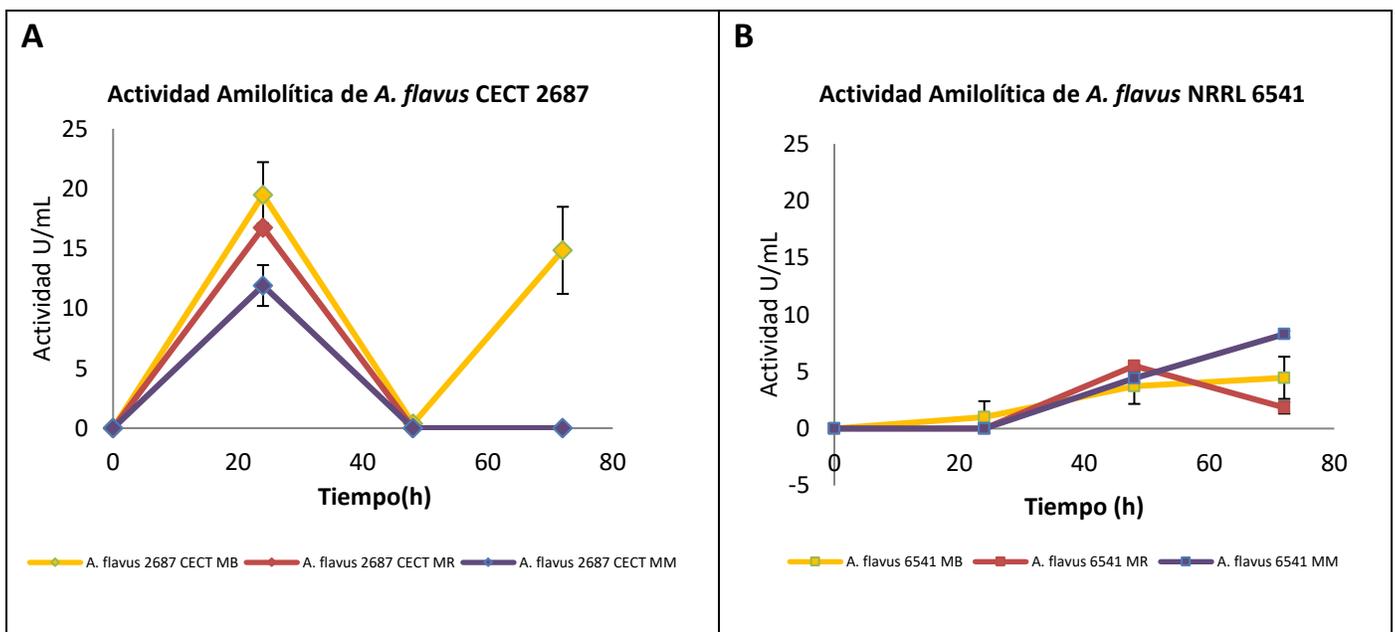
Figura 20. Cantidad de azúcares reductores en la fermentación líquida en maíz blanco (MB), maíz rojo (MR) y maíz morado (MM) **A.** *Aspergillus flavus* CECT 2687 (*A. flavus* 2687) **B.** *Aspergillus flavus* NRRL 6541 (*A. flavus* 6541)

Como puede observarse en la Figura 20 de los azúcares reductores hay una gran diferencia en su producción, la cual está ligada al tipo de enzimas que se producen, en la cepa toxigénica *A. flavus* CECT 2687 el máximo de los azúcares reductores se da en las primeras 24 horas de fermentación, en los tres diferentes tipos de maíz, la cepa no toxigénica *A. flavus* NRRL 6541 tiene un máximo de concentración de azúcares reductores en el medio hasta las 48h, esta diferencia la podemos atribuir al metabolismo del hongo principalmente en la regulación de la producción de las enzimas degradadoras de polisacáridos, si relacionamos la cantidad de azúcares reductores con la presencia de enzimas degradadoras de los polisacáridos presentes en el grano de maíz como el almidón podemos inferir que la cepa toxigénica produce la mayoría de las enzimas en las primeras 24h y la cepa no toxigénica hasta las 48h con la finalidad de disponer de los azúcares como la glucosa e incorporarlas a su metabolismo.

9.1.2. Actividad amilolítica, xilanolítica y exo-pectinolítica de la fermentación líquida.

Las actividades enzimáticas de *A. flavus* CECT 2687 tiene un máximo de actividad a las 24 horas en los tres diferentes tipos de maíz y la cepa no toxigénica *A. flavus* NRRL 6541 tiene una máximo de actividad a las 48 h lo que nos indica que la cepa toxigénica secreta tempranamente las enzimas degradadoras de los polisacáridos que componen al grano para disponer de los azúcares simples a comparación de la cepa no toxigénica que secreta las enzimas degradadoras de polisacáridos después de las 24h. A pesar de que la única diferencia entre las cepas es la presencia o ausencia de la producción de aflatoxinas podemos darnos cuenta que también existen diferencias a nivel metabólico por las diferencias que se observan en la Figura 20 de azúcares reductores y de las correspondientes actividades enzimáticas como puede observarse en la Figura 21.

La actividad enzimática es reducida, es decir, la magnitud de las actividades nos indica una baja producción enzimática y con esta fermentación tuvimos problemas de reproducibilidad en cuanto a la medición de las actividades enzimáticas y debido a la gran variabilidad de los datos obtenidos no pudimos realizar un análisis estadístico para determinar si existe o no una diferencia significativa de las actividades enzimáticas con respecto al tipo de maíz utilizado como fuente de nutrientes.



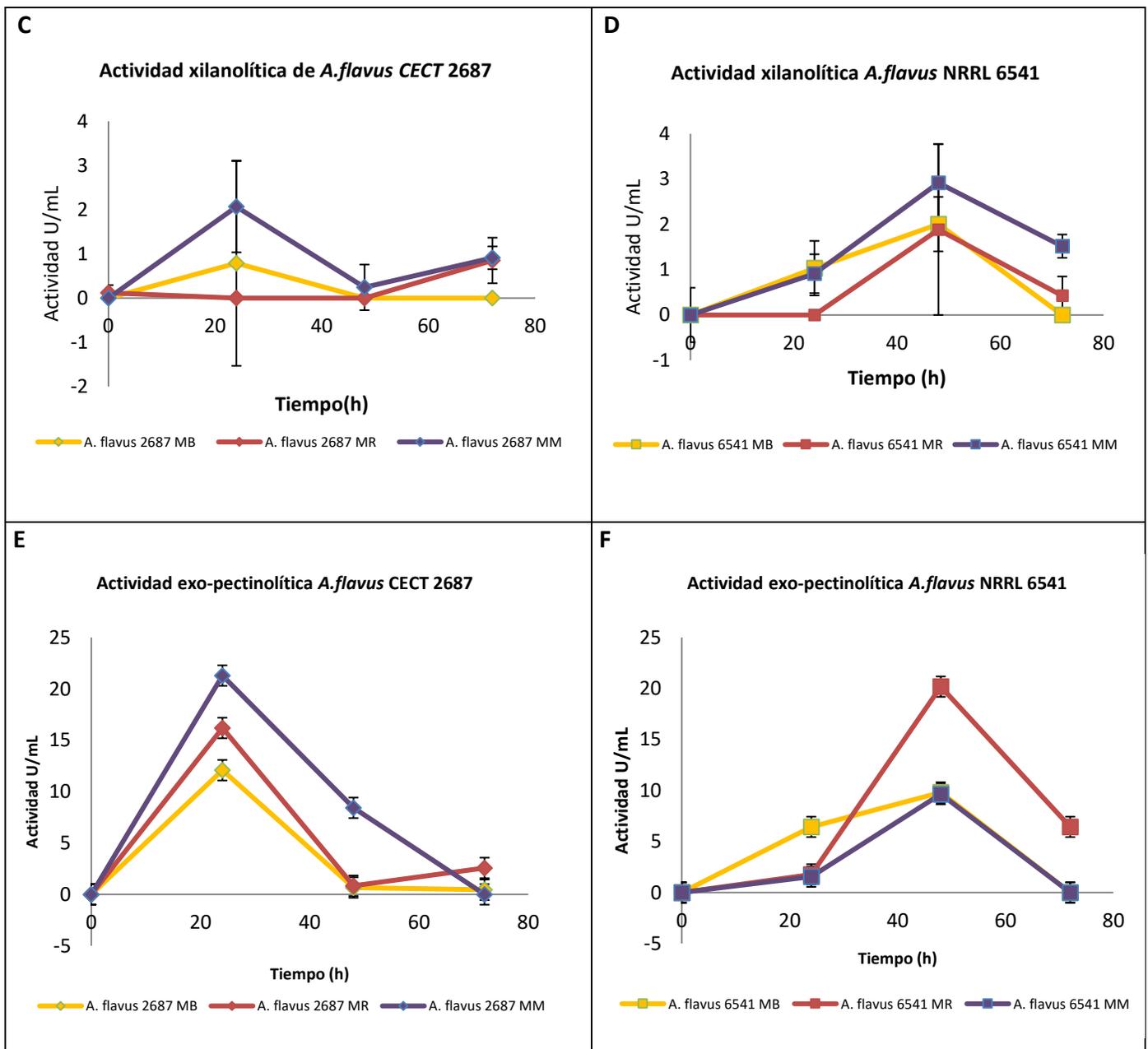


Figura 21. Actividad enzimática en cultivos líquidos:

A. Actividad amilolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687

B. Actividad amilolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541

C. Actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687

D. Actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541

E. Actividad exopectinolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687

F. Actividad exopectinolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541

Un dato importante que nos muestra la fermentación líquida es la mayor actividad de las amilasas de la cepa toxigénica *A. flavus* CECT 2687 con respecto a la cepa no toxigénica *A. flavus* NRRL 6541, lo que demuestra una mayor y más rápida producción de amilasas, en las condiciones de este estudio.

9.2 Resultados del crecimiento de las cepas en medio sólido

Crecimiento de la cepa *Aspergillus flavus* CECT 2687 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado como única fuente de nutrientes Figura 22.

| TIPO DE MAIZ | FRENTE | REVERSO | TAMAÑO DE LA COLONIA (cm) (4 días) |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| BLANCO |  |  | 0.5 |
| ROJO |  |  | 0.4 |
| MORADO |  |  | 1.5 |

Figura 22. Crecimiento de la cepa *Aspergillus flavus* CECT 2687 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado como única fuente de nutrientes en agar bacteriológico 1.5% y maíz triturado al 1%. Se incubaron por 4 días a 37°C.

Crecimiento de la cepa *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado como única fuente de nutrientes Figura 23.

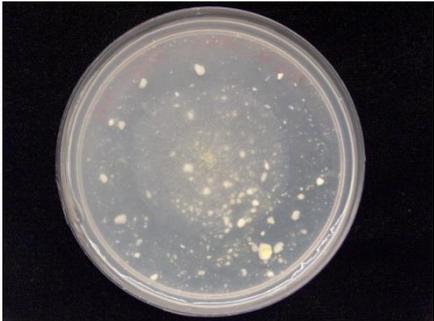
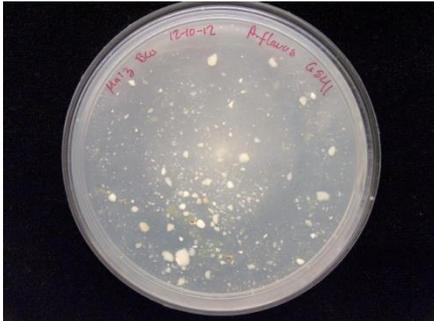
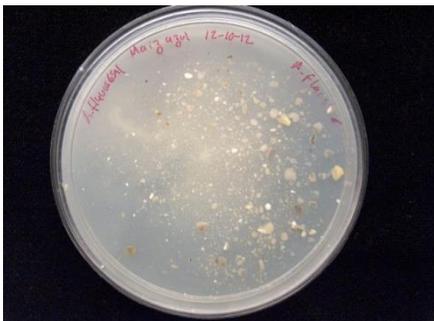
| TIPO DE MAIZ | FRENTE | REVERSO | TAMAÑO DE LA COLONIA (cm) (4 días) |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| BLANCO |  |  | 0.5 |
| ROJO |  |  | 0.5 |
| MORADO |  |  | 0.8 |

Figura 23. Crecimiento de la cepa *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado como única fuente de nutrientes en agar bacteriológico 1.5% y maíz triturado al 1%. Se incubaron por 4 días a 37°C.

En el caso de la cepa toxigénica, se observó crecimiento en los tres tipos de maíz ver Figura 22, el que presenta mayor crecimiento de la cepa es el maíz morado (1.5 cm diámetro de la colonia y con esporulación), seguida del blanco (0.5 cm de diámetro de la colonia con esporulación) y el maíz rojo (0.4 cm de diámetro de la colonia y sin esporulación). El diámetro de la colonia se midió considerando la parte más densa de la misma. En el caso de la cepa no toxigénica, se observa crecimiento en los tres tipos de maíz es escaso (menor a 1 cm de diámetro de la colonia) considerando la región más densa de la misma, ver Figura 23.

9.2.1 Crecimiento de las de las diferentes cepas en placas de agar con maíz triturado al 1% inoculadas sobre membrana.

Las dos cepas resultaron tener un crecimiento deficiente y escaso ver Figura 24 y 25 (colonias con diámetro menor a 1 cm y con nula o poca esporulación) sobre las membranas que fueron retiradas después de cuatro días.

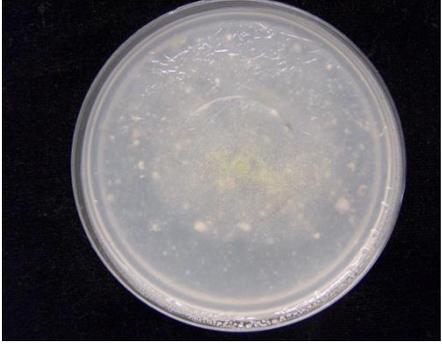
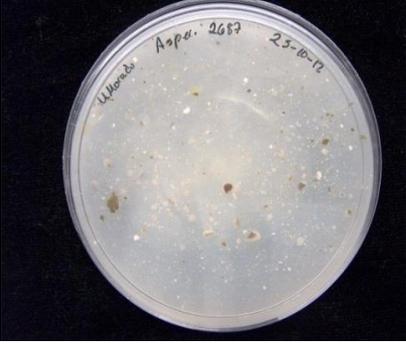
| TIPO DE MAIZ | FRENTE | REVERSO | TAMAÑO DE LA COLONIA (cm) (4 días) |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| BLANCO |  |  | 1.0 |
| ROJO |  |  | 0.5 |
| MORADO |  |  | 0.6 |

Figura 24. Crecimiento de la cepa *Aspergillus flavus* CECT 2687 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado como única fuente de nutrientes en agar bacteriológico 1.5% y maíz triturado al 1%. Se inocularon sobre una membrana y se delimito un área circular en el agar de 4 cm de diámetro Se incubaron por 4 días a 37°C.

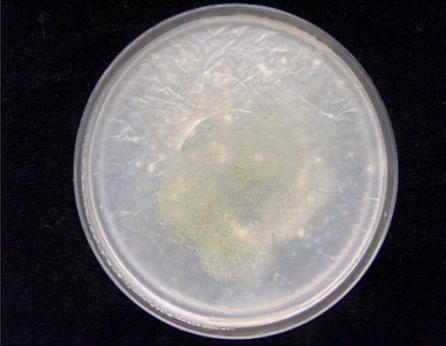
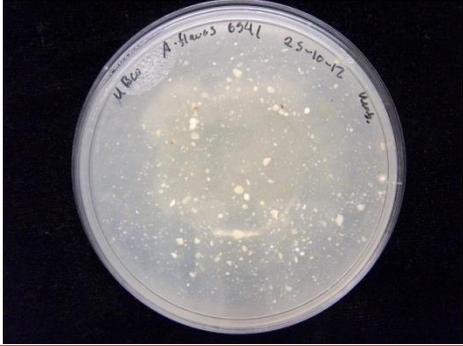
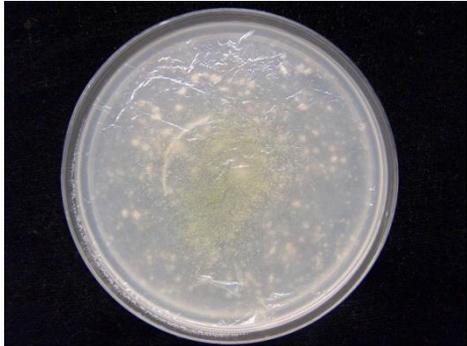
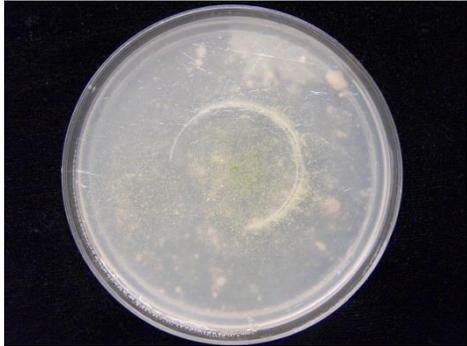
| TIPO DE MAIZ | DE | FRENTE | REVERSO | TAMAÑO DE LA COLONIA (cm) (4 días) |
|--------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| BLANCO | |  |  | 0.6 |
| ROJO | |  |  | 0.6 |
| MORADO | |  |  | 0.3 |

Figura 25. Crecimiento de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en medio sólido con maíz blanco, maíz rojo y maíz morado como única fuente de nutrientes en agar bacteriológico 1.5% y maíz triturado al 1%. Se inocularon sobre una membrana y se delimitó un área circular en el agar de 4 cm de diámetro. Se incubaron por 4 días a 37°C.

En este ensayo se delimitó un área circular de 4 cm para extraer las enzimas y cuantificar las actividades enzimáticas de amilasas, xilasas y exo-pectinasas por triplicado, resultando una magnitud y reproducibilidad muy baja, debido al escaso crecimiento que presenta el hongo sobre la membrana por el escaso contacto que tiene el hongo con los granos de maíz triturado y suspendido en el agar.

9.3 Resultado del crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en los diferentes tipos de granos de maíz mexicano.



Figura 26. Crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 sobre los granos de maíz de diferentes tipos, incubados durante 7 días a 31 °C inoculados con punción y sin punción.

9.4 Resultado del crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en los diferentes tipos de granos de maíz mexicano.

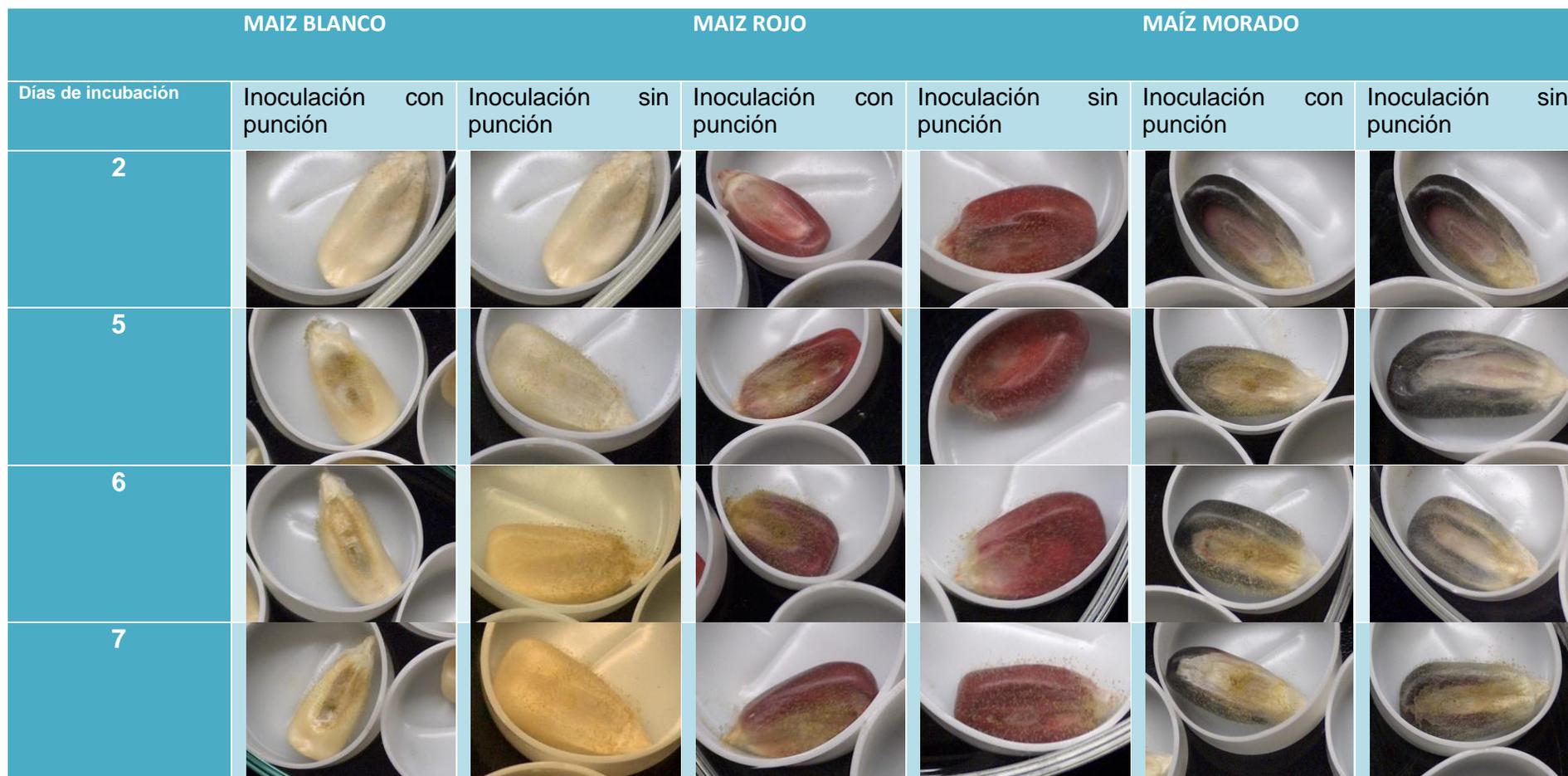


Figura 27. Crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT 2687 sobre los granos de maíz de diferentes tipos, incubados durante 7 días a 31 °C inoculados con punción y sin punción.

9.5 Morfología de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 infectando granos de maíz.

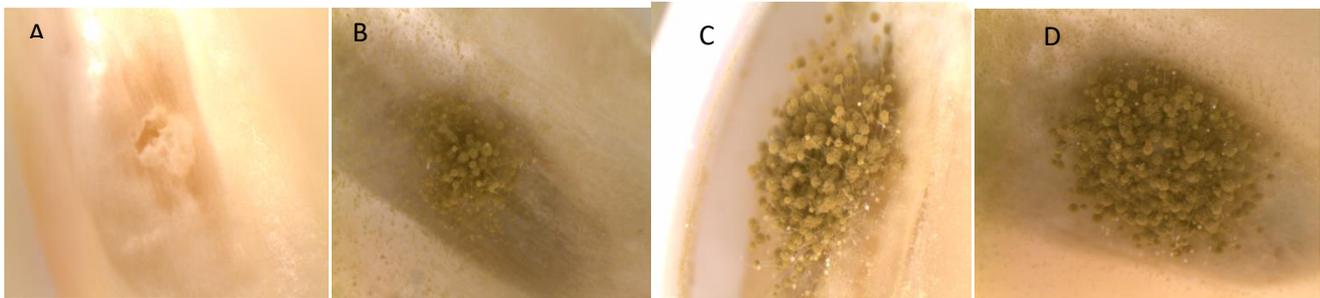


Figura 28. Crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en maíz blanco con punción. **A** Grano de maíz inoculado con cero días de incubación **B, C y D** Diferentes granos con 7 días de incubación,

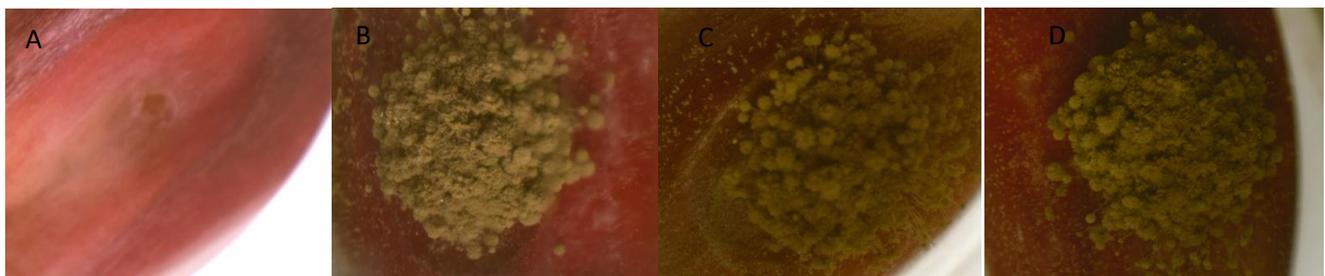


Figura 29. Crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en maíz rojo con punción. **A** Grano de maíz inoculado con cero días de incubación **B, C y D** Diferentes granos con 7 días de incubación,

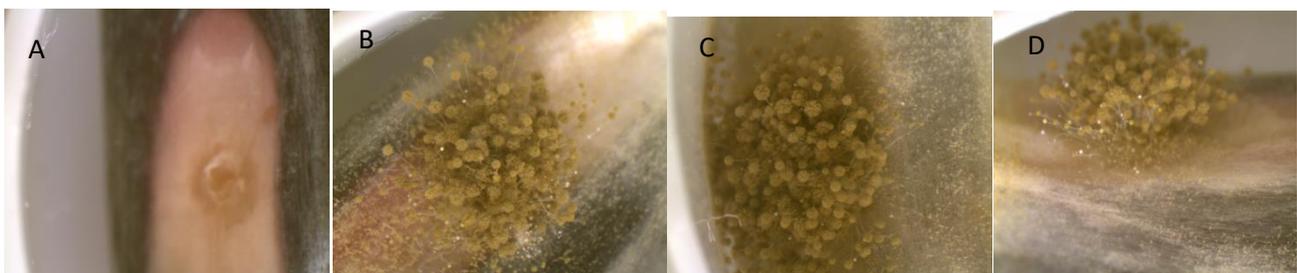


Figura 30. Crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en maíz morado con punción. **A** Grano de maíz inoculado con cero días de incubación **B, C y D** Diferentes granos con 7 días de incubación.

9.6 Morfología de *Aspergillus flavus* CECT 2687 infectando el grano de maíz.

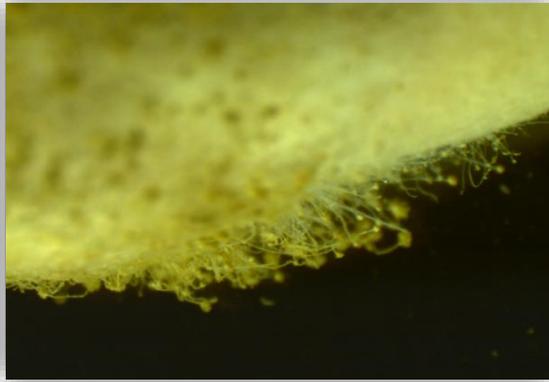


Figura 31. *Aspergillus flavus* CECT 2687 en maíz blanco



Figura 32. *Aspergillus flavus* CECT 2687 en maíz morado

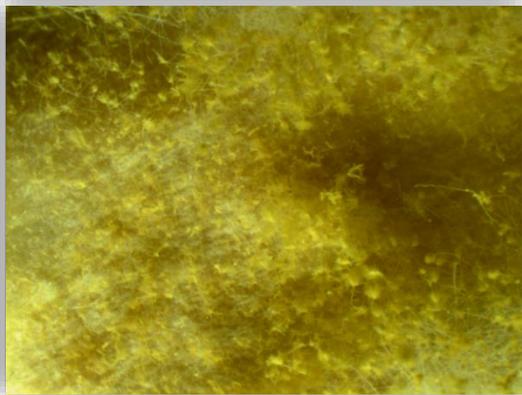


Figura 33. *Aspergillus flavus* CECT 2687 en maíz blanco

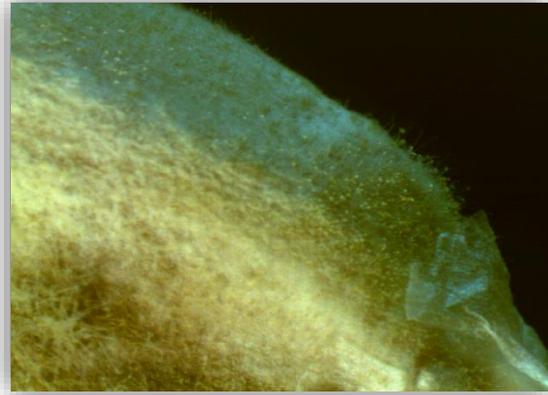


Figura 34. *Aspergillus flavus* CECT 2687 en maíz blanco



Figura 35. *Aspergillus flavus* CECT 2687 en maíz blanco

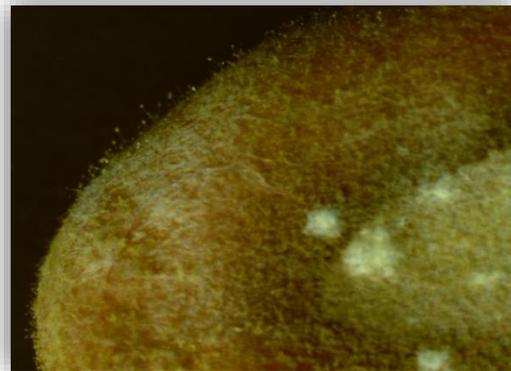


Figura 36. *Aspergillus flavus* CECT 2687 en maíz morado

En cuanto al crecimiento del hongo en los granos de maíz es favorable a los 5 días para la cepa no toxigénica ver Figura 26, sin embargo la cepa toxigénica crece muy poco y comienza

a tener un crecimiento abundante hasta los días 7 u 8 ver Figura 27, por lo que el ensayo de ambas cepas se incubaron por 10 días para asegurar una mayor producción enzimática de la cepa toxigénica.

Al probarse dos tipos de inoculación uno con punción y otro sin punción, ambos inóculos en el área del embrión o germen, se observa un mayor crecimiento en los granos con punción por el daño mecánico dejando expuesto el germen para que el hongo tenga acceso a los azúcares simples que lo componen, debido a que *Aspergillus flavus* crece rápidamente en los granos con punción se decide utilizar este procedimiento para acortar los tiempos de incubación en los ensayos.

Al observar el crecimiento de ambas cepas *Aspergillus flavus* NRRL 6541 (no toxigénica) crece abundantemente en el sitio de la punción y lentamente va invadiendo las demás estructuras del grano de maíz (ver Figuras 28, 29 y 30), *Aspergillus flavus* CECT 2687 (toxigénica) tiene un crecimiento escaso como puede observarse en las figuras 31 a 36, a pesar de su escaso crecimiento tiene la capacidad de extender su crecimiento sobre el pericarpio del grano de maíz a comparación de la cepa no toxigenica en donde su crecimiento es abundante en la zona de punción del germen.

Los resultados de las actividades enzimáticas de los extractos enzimáticos de los granos inoculados directamente resultaron muy satisfactorios en cuanto a la magnitud de amilasas, xilanasas, celulasas y exo-pectinasas por lo que se selecciona este sistema para la producción y análisis de las enzimas secretadas por las cepas de *Aspergillus flavus*, también es el más adecuado para analizar el proceso de infección del hongo cuando invade este grano en particular.

Debido a la gran variación en los resultados de actividad enzimática obtenidos de la extracción individual de los granos de maíz inoculados con ayuda del desmembrador, se consideró aplicar otra técnica para la extracción de las enzimas que reduzca la variación de los resultados. La técnica considera un mayor número de granos de maíz inoculados (20 granos) de cada tipo, para después de incubarlos, procesarlos con ayuda de un molino de semillas y extraer las enzimas de 2 gramos de muestra por triplicado (equivalente al peso promedio de 4 granos de maíz), posteriormente la extracción se realiza con 10 mL de Buffer de fosfatos 100 mM a pH= 6.0.

9.7 Crecimiento de *A. flavus* CECT 2687 y *A. flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación sobre los granos de maíz.

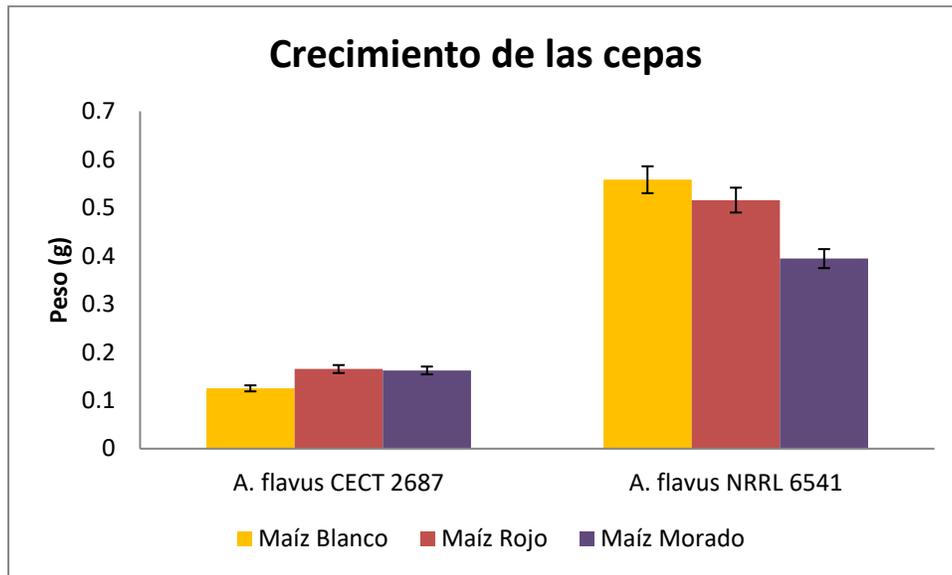


Figura 37. Crecimiento de las dos cepas en los tres diferentes tipos de granos de maíz inoculados con punción de *A. flavus* CECT 2687 y *A. flavus* NRRL 6541, después de 10 días de incubación.

La cepa que tiene mayor crecimiento es la no toxigénica *A. flavus* NRRL 6541 en el maíz blanco, seguido del maíz rojo y morado ver Figura 37. La cepa con menor crecimiento es la toxigénica *A. flavus* CECT 2687 corroborando lo que se observa después de 10 días de incubación de las dos cepas en los granos de maíz inoculados con punción, ver Figura 38 y 39.

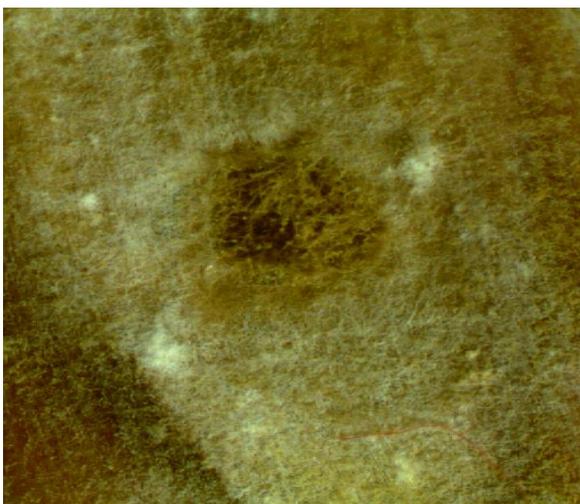


Figura 38. *A. flavus* CECT 2687 en granos de maíz morado después de 10 días de incubación



Figura 39. *A. flavus* NRRL 6541 en granos de maíz morado después de 10 días de incubación

9.8 Actividad amilolítica en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas *A. flavus* CECT 2687 y *A. flavus* NRRL 6541, con 10 días de incubación.

Se determinó la actividad de amilasas porque el almidón es el principal constituyente del grano de maíz y existe una relación entre la producción de aflatoxinas y la secreción de amilasas de *Aspergillus flavus* (Figura 40).

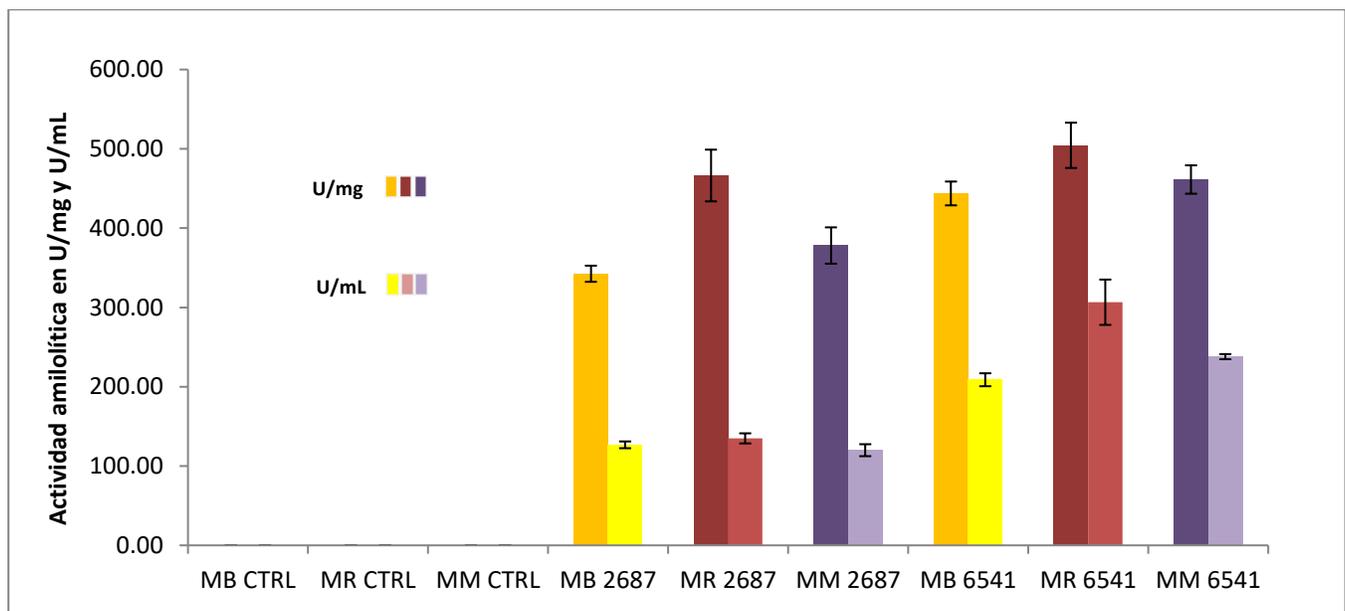


Figura 40. Actividades amilolíticas específicas en U/mg y U/mL de las dos cepas de *Aspergillus flavus* (2687= *A. flavus* CECT 2687 y 6541= *A. flavus* NRRL 6541) en los tres tipos de maíz (MB= maíz blanco, MR=maíz rojo, MM= maíz morado, CTRL=maíz control).

Se determinaron las actividades de amilasas una de las mediciones se divide entre los mg de proteína que se extrajo en cada muestra y la otra se dividió entre el volumen del extracto enzimático con el fin de eliminar variaciones entre las muestras de cada lote analizado. En la mayoría de los casos se observa un incremento de la desviación estándar en la actividad específica medida como U/mg, debido a que aumenta el error del método que se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína.

Para determinar si existe diferencia significativa entre las actividades que se midieron y los tres diferentes tipos de maíz se realizaron pruebas estadísticas (ANOVA), las cuales se encuentran en el Anexo 1.

Los resultados obtenidos en las actividades cuantificadas como U/mL de la cepa toxigénica de *A. flavus* CECT 2687 no hay diferencia significativa entre las actividades de amilasas y los

diferentes tipos de maíz. En las actividades específicas U/mg si hay diferencia significativa entre las actividades de las amilasas y los diferentes tipos de maíz como se observa en la Tabla 1 y Tabla 2 del Anexo 1.

En la cepa no toxigénica de *A. flavus* NRRL 6541 en las actividades específicas medidas como U/mL, después de realizar el análisis estadístico, hay diferencia significativa entre las actividades de las amilasas y los diferentes tipos de maíz como se muestra en la Tabla 3 del Anexo 1.

Las posibles amilasas del grano se inactivaron con calor, las actividades medidas en los granos son exclusivamente enzimas secretadas por el hongo.

9.9 Actividad de las exopectinasas en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas *A. flavus* CECT 2687 y *A. flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

Como la pectina es el componente más expuesto de la pared celular de los vegetales se decide medir la actividad de exopectinasas de las tres cepas en los diferentes tipos de maíz (Figura 41).

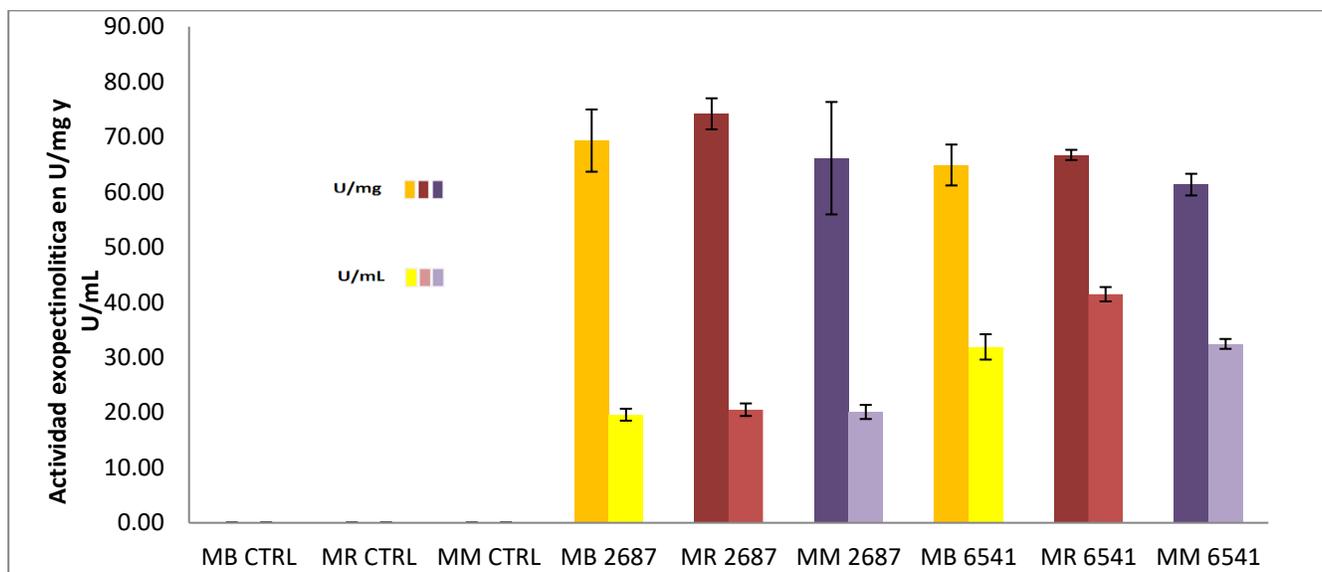


Figura 41. Actividades exopectinasas específicas en U/mg y U/mL de las dos cepas de *Aspergillus flavus* (2687= *A. flavus* CECT 2687); (6545= *A. flavus* NRRL 6541) en los tres tipos de maíz (MB= maíz blanco, MM=maíz rojo, MA= maíz Morado, CTRL= Control).

La desviación estándar de las mediciones de la actividad enzimática aumenta en las representadas por U/mg debido a la suma del error analítico al cuantificar la proteína, por lo que solo se realizó el análisis estadístico con la actividad enzimática expresada en (U/mL) en

el que la cepa *A. flavus* CECT 2687 toxigénica presenta el siguiente análisis de varianza para los tres diferentes tipos de maíz que se encuentra en la tabla 5 del Anexo 1. No hay diferencia significativa con un $\alpha=0.05$ entre los tres diferentes tipos de maíz este resultado también concuerda con el obtenido en la actividad de las amilasas, al parecer la producción de enzimas no se ve alterada por el tipo de maíz y por ende de la cantidad de antocianinas que tiene el grano de maíz. En el caso de *A. flavus* NRRL 6451 no toxigénico el análisis estadístico (Tabla 6 el Anexo 1) arroja que sí hay una diferencia significativa entre la producción de exopectinasas y los diferentes tipos de maíz, siendo mayor en el maíz rojo al igual que la producción de amilasas, dicha diferencia significativa corresponde a las unidades U/mL.

9.10 Actividad de celulasas en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas *A. flavus* CECT 2687 y *A. flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

Como la celulosa es un componente importante del pericarpio del grano de maíz se justifica cuantificar la actividad de la enzima celulasa secretada por el hongo al ser inoculado en el grano de maíz (Figura 42).

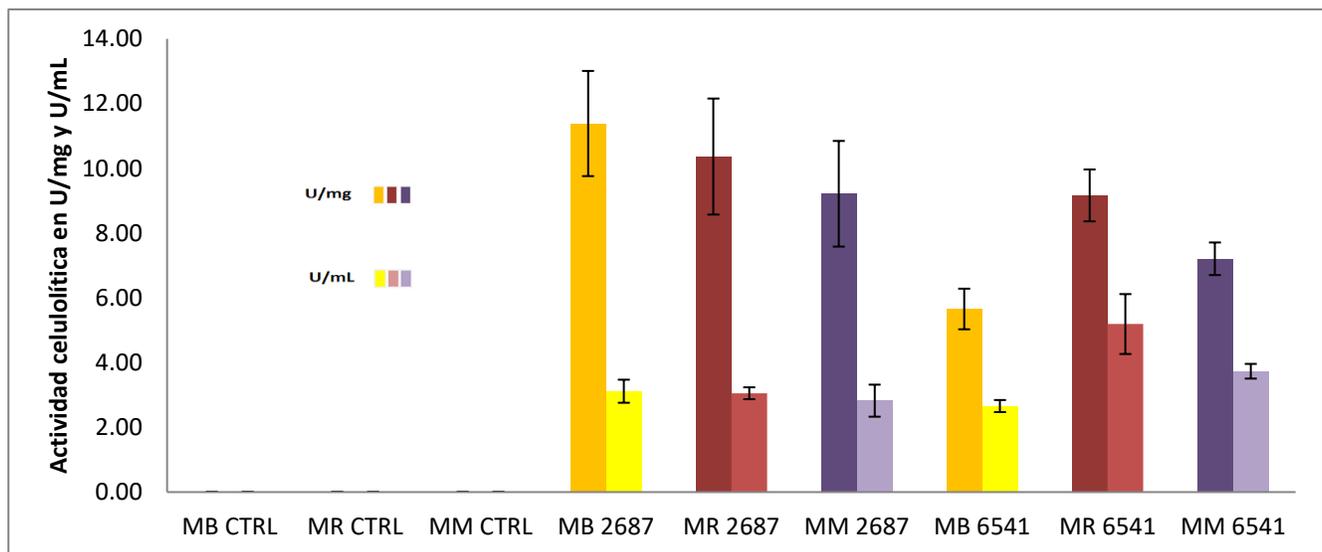


Figura 42. Actividades celulasas específicas en U/mg y U/mL de las dos cepas de *Aspergillus flavus* (2687= *A. flavus* CECT 2687); 6545= *A. flavus* NRRL 6541) en los tres tipos de maíz (MB= maíz blanco, MM=maíz rojo, MA= maíz morado, CTRL= Control).

A. flavus CECT 2687 tiene una producción de celulasas igual en los tres diferentes tipos de maíz siendo consistente con las actividades de amilasas y exopectinasas (ver Tabla 7 del Anexo 1).

En el caso de *A. flavus* NRRL 6541 el análisis de varianza muestra (Tabla 8 del Anexo 1) que si hay diferencias significativas en la producción de celulasas al igual que en las otras actividades siendo el maíz rojo el de mayor actividad. Al parecer la cepa de *A. flavus* NRRL 6541 se ve afectada por el tipo de maíz en el cual crece siendo mayor en el maíz rojo.

9.11 Actividad de las xilanasas en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz inoculados con punción de las cepas *A. flavus* CECT 2687 y *A. flavus* NRRL 6541 y con 10 días de incubación.

Debido a que el xilano es el principal constituyente de la hemicelulosa y el pericarpio del grano de maíz tiene una porción importante de dicha estructura se justifica medir las actividades de dichas enzimas (Figura 43).

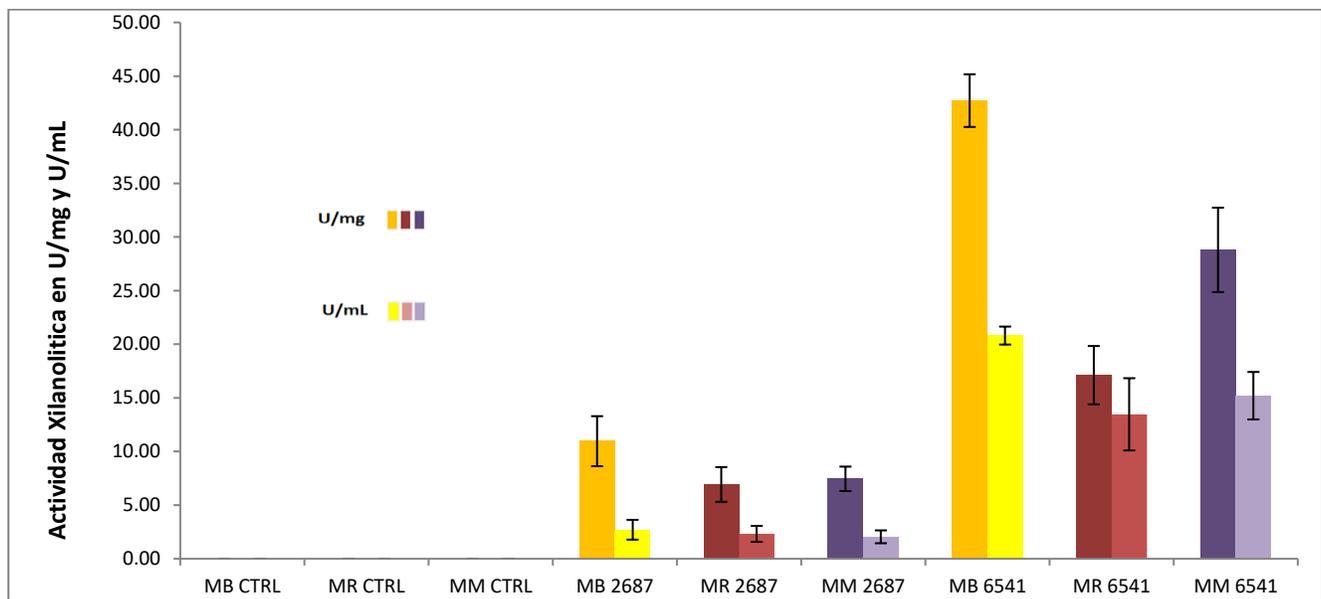


Figura 43. Actividades xilanasas específicas en U/mg  y U/mL  de las dos cepas de *Aspergillus flavus* (2687= *A. flavus* CECT 2687); 6545= *A. flavus* NRRL 6541) en los tres tipos de maíz (MB= maíz blanco, MM=maíz rojo, MA= maíz morado, CTRL= Maíz Control).

El análisis estadístico que se muestra en la Tabla 9 del Anexo 1 de la cepa *A. flavus* CECT 2687 muestra que no hay diferencias significativas en la producción de las xilanasas y con lo anterior podemos decir que el tipo de maíz no afecta la producción de las enzimas.

En el caso de la cepa no toxigénica *A. flavus* NRRL 6541 se muestra una diferencia significativa de la actividad de xilanasas al igual que las otras actividades solo que esta vez es mayor en el maíz blanco (ver ANOVA de la Tabla 10 del Anexo 1). La cepa *A. flavus* NRRL 6541 no toxigénica es la que tiene el más alto valor de las actividades debido a que se relaciona con

su crecimiento pues es la que más crece e invade el grano de maíz, la mayor diferencia en producción entre las dos cepas se da en las xilanasas. Las actividades de los granos de maíz control son despreciables pues tienen un valor muy bajo o casi nulo, debido al proceso de inactivación por calor de las enzimas por lo que las actividades cuantificadas son específicamente de las enzimas secretadas por el hongo.

Al parecer la cepa no toxigénica *A. flavus* NRRL 6541 tiene una mayor secreción de enzimas en el maíz rojo no podemos asegurar a que solo sea debido a la presencia de antocianinas, pues hay que considerar otros factores como los mecanismos de defensa del grano y la composición del mismo.

9.12 Actividades enzimáticas (U/mg) la cepa *Aspergillus flavus* CECT 2687 y *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en diferentes días de incubación de los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz blanco.

Debido a que la cepa *Aspergillus flavus* NRRL 6541 presenta diferencia en la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular en los diferentes tipos de maíz utilizados como sustrato se decidió realizar el ensayo de identificación de proteínas en el maíz blanco, el cual no tiene antocianinas (pigmentos) que pudieran interferir en la producción y cuantificación de las actividades enzimáticas y realizar el análisis comparativo de las enzimas secretadas en cada cepa por diferentes días de incubación y realizar un análisis comparativo entre ambas cepas.

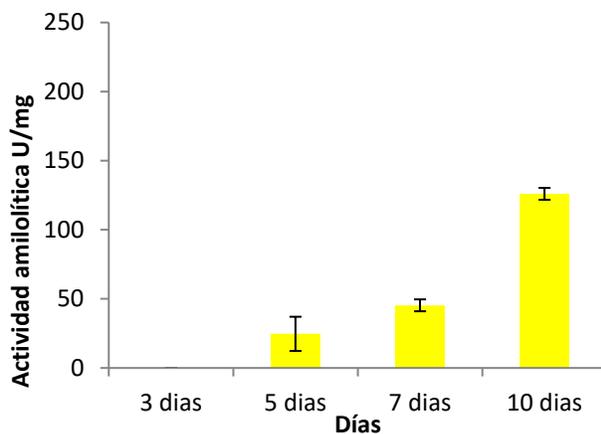


Figura 44. Actividad amilolítica (U/mg) de la cepa toxigénica a *Aspergillus flavus* CECT 2687 diferentes días de incubación

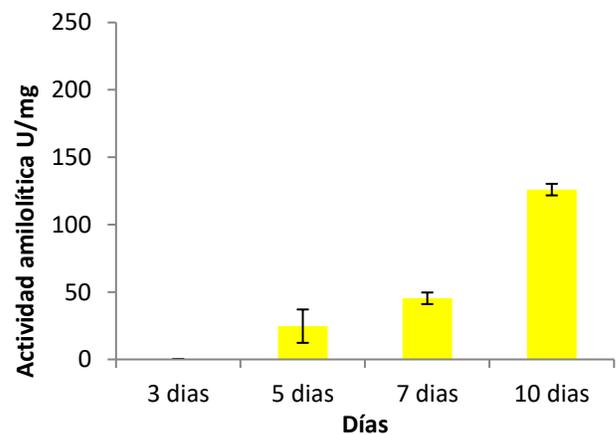


Figura 45. Actividad amilolítica (U/mg) de la cepa no toxigénica a *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en diferentes días de incubación

La actividad amilolítica se cuantifica hasta el día 5, y es mayor en la cepa no toxigénica, lo cual está relacionado con el mayor crecimiento que presenta la cepa sobre los granos de maíz, ver Figuras 44 y 45.

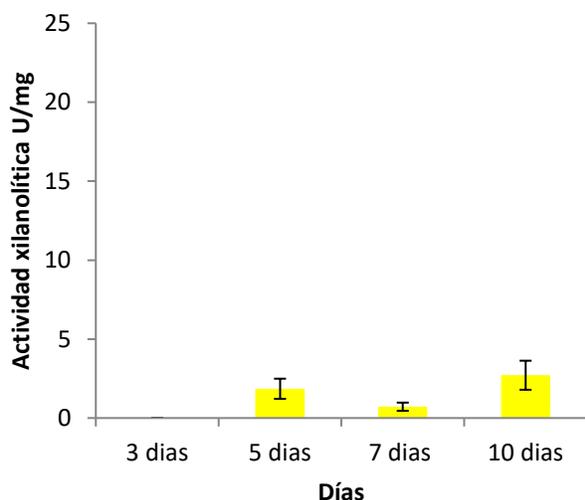


Figura 46. Actividad xilanolítica (U/mg) de la cepa toxigénica a *Aspergillus flavus* CECT 2687 diferentes días de incubación

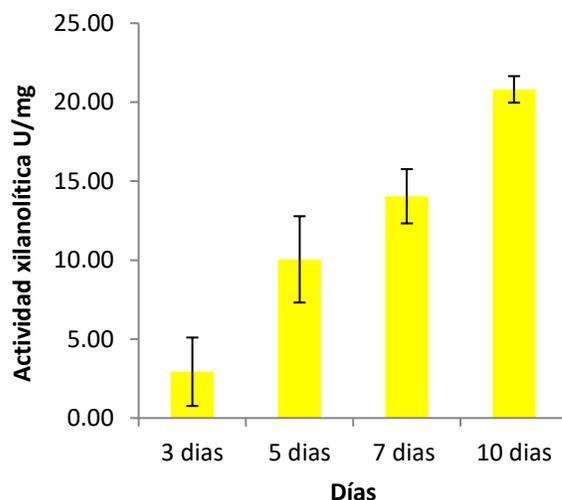


Figura 47. Actividad xilanolítica (U/mg) de la cepa no toxigénica a *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en diferentes días de incubación

La actividad xilanolítica en la cepa toxigénica se detecta a los 5 días de incubación, sin embargo, en la cepa no toxigénica pudimos detectar actividad de xilanasas a partir del 3er día. La cepa no toxigénica produce una mayor cantidad de xilanasas en comparación con la cepa toxigénica (Ver Figuras 46 y 47).

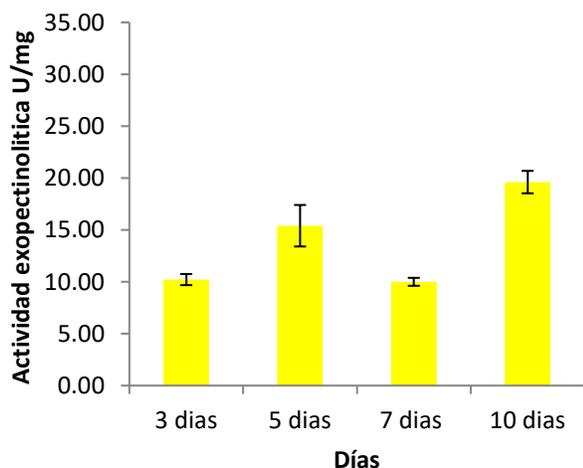


Figura 48. Actividad exopectinolítica (U/mg) de la cepa toxigénica a *Aspergillus flavus* CECT 2687 diferentes días de incubación

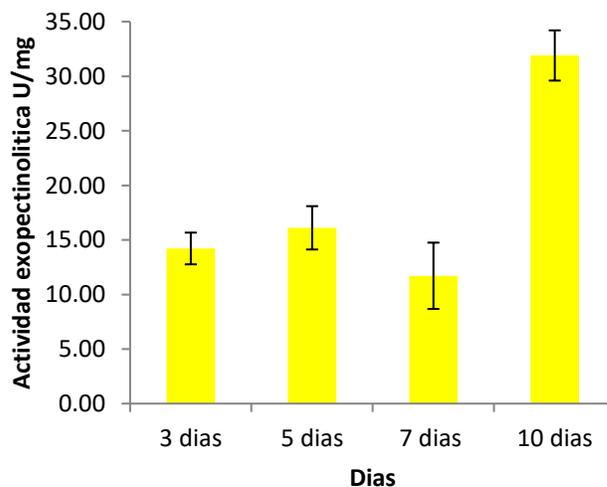


Figura 49. Actividad exopectinolítica (U/mg) de la cepa no toxigénica a *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en diferentes días de incubación.

La actividad exopeptinolítica se cuantificó desde el 3 día en ambas cepas y su producción es similar (Ver Figuras 48 y 49).

9.13 Análisis electroforético de las enzimas producidas por *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con zimogramas.

El objetivo de realizar los zimogramas fue identificar las bandas en donde se encuentran las enzimas con actividad amilolítica, xilanolítica y pectinolítica para posteriormente recortar las bandas directamente de los geles de electroforesis 1D y enviarlas al Laboratorio Universitario de Proteómica IBT/UNAM, para su identificación, a través de espectrometría de masas de alta resolución.

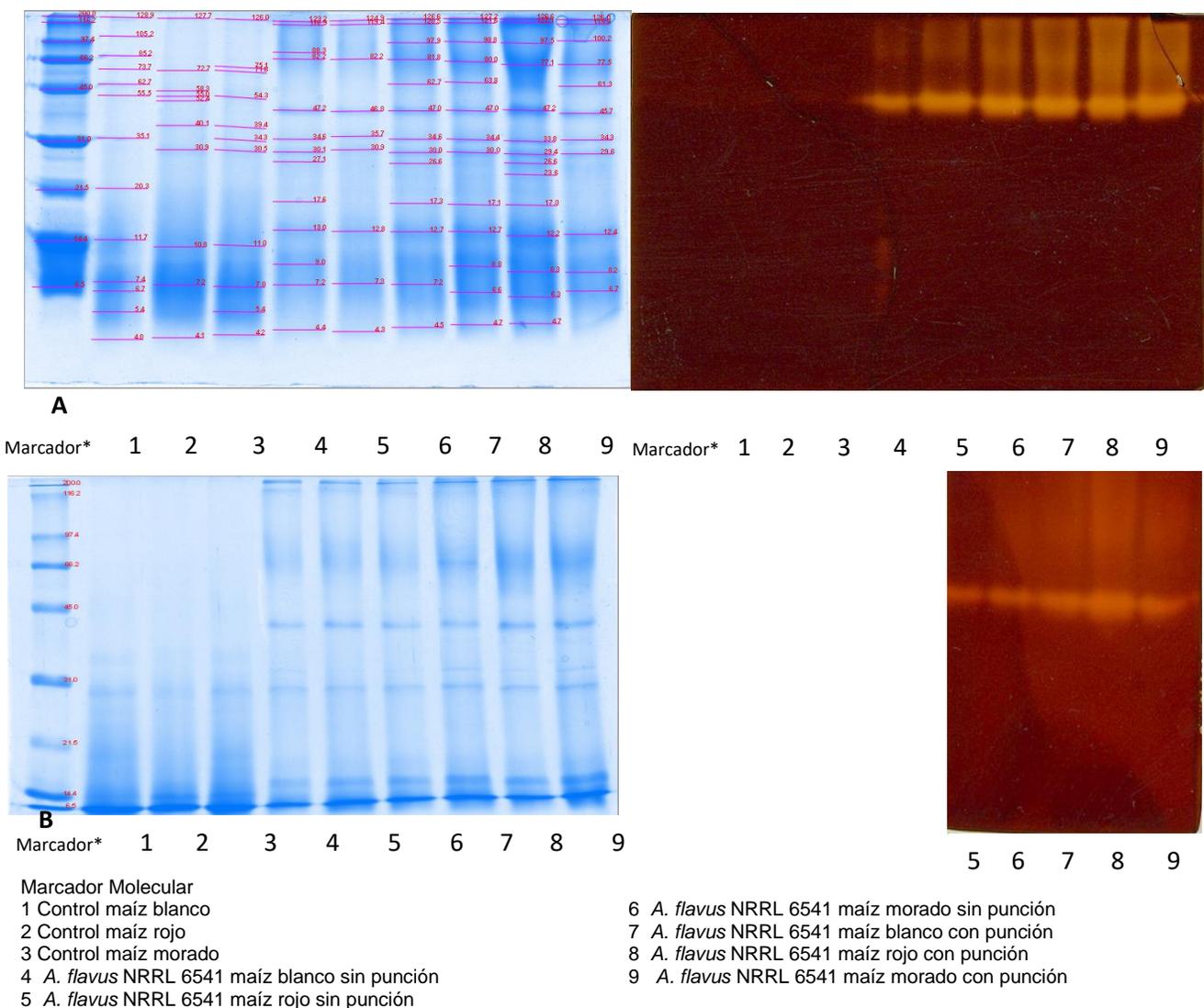


Figura 50. Resultado del zimograma de amilasas en la cepa *A. flavus* NRRL 6541 **A.** Gel de acrilamida al 15%. **B.** Gel de acrilamida al 12%.

Como se observa en el zimograma de amilasas (Figura 50), los granos control no muestran actividad de amilasas, por el contrario los granos inoculados muestran dos bandas de actividad de amilasas a 45 kDa aprox y 80-85 kDa

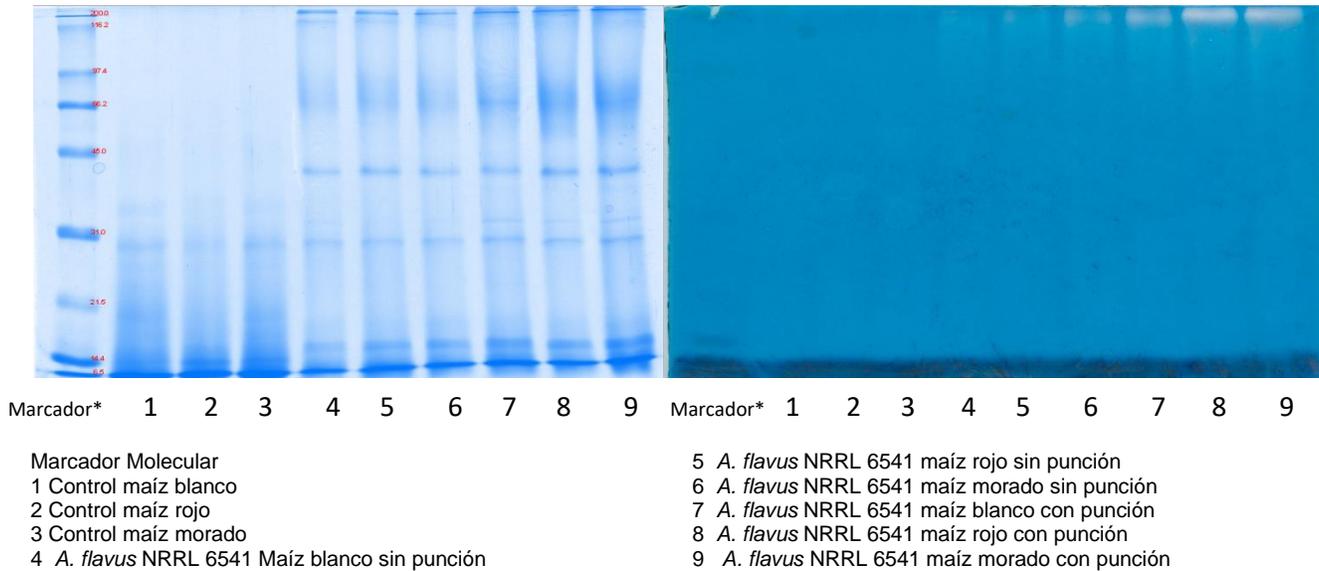


Figura 51. Resultado del zimograma de xilanasas en la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en Gel de acrilamida al 12%.

Se observan bandas de degradación en un rango de 120 a 150 kDa que pueden ser posibles beta-xilanasas o xilosidasas y se consideraron dichas bandas para enviarlas a identificación por Espectrometría de masas, ver Figura 51.

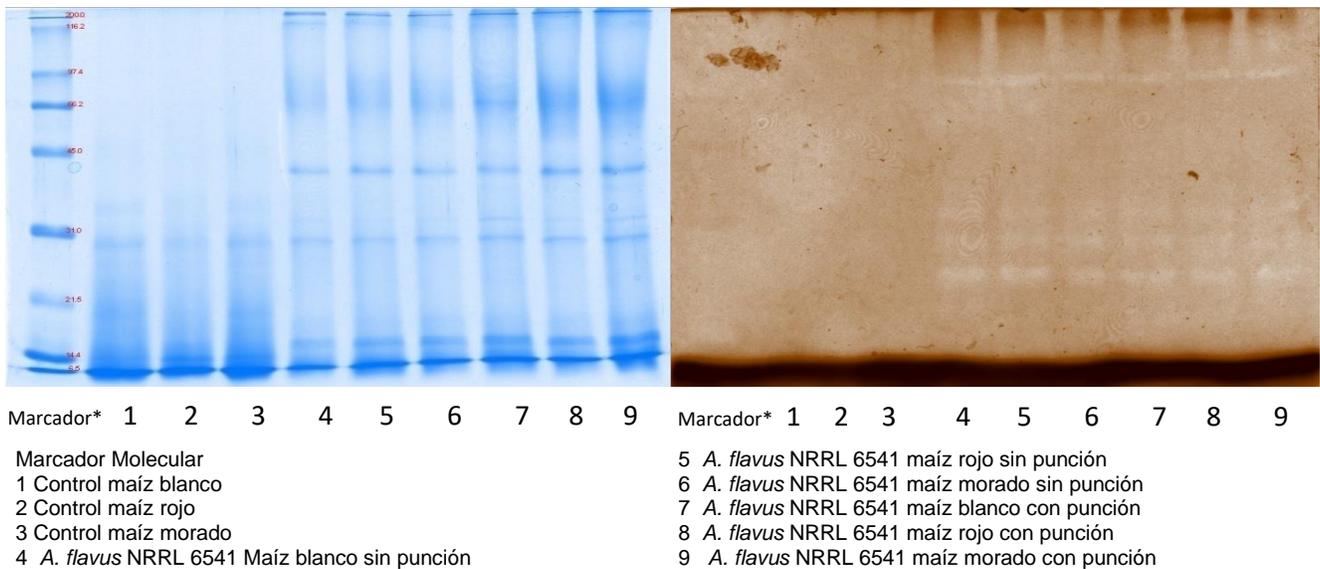


Figura 52. Resultado del zimograma de exopectinasas de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en gel de acrilamida al 12%.

Se observan cuatro bandas de degradación y no hay diferencia entre el tipo de inoculación y las enzimas secretadas por el hongo, se observa una banda a 23 kDa y dos de 27 a 33 kDa. Una banda de degradación alrededor de 95 a 97 kDa (ver Figura 52).

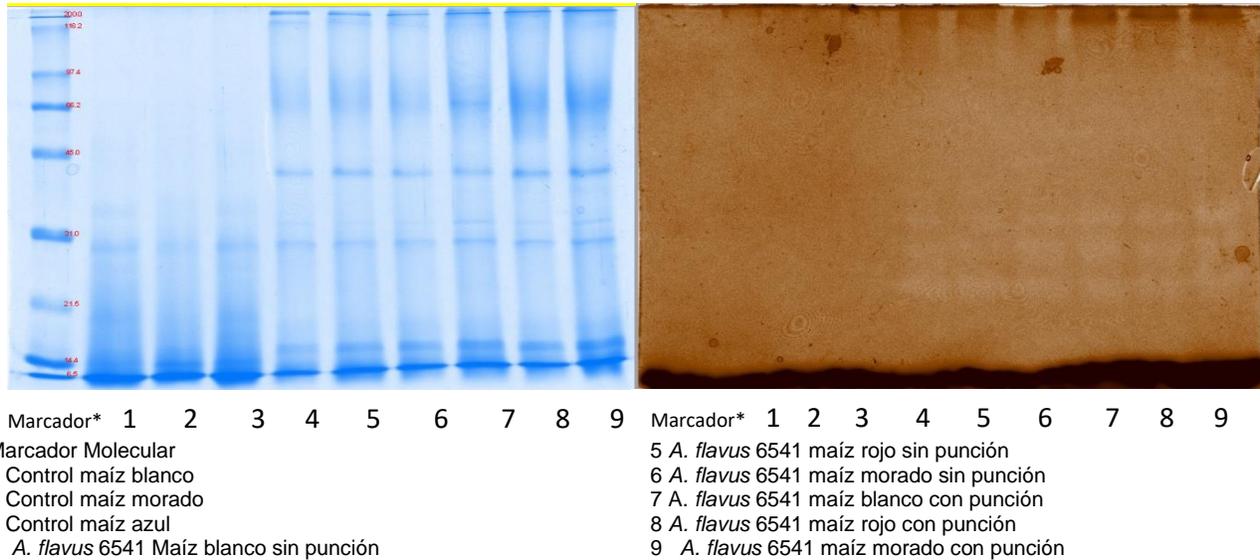


Figura 53. Resultado del zimograma de pectin liasas en la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en gel de acrilamida al 12%

Se observan cuatro bandas de degradación y no hay diferencia entre el tipo de inoculación y las enzimas secretadas por el hongo, se observa una banda a 23 kDa y dos de 27 a 33 kDa (Figura 53).

Los granos control no presentan actividad en ninguno de los diferentes zimogramas por el tratamiento con calor previo a la inoculación del grano de maíz.

9.14 Proteínas identificadas por espectrometría de masas en los granos de maíz sin inocular e inoculados con *Aspergillus flavus* cepa toxigénica y no toxigénica.

Para realizar el análisis adecuado de las proteínas identificadas es importante señalar la cantidad de evidencia con la que se cuenta hasta el momento con respecto a la existencia de dichas proteínas en *Zea mays* y en las cepas de *Aspergillus flavus*, según lo indica la base de datos UniProtKB puede ocurrir que la secuencia difiera ligeramente de las secuencias genómicas, especialmente para secuencias derivadas de las predicciones del modelo de genes.

En la base de datos UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) hay 5 tipos de pruebas de la existencia de una proteína:

1. Evidencia experimental a nivel de proteína.
2. Evidencia experimental a nivel de transcripción.
3. Proteína inferida por homología.
4. La proteína predicha.
5. Proteína incierta.

El valor 'Evidencia experimental a nivel de proteína' indica que existe evidencia experimental clara de la existencia de la proteína. Los criterios incluyen la secuenciación parcial o completa de Edman, la identificación clara por espectrometría de masas, la estructura de rayos X o RMN, la interacción proteína-proteína de buena calidad o la detección de la proteína por anticuerpos.

El valor 'Evidencia experimental a nivel de transcripción' indica que la existencia de una proteína no se ha probado estrictamente, pero que los datos de expresión (como la existencia de cDNA (s), RT-PCR o transferencias Northern) indican la existencia de su transcripción.

El valor 'Proteína inferida por homología' indica que la existencia de una proteína es probable porque existen ortólogos claros en especies estrechamente relacionadas.

El valor 'Proteína predicha' se usa para entradas sin evidencia en niveles de proteína, transcripción u homología.

El valor 'Proteína incierta' indica que la existencia de la proteína no es segura.

9.14.1 Proteínas identificadas por espectrometría de masas de los granos de maíz controles (sin inocular).

Las muestras enviadas al análisis de identificación corresponden a los granos de maíz blanco, ya que el estudio se realizó en este maíz para evitar la posible interferencia de las antocianinas en la cepa no toxigénica, como bien nos indica el análisis previo de la actividad enzimática de ambas cepas en los tres diferentes granos de maíz. Cabe aclarar que las bandas enviadas de proteínas del maíz blanco coinciden con las bandas de los controles de maíz rojo y morado, como se muestra en el gel de la Figura 54.

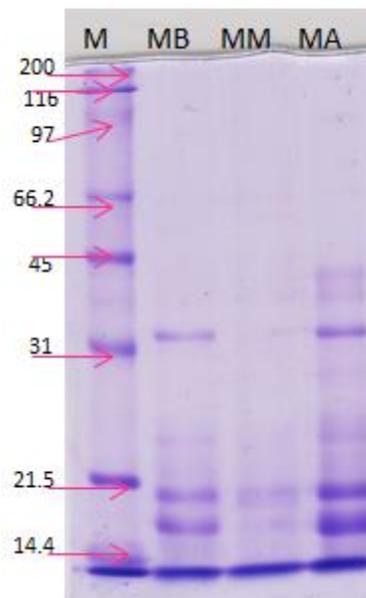


Figura 54. Gel de electroforesis de los granos control en donde se muestran las bandas compartidas por los tres diferentes tipos de maíz. (M=Marcador de Peso Molecular, MB=maíz blanco, MM=maíz rojo, MA=maíz morado).

Las proteínas identificadas en los granos de maíz blanco sin inocular, corresponden a dos globulinas y a una proteína sin caracterizar (Ver Tabla 1 del Anexo 2), los granos control fueron tratados previamente de la misma forma que los granos inoculados con el hongo e incubados por 10 días.

Según se indica en la base UniProtKB, se identificó una globulina-1 con evidencia experimental a nivel de transcripción y una globulina-2 (proteína predicha). En el caso de la proteína no caracterizada la base de datos UniProtKB indica que tiene actividad de triosa fosfato isomerasa, una enzima de la ruta de la glucólisis, con evidencia experimental a nivel de transcripción. Con este análisis podemos asegurar que estas proteínas están presentes en los granos de maíz a los 10 días de incubación en las condiciones que manejamos el ensayo.

9.14.2 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

La totalidad de las proteínas identificadas son de los granos de maíz blanco, debido a que el crecimiento del hongo es escaso para secretar una cantidad de proteínas suficiente para poder identificarlas por el método de espectrometría acoplada a masas. Las proteínas se agruparon como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Grupos de proteínas identificadas en *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Grupo de proteínas identificadas | Numero de proteínas identificadas | Numero de Tabla del Anexo 2 |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Proteínas no caracterizadas | 9 | Tabla 2 |
| Quitinasas | 7 | Tabla 3 |
| Proteínas defensivas de los granos de maíz | 5 | Tabla 4 |
| Proteínas estructurales del grano de maíz | 2 | Tabla 5 |
| Proteínas identificadas que participan en diferentes procesos metabólicos | 18 | Tabla 6 |
| Proteínas transportadoras de lípidos y lipoproteínas | 2 | Tabla 7 |
| Proteasas | 2 | Tabla 8 |
| Oxido-reductasas | 6 | Tabla 9 |
| Proteínas de respuesta al estrés | 3 | Tabla 10 |
| Proteínas de membrana y extracelulares | 3 | Tabla 11 |
| Proteínas involucradas en la síntesis de proteínas | 2 | Tabla 12 |

Las proteínas que son similares a una proteína caracterizada, pero no hay datos experimentales de validación de su función, se les nombra como “proteínas putativas”. Las proteínas que se expresan y que no se han conservado o su función no es conocida o predecible se nombran como “proteínas no caracterizadas”, de las cuales se identificaron 9 proteínas y se indican en la Tabla 2 del Anexo 2.

Adicionalmente se identificaron 7 diferentes quitinasas (Ver Tabla 3 del Anexo 2) que probablemente son producidas como mecanismo de respuesta del grano de maíz ante la infección de *Aspergillus flavus*, ya que las quitinasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β (1-4) de la N-acetil-D-glucosamina en los polímeros de quitina y quitodextrinas, compuestos

que constituyen la pared celular del hongo, como se indica en el apartado de función de las enzimas en la base de datos UniprotKB.

Se identificaron 5 diferentes proteínas caracterizadas como defensa del grano de maíz (Ver Tabla 4 del Anexo 2) y dentro de las proteínas estructurales del grano de maíz se identificó la globulina-2, misma proteína identificada en los granos de maíz controles y una proteína específica del endospermo, de la cual aún no se conoce su función (Ver Tabla 5 del Anexo 2).

El grano de maíz tiene diferentes enzimas que le ayudan al proceso de germinación y defensa, por lo que se identifican 18 enzimas propias del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Ver Tabla 6 del Anexo 2).

Se identificaron 2 proteínas transportadoras de lípidos y lipoproteínas que conforman la membrana de las células del grano de maíz, Ver Tabla 7 del Anexo 2, (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q2XX18>).

Dos proteasas se identificaron en los granos inoculados las cuales se indican en la Tabla 8 del Anexo 2. La base de datos UniprotKB indica que la proteína B6THH6 es una carboxipeptidasa y el proteasoma es un complejo de proteinasas multicatalítico que se caracteriza por la capacidad para escindir péptidos Arg, Phe, Tyr, Leu y Glu adyacentes al grupo saliente a pH neutro o ligeramente básico.

También se identificaron 6 enzimas oxido-reductasas, las cuales se indican en la Tabla 9 del Anexo 2 y su función descrita en la base de datos UniprotKB, dentro de las cuales se identificó a la betaína aldehído deshidrogenasa, oxidoreductasa dependiente NADP+ /NAD+, una proteína de estrés general que es una oxido-reductasa que interviene en procesos metabólicos. Debido a los procesos metabólicos de germinación y defensa se generan radicales libres, razón por la cual identificamos dos superóxidos dismutasas.

Se identificaron tres proteínas de respuesta al estrés (Ver Tabla 10 del Anexo 2) y su función descrita en la base de datos UniprotKB. Estas proteínas están implicadas en la respuesta al estrés, un cambio de estado o la actividad de una célula o un organismo (en términos de movimiento, la secreción, la producción de enzimas, la expresión genética, etc.) como consecuencia de algunas condiciones estresantes. El estrés es usualmente, pero no necesariamente exógeno (temperatura, humedad, radiación, hipertonicidad). Lo cual es de

esperarse si consideramos que el grano fue sometido a calor y daño mecánico por la punción en el embrión previo a la inoculación. El inhibidor de la proteasa es una enzima que se produce como respuesta al daño mecánico del grano.

Se identificaron tres proteínas de membrana y extracelulares del grano de maíz (Ver Tabla 11 del Anexo 2). La proteína “*Fasciclin-like arabinogalactan*” está involucrada en la adhesión celular y en algunas plantas en la respuesta al estrés abiótico.

También se identificó una ribonucleasa y un complejo naciente de proteínas de la subunidad alfa como polipéptido asociado, lo cual puede significar que las células están activamente sintetizando proteínas, ver Tabla 12 del Anexo 2.

9.14.3 Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 5 días de incubación.

La totalidad de las proteínas identificadas son de los granos de maíz blanco, debido a que el crecimiento del hongo aun es escaso para secretar una cantidad de proteínas suficiente para poder identificarlas por el método de espectrometría acoplada a masas. Las proteínas se agruparon de la siguiente forma:

Tabla 6. Grupos de proteínas identificadas en *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 5 días de incubación.

| Grupo de proteínas identificadas | Numero de proteínas identificadas | Numero de Tabla del Anexo 2 |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| Proteínas no caracterizadas | 3 | Tabla 13 |
| Proteínas defensivas de los granos de maíz | 3 | Tabla 14 |
| Proteínas estructurales del grano de maíz | 1 | Tabla 15 |
| Proteínas identificadas que participan en diferentes procesos metabólicos | 7 | Tabla 16 |
| Otras proteínas identificadas | 4 | Tabla 17 |

Se identificaron 3 proteínas no caracterizadas y comparado con los 3 días de incubación la cantidad es 3 veces menor, y no son las mismas identificadas en los granos de maíz incubados

por 3 días, probablemente debido que el proceso de defensa del grano cambia considerablemente en 2 días por la invasión del hongo (Ver Tabla 13 del Anexo 2).

Las proteínas de defensa del grano, ver Tabla 14 del Anexo 2, también disminuyen considerablemente, lo anterior nos da una idea del proceso de invasión de *A. flavus* al grano, si observamos que a los 5 días de infección, el grano ya comienza a estar invadido por el hongo podemos inferir que el mecanismo de respuesta del grano se da con mayor intensidad en los primeros 3 días de infección y que los mecanismos de defensa del grano fueron rebasados por los mecanismos de infección de *Aspergillus flavus*. La quitinasa identificada es diferente a las identificadas en los granos incubados por 3 días, la endoquitinasa y la β -1,3-glucanasa son las mismas que se identificaron en los granos incubados por 3 días. La globulina-2 identificada es una proteína que ayudan a la movilización de los lípidos en almacenamiento en el proceso de germinación y se identifica en los granos control ver la Tabla 15 del Anexo 2.

Se identificaron solo 7 enzimas metabólicas del grano de maíz (ver Tabla 16 del Anexo 2), menos enzimas que en los granos de 3 días de incubación inoculados, lo que nos indica una reducción en los procesos metabólicos del grano de maíz. Se identifica una proteasa y una proteína transportadora de lípidos que también encontramos en las muestras de 3 días. También se identifica una proteína de unión a cobre y una de reserva de nutrientes (Tabla 17 del Anexo 2).

9.14.4 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

Todas las proteínas identificadas en los extractos de maíz infectado corresponden a *Aspergillus flavus* NRRL 6541 a los 7 días de incubación, no se identificó ninguna enzima que corresponda al grano de maíz.

Se presenta la probabilidad de pertenecer al secretoma, de acuerdo los criterios en la base de datos FunSecKB (<http://proteomics.ysu.edu/secretomes/fungi.php>) y se agruparon como se indica en la Tabla 7, la función de las proteínas identificadas que a continuación se describen son las que se indican en la base de datos UniprotKB:

Tabla 7. Grupos de proteínas identificadas en *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Grupo de proteínas identificadas | Numero de proteínas identificadas | Numero de Tabla del Anexo 2 |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Amilasas | 2 | Tabla 18 |
| Proteasas | 3 | Tabla 19 |
| Xilanasas | 2 | Tabla 20 |
| Enzimas accesorias | 2 | Tabla 21 |
| Celulasas | 3 | Tabla 22 |
| Pectinasas | 1 | Tabla 23 |
| Peptido hidrolasas | 1 | Tabla 24 |
| Otras proteínas | 3 | Tabla 25 |
| Proteinas no caracterizadas | 3 | Tabla 26 |

Se identificaron 2 tipos de amilasas (ver Tabla 18 del Anexo 2), una α -amilasa que han sido ampliamente caracterizada y que se le relaciona con la producción de aflatoxinas, indispensable para la obtención de glucosa a partir del almidón, el cual abunda en el grano de maíz (Fakhoury y Woloshuk., 1999). También se identificó una glucoamilasa putativa, la identificación de esta enzima es de gran importancia porque ahora sabemos que esta enzima es expresada por esta cepa en particular y en las condiciones que utilizamos para el crecimiento del hongo, ambas amilasas con 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma de *Aspergillus flavus*.

Se identificaron 3 proteasas en las que la probabilidad de pertenecer al secretoma es del 100% (ver Tabla 19 del Anexo 2), dichas enzimas son importantes para el proceso de invasión del hongo, la proteasa alcalina (ALP o aspergilopeptidasa B) permite la asimilación de sustratos proteicos. La proteasa neutra es una metaloproteinasa que utiliza como cofactor el Zn^{2+} , es secretada para permitir la asimilación de sustratos proteicos. Muestra alta actividad sobre sustratos nucleares básicos como histonas y protamina. Es inferida por homología con otras especies, según se indica en la base de datos UniProtKB.

La proteína extracelular metaloproteinasa también es considerada factor de virulencia en la aspergilosis y también necesita Zn^{2+} como cofactor y es una enzima secretada en sustratos con alto contenido de proteínas, es inferida por homología con otras especies relacionadas.

Con la identificación de las amilasas y las proteasas podemos inferir que el hongo las secreta debido a que en este periodo se encuentra invadiendo el endospermo el grano de maíz.

Como el xilano es un compuesto que se encuentra en el pericarpio del grano de maíz, *A. flavus* secreta xilanasas para poder utilizar este compuesto como fuente de carbono, lo cual explica que se identificaran 2 xilanasas a los 7 días de incubación. Las cuales son: una α -xilosidasa putativa, es decir que por homología se infiere su actividad pero es necesario caracterizarla para comprobar su actividad y una probable endo-1,4- β xilanasas B de la cual ahora tenemos evidencia de que esta enzima se expresa en esta cepa a los 7 días de incubación para degradar el xilano que contiene el grano de maíz (ver Tabla 20 del Anexo 2).

Se identificaron 2 enzimas accesorias (ver Tabla 21 del Anexo 2), la α -L-arabinofuranosidasa también es putativa y cataliza la hidrólisis de los residuos no reductores de α -L-arabinofurano en α -L-arabinosidos, dichas estructuras se encuentran en el xilano y es denominada como enzima accesoria, al igual que la glicosil-hidrolasa que cataliza la hidrólisis de cualquier O-glicosil.

La conversión biológica de celulosa a glucosa requiere por lo general tres tipos de enzimas hidrolíticas: (1) Las endoglucanasas que cortan la parte interna β - 1,4 -glucosídicos; (2) exocelobiohidrolasas que corta el disacárido celobiosa en el extremo no reductor de la cadena polimérica de celulosa; (3) Los β - 1,4- glucosidasas que hidrolizan la celobiosa y otros celo - oligosacáridos cortos en glucosa. Lo anterior explica que se identificaron dos endoglucanasas putativas o predichas de las cuales no se tiene evidencia suficiente de su existencia, según se indica en la base de datos UniprotKB. La enzima 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa A, es una exocelobiohidrolasa inferida por homología (ver Tabla 22 Del Anexo 2). La probabilidad de pertenecer al secretoma de *Aspergillus flavus* de estas enzimas es del 100% (FunSecKB), lo anterior nos da una idea de que *Aspergillus flavus* secreta celulasas y xilanasas con la finalidad de degradar el pericarpio del grano de maíz.

Las enzimas pectinolíticas consisten en cuatro clases: pectina liasa, poligalacturonasa, pectina metilesterasa y ramnogalacturonasa. Entre las enzimas pectinolíticas, la pectina liasa es la más importante en la despolimerización de pectina, ya que escinde los enlaces glucosídicos internos de pectinas altamente metiladas. Se identificó una pectato liasa con un peso molecular de 34 kDa que el hongo produce para escindir la cadena de pectina que se encuentra en la estructura de la pared celular del grano de maíz, esta enzima necesita Ca^{2+} como cofactor para

su actividad y es denominada como probable porque es inferida por homología es decir que existen en especies estrechamente relacionadas, Ver Tabla 23 del anexo 2 (<https://www.uniprot.org/uniprot/B8NE46>).

Estas enzimas hidrolíticas identificadas nos dan evidencia de que la cepa de *Aspergillus flavus* comienza a degradar el pericarpio del grano de maíz.

También se identificó una péptido hidrolasa que se relaciona con el metabolismo de lípidos, según indica el apartado de función de esta enzima en la base de datos UniprotKB (ver Tabla 24 del Anexo 2).

Cualquier proceso que resulta en un cambio de estado o la actividad de una célula o un organismo (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión génica, etc.) da como resultado estrés oxidativo o debido a la exposición de niveles altos de especies de oxígeno reactivas como por ejemplo, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y los radicales hidroxilo, es por eso que se identifica una catalasa micelial que responde a ese estado de estrés oxidante. Se identificó una monoamino-oxidasa es una enzima que participa en los procesos metabólicos de compuestos aromáticos, es una proteína predicha de la que no se tiene evidencia a niveles de proteínas, transcripción o de homología (Ver Tabla 25 del Anexo 2).

Se identifican 3 proteínas no caracterizadas de las cuales no se conoce su función (ver Tabla 26 del Anexo 2).

9.14.5 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

Se presenta un resumen de las proteínas identificadas en los extractos enzimáticos obtenidos de los granos de maíz después de 10 días de incubación, las cuales pertenecen a *Aspergillus flavus*.

También se presenta la probabilidad para las proteínas identificadas de pertenecer al secretoma, de acuerdo los criterios en la base de datos (<http://proteomics.ysu.edu/secretomes/fungi.php>) y se agruparon como se indica en la Tabla 8, la función de las proteínas identificadas que a continuación se describen son las que se indican en la base de datos UniprotKB:

Tabla 8. Grupos de proteínas identificadas en *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Grupo de proteínas identificadas | Numero de proteínas identificadas | Numero de Tabla del Anexo 2 |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| Amilasas | 4 | Tabla 27 |
| Proteasas | 12 | Tabla 28 |
| Xilanasas | 6 | Tabla 29 |
| Enzimas accesorias | 4 | Tabla 30 |
| Celulasas | 5 | Tabla 31 |
| Pectinasas | 3 | Tabla 32 |
| Lipasas | 2 | Tabla 33 |
| Fosfatasas | 4 | Tabla 34 |
| Proteínas de metabolismo y otras | 15 | Tabla 35 |
| Proteínas no caracterizadas | 13 | Tabla 36 |

Se identificaron cuatro amilasas (Ver Tabla 27 del Anexo 2) en las muestras incubadas a los 10 días, de las cuales dos también se producen desde los 7 días (B8N482 - Glucoamilasa y Q7LV45 - α -amilasa). La enzima glucoamilasa B8NX52 y α -amilasa B8N0S9 ambas identificadas por homología a los 10 días de crecimiento del hongo ahora existe evidencia de que se expresan estas amilasas para poder degradar el componente principal del grano de maíz y con 100 % de probabilidad de pertenecer al secretoma.

Se identificaron 12 proteasas (Ver Tabla 28 del Anexo 2). A los 10 días ya no se identifican los factores de virulencia de la infección de aspergilosis, las metaloproteinasas, lo anterior debido a que el sustrato no es un tejido con alto contenido de proteínas, como la elastasa, y se sintetizan otro tipo de proteasas como la serin-carboxipeptidasa que corta proteínas en los residuos que tienen serina. En la base de datos del secretoma por su secuencia es muy probable que sea una enzima extracelular.

Se identificó una serin-proteasa autofágica que es posible se encuentre en algunas vacuolas que contienen proteasas con la finalidad de reciclar las proteínas endógenas. Se identificaron diferentes proteasas que por homología inferida son extracelulares con la finalidad de degradar las proteínas estructurales del grano para tener disponibles los aminoácidos que son fuente de nitrógeno tal es el caso de la endopeptidasa Pep 2, la di- y tripeptidilpeptidasa, una serin carboxipeptidasa putativa y una carboxipeptidasa.

La evidencia muestra que la secreción de proteasas y amilasas aumenta con respecto a los 5 días de incubación, lo anterior nos indica que el hongo secreta grandes cantidades de estas enzimas para continuar disponiendo del almidón del endospermo como principal fuente de carbono y energía para su crecimiento.

Se identificaron 6 enzimas con características de xilanasas, ver Tabla 29 del Anexo 2, solo una de las cuales también se identificó en la muestra de 7 días (B8NJ86- Probable endo-1,4- β -xilanasa B).

Según la base de datos UniprotKB la probable enzima endo-1,4- β -xilanasa F3 solo hay evidencia a nivel de transcripción y con los resultados obtenidos en nuestro ensayo podemos asegurar y tenemos evidencia de que la enzima si se expresa en esta cepa en las condiciones de crecimiento del presente estudio. Se identificó una β -xilanasa que hasta el momento está catalogada como putativa por homología que en la base del secretoma es muy probable que sea secretada al igual que la Xilanasa F1. La enzima Xiloglucanasa A cataliza endohidrólisis de enlaces 1,4 - β - D- glucosídicos en xiloglucano con retención de la configuración β de los residuos glicosilo, específica de xiloglucano y no hidroliza otros componentes de la pared celular, en la base de datos esta inferida por homología ahora sabemos que también la cepa *A. flavus* NRRL 6541 la produce en estas condiciones de crecimiento. La enzima acetilxilanoesterasa A, también es inferida por homología, ahora tenemos evidencia de que la proteína se expresa y tiene actividad de acetilación del xilano y xilo-oligosacaridos. Todas las xilanasas identificadas son secretadas según su homología en la secuencia de sus aminoácidos.

Se identificaron 4 enzimas denominadas accesorias en donde solo la L- arabinosidasa es la misma identificada a los 7 días (Ver Tabla 30 del Anexo 2). Se identificó una arabinosidasa putativa de la que no se tiene evidencia que se expresara en esta cepa, una feruloil esterasa y una beta galactosidasa A, las cuales se identificaron por homología ahora tenemos evidencia de que se expresa en esta cepa. Todas ellas tienen una alta probabilidad de ser secretadas y ser parte del secretoma de *A. flavus*.

Para la hidrólisis de la celulosa a los 10 días se secretan 5 enzimas para dicha función (Ver Tabla 31 del Anexo 2). La celobiohidrolasa D y la endoglucanasa putativa (B8N9Q1) son las mismas que se identificaron en las muestras de 7 días, sin embargo se producen otras tres

como una endoglucanasa putativa inferida por homología, una probable endoglucanasa B inferida también por homología y una celobiohidrolasa putativa que en la base de datos Uniprot KB está identificada como una glucanasa por homología. Todas ellas tienen una alta probabilidad de ser secretadas y ser parte del secretoma de *A. flavus*.

La pectato liasa A también se identificó a los 7 días después de 3 días se han producido otras dos enzimas con actividad para degradar la pectina como la pectin liasa la cual escinde por eliminación de (1- > 4) metil éster α -D- galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4 - desoxi - 6 -O -metil - α - D- galact - 4 - enuronosil en sus extremos no reductores.

La enzima ramnoglacturonato liasa escinde los residuos del ácido L- α -ramnopiranosil- (1-> 4)- α - D- galactopiranosiluronico del ramnoglacturonano en las regiones I peludas de la pectina ramificadas que salen del extremo L- ramnopiranososa y 4 - deoxi -4,5-insaturado D- galactopiranosiluronico en el extremo no reductor (Ver Tabla 32 del Anexo 2).

La evidencia de una mayor producción de celulasas, xilanasas, enzimas accesorias y pectinasas, indican que son secretadas con la finalidad de invadir y degradar el pericarpio del grano y extender la infección del hongo a toda la superficie de este para disponer de fuentes de nutrientes.

A los 10 días se producen dos lipasas de las cuales la lipasa extracelular inicia su producción antes pues se identificó a los 7 días, la lipasa secretada es putativa no se había comprobado su existencia como proteína (Ver Tabla 33 del Anexo 2).

Se identificaron 4 fosfatasa que participan en diversos procesos (Ver Tabla 34 del Anexo 2). La fitasa es una enzima que cataliza la reacción del monoéster ortofosfórico + H₂O = un alcohol + fosfato, con un pH ácido óptimo; el hongo secreta esta enzima para tener acceso al fosforo que contiene el grano de maíz, hasta el momento esta enzima tiene la categoría de proteína putativa. Se identificó una endonucleasa y una fosfatasa acida putativa.

Debido al abundante crecimiento de *A. flavus* NRRL 6541 a los 10 días de incubación se identificaron bastantes proteínas con diferentes funciones dando una idea del metabolismo del hongo (Ver Tabla 35 del Anexo 2).

La β -hexosaminidasa que cataliza la hidrólisis de los residuos terminales no reductores de N-acetil-D-acetil- β -D-hexosaminidos.

Una proteína fitotóxica (cerato - platanin) de aproximadamente 12,4 kDa se ha identificado en filtrados de cultivo de *Ceratocystis fimbriata f. sp. platani*, el agente causal de la enfermedad de la mancha cancro, se acumula en el micelio y se encuentra en las paredes celulares de este hongo, ascosporas, hifas y conidios lo que sugiere que esta proteína tiene un papel en la formación de la pared celular fúngica, aparte del hecho ya conocido de que se secreta a inicios del cultivo y provoca la síntesis de fitoalexinas y/o muerte celular de la planta (Boddi, *et al.*, 2004). Probablemente esta proteína tenga la misma función en las cepas de *Aspergillus flavus* en la infección del grano de maíz, en UniprotKB se encuentra como evidencia inferida por homología.

El antígeno MP1 tiene evidencia experimental a nivel de transcripción en *A. flavus*, esta proteína se utiliza para el diagnóstico de aspergilosis causado por *Aspergillus fumigatus*

La enzima Rieske 2Fe-2S es una oxidoreductasa que participa en el catabolismo de compuestos aromáticos, cataliza el primer paso de la síntesis de betaína glicina osmoprotectora, según se indica en la base de datos UniprotKB.

La proteína B8NC16 (Actin-bundling protein Sac6) se une a la actina, y de ese modo puede modular las propiedades y/o funciones de los filamentos de actina.

La α -1,2-manosidasa es una enzima inferida por homología que participa en la glicosilación de proteínas (la adición de sacáridos a proteínas) es una de las principales etapas de modificación post- traducción en la síntesis de la membrana y las proteínas secretadas. Involucrada en la maduración de las proteínas con oligosacaridos de manosa unidos a Asn ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ para producir $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$).

Se identificaron enzimas pertenecientes al metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidratos como la glutaminasa, la fosfatidilserina descarboxilasa, una aldehído reductasa y FAD oxidoreductasa.

La familia ECM33 / SPS2 de las proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la pared celular de los hongos y la

virulencia, sin embargo, el papel preciso de estas proteínas es desconocido (Romano J., *et al* 2006).

Una proteína predicha en el mecanismo de infección de los virus, pero su función no es clara, la proteína SspA de unión a DNA y una esterasa de la que se tiene muy poca evidencia de su existencia.

Se identificaron 13 proteínas no caracterizadas dos de las cuales también se identificaron en los granos incubados a los 7 días (B8NDD7 y B8NJZ8), no se conoce la función de dichas proteínas ni por homología, pero al comparar su secuencia en la base de datos del secretoma de *Aspergillus flavus* algunas por sus características pueden ser secretadas por lo que es importante investigar a fondo estas proteínas para poder caracterizarlas (Ver Tabla 36 del Anexo 2).

9.14.6 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

En los primeros 3 días de incubación de los granos inoculados con la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 pudimos identificar en su mayoría proteínas pertenecientes a los granos de maíz, al igual que en el ensayo de la cepa no toxigénica, las cuales se agruparon como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Grupos de proteínas identificadas en *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Grupo de proteínas identificadas | Numero de proteínas identificadas | Numero de Tabla del Anexo 2 |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| Proteínas no caracterizadas | 7 | Tabla 37 |
| Quitinasas | 8 | Tabla 38 |
| Proteínas defensivas de los granos de maíz | 1 | Tabla 39 |
| Proteínas transportadoras de lípidos | 2 | Tabla 40 |
| Proteínas de respuesta al estrés | 4 | Tabla 41 |
| Proteínas identificadas que participan en diferentes procesos metabólicos | 15 | Tabla 42 |
| Proteínas de <i>Aspergillus flavus</i> | 2 | Tabla 43 |

Se identificaron 7 proteínas no caracterizadas pertenecientes al grano de maíz todas con evidencia experimental a nivel de transcripción, por lo que podemos inferir que en el presente estudio se da evidencia de que estas proteínas se expresan (Ver Tabla 37 del Anexo 2).

Se identificaron 8 quitinasas del grano de maíz (Ver Tabla 38 del Anexo 2), en la base de datos UniprotKB el maíz tiene 202 genes que codifican para posibles enzimas con esta actividad.

Se identificó una enzima de resistencia del grano de maíz en respuesta a la infección por el hongo filamentoso (Ver Tabla 39 del Anexo 2).

El grano de maíz en ambos ensayos expresa la proteína (Q2XX18) transportadora de lípidos (Tabla 40 del Anexo 2). Igual que en el ensayo de la cepa no toxigénica, se identificaron proteínas de respuesta ante el daño mecánico y de respuesta al estrés térmico al que también fueron sometidos los granos de maíz previamente a su inoculación, estas proteínas tienen evidencia a nivel de homología y a nivel transcripcional (Ver Tabla 41 del Anexo 2). Son 15 proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos del grano de maíz que se lograron identificar (Ver Tabla 42 del Anexo 2).

En este periodo de incubación se identificó una proteína perteneciente a *Aspergillus flavus*, una enzima aspergiloepsina, proteasa que por su secuencia de aminoácidos es secretada e hidroliza sustratos como la elastina y el colágeno. Esta proteasa no fue identificada en la cepa no toxigénica en ninguna de las muestras (Ver Tabla 43 del Anexo 2).

9.14.7 Proteínas identificadas por espectrometría acoplada a masas de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

Todas las proteínas identificadas en este periodo de incubación pertenecen a *Aspergillus flavus* y se agruparon como se indica en la Tabla 10, la función de las proteínas identificadas que a continuación se describen son las que se indican en la base de datos UniprotKB:

Tabla 10. Grupos de proteínas identificadas en *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Grupo de proteínas identificadas | Numero de proteínas identificadas | Numero de Tabla del Anexo 2 |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Amilasas | 2 | Tabla 44 |
| Proteasas | 8 | Tabla 45 |
| Xilanasas | 2 | Tabla 46 |
| Enzimas accesorias | 3 | Tabla 47 |
| Celulasas | 3 | Tabla 48 |
| Pectinasas | 1 | Tabla 49 |
| Otras proteínas | 6 | Tabla 50 |
| Proteínas no caracterizadas | 4 | Tabla 51 |

Se identificaron dos amilasas en la muestra de los 7 días de incubación, ver Tabla 44 del Anexo 2, ambas con 100 % de probabilidad de pertenecer al secretoma.

Se identificaron 8 proteasas por la cepa toxigénica a los 7 días de incubación, 6 de las cuales tienen 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma de *Aspergillus flavus* (Ver Tabla 45 del Anexo 2).

Se identificó una aspartilaminopeptidasa que utiliza como cofactor el Zn^{2+} es inferida por homología, una carboxipeptidasa, una alcalinproteasa 1 de la cual se tiene evidencia experimental a nivel de proteína y está bien caracterizada en *A. flavus* considerada como alérgeno en los humanos.

Una aspartilendopeptidasa inferida por homología, una proteasa neutral metaloproteinasa que utiliza como cofactor el Zn^{2+} secretada y una aspergillopepsina A que hidroliza elastina y colágeno.

Como bien lo indican las actividades enzimáticas de los granos de maíz, los extractos mostraron actividad xilanólica y se identificaron dos xilanasas con 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma, Ver Tabla 46 del Anexo 2.

Se identificó una β -xilanasas cuya secuencia no concuerda con ninguna del genoma de *Aspergillus flavus* se encuentra mayor concordancia con una especie muy relacionada *A. oryzae* es ideal que analizar y caracterizar esta proteína. Dentro de las enzimas accesorias tenemos una arabinasa y una arabinosidasa putativa que eliminan arabinosa en las cadenas de xilano, ver Tabla 47 del Anexo 2.

Se identificaron 3 enzimas con actividad celulolítica, con 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma, ver Tabla 48 del Anexo 2 y una probable pectin-liasa D secretada (Tabla 40 del Anexo 2).

También se identificaron 7 enzimas con diferentes actividades a las que se cuantificaron previamente en los extractos, mismas que forman parte del metabolismo de *Aspergillus flavus*, ya que aunque se trató de eliminar el micelio de los granos de maíz inoculados fue difícil y es muy probable que el extracto llevara enzimas metabólicas del hongo no necesariamente secretadas. Se identificaron varias glicosilhidrolasas, enzimas que degradan el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias, el alérgeno cerato-platanin y una catalasa micelial que también fue identificada en la cepa no toxigénica ver Tabla 50 del Anexo 2.

Se identificaron 4 proteínas no caracterizadas a comparación de dos de la cepa no toxigénica (Tabla 51 del Anexo 2).

9.14.8 Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación.

Todas las proteínas identificadas pertenecen a *Aspergillus flavus* CECT 2687 y ninguna proteína identificada del grano de maíz, las cuales se agruparon como se indica en la Tabla 11, la función de las proteínas identificadas que a continuación se describen son las que se indican en la base de datos UniprotKB:

Tabla 11. Grupos de proteínas identificadas en *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación.

| Grupo de proteínas identificadas | Numero de proteínas identificadas | Numero de Tabla del Anexo 2 |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Amilasas | 2 | Tabla 52 |
| Proteasas | 6 | Tabla 53 |
| Xilanasas | 1 | Tabla 54 |
| Enzimas accesorias | 5 | Tabla 55 |
| Celulasas | 2 | Tabla 56 |
| Otras proteínas | 7 | Tabla 57 |
| Proteínas no caracterizadas | 5 | Tabla 58 |

Las amilasas secretadas a los 10 días son las mismas que a los 7 días, la cepa no toxigénica secreta dos amilasa más, probablemente esto explique porque el crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 sea más abundante. La identificación de estas enzimas es de gran importancia porque se ha demostrado su relación con la producción de aflatoxinas, ahora tenemos evidencia de la expresión de estas dos enzimas en un sistema muy parecido a las condiciones reales cuando el hongo infecta el grano de maíz, ya que el genoma de *Aspergillus flavus* refiere la existencia de 8 probables α -amilasas y dos probables glucoamilasas, ver Tabla 52 del Anexo 2.

Se identifican 6 proteasas, tres de las cuales tienen 100% de probabilidad de ser secretadas, dos son las mismas que se identificaron a los 7 días de incubación (alcalin proteasa 1 y endopeptidasa aspártica), ver Tabla 53 del Anexo 2.

La cepa toxigénica secreta una β -xilanasas inferida por homología con 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma, en el genoma de *Aspergillus flavus* se tienen dos probables beta-xilanasas, ver Tabla 54 del Anexo 2

Se identificaron 4 enzimas accesorias con 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma (Tabla 55 del Anexo 2) como la Endo-1,5- α -L-arabinonasa C que por homología ayuda en la degradación de la pectina y xilano. Una arabinan-endo 1,5 α -L-arabinasa inferida por similitud con otras enzimas expresadas en especies relacionadas, pero no se especifica su probable función. Un precursor de lactasa A y una feruloil-esterasa C que ayuda en la degradación del xilano

Para la degradación de celulosa la cepa toxigénica secreta a los 10 días de incubación 2 enzimas con actividad celulolítica y alta probabilidad de pertenecer al secretoma (Tabla 56 del Anexo 2), una probable 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa que también se identificó a los 7 días. Una β -glucosidasa inferida por homología que es secretada para hidrolizar los extremos no reductores de los residuos β -D-glucosilos en β -D-Glucosa, según la evidencia encontrada es 100% probable que ambas sean secretadas.

Al igual que la cepa no toxigénica se identificaron proteínas propias del metabolismo del hongo que no necesariamente pertenecen al secretoma, ver Tabla 57 del anexo 2, tales como β -1,3-endoglucanasa anclada a GPI, de la que se ha caracterizado una enzima muy similar en *Aspergillus fumigatus* y es expresada porque la quitina y el β -1,3-glucano son los responsables de la rigidez de la pared celular del hongo, cuando hay cambios morfológicos durante la germinación y el crecimiento de los filamentos, las células necesitan una lisis parcial de estos compuestos para darle un poco de plasticidad a la pared celular (Hartl L., *et al.*, 2011).

También la proteína taumatina extracelular que se ha caracterizado en *Aspergillus fumigatus* en donde se le atribuye la función de adhesina y factor importante en el inicio del proceso de patogénesis en los humanos (Upadhyay., *et al.*, 2009)

Se identificaron dos oxidoreductasas, la superoxidodismutasa es para combatir el estrés oxidativo al que se someten las células del hongo y dos glucosidasas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, pero no se conoce su función en específico.

Se identifican 5 proteínas no caracterizadas a los 10 días de incubación ver Tabla 58 del Anexo 2. La cepa no toxigénica sintetiza una mayor cantidad de proteínas sin caracterizar, también relacionado con su mayor crecimiento y comparte 3 de estas proteínas con la cepa toxigénica.

9.15 Análisis comparativo del secretoma de las cepas *Aspergillus flavus* CECT 2687 y *Aspergillus flavus* NRRL 6541.

Se realiza el análisis comparativo de las enzimas secretadas de las cepas de *Aspergillus flavus* toxigénica y no toxigénica a los 3, 7 y 10 días de incubación. Se comparan las enzimas con 100% de probabilidad de pertenecer al secretoma, las cuales se agrupan en amilasas, proteasas, xilanasas, enzimas accesorias, celulasas y pectinasas. Ver tabla 12.

Tabla 12. Análisis comparativo del secretoma de las cepas de *Aspergillus flavus* CECT 2687 y *Aspergillus flavus* NRRL 6541 a los 3, 7 y 10 días de incubación en maíz blanco.

| | <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 | | <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 | | |
|--------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| | 7 días de incubación | 10 días de incubación | 3 días de incubación | 7 días de incubación | 10 días de incubación |
| Amilasas | Glucoamilase, putative (B8N482) | Glucoamilase, putative (B8N482) | | Glucoamilase, putative (B8N482) | Glucoamilase, putative (B8N482) |
| | | Alpha-amylase (B8N0S9) | | Alpha-amylase (B8N0S9) | Alpha-amylase (B8N0S9) |
| | Alpha-amylase(Q7LV45) | Alpha-amylase(Q7LV45) | | | |
| | | Glucoamilase (B8NX52) | | | |
| Proteasas | Alkaline protease 1 (B8N106) | Alkaline protease 1 (B8N106) | | Alkaline protease 1 (B8N106) | Alkaline protease 1 (B8N106) |
| | | Carboxypeptidase (B8NUL2) | | Carboxypeptidase (B8NUL2) | |
| | | Aspartic endopeptidase Pep2 (B8N3P1) | | Aspartic endopeptidase Pep2 (B8N3P1) | Aspartic endopeptidase Pep2 (B8N3P1) |
| | | Tripeptidyl peptidase A (B8NPM2) | | | Tripeptidyl peptidase A (B8NPM2) |
| | | Autophagic serine protease Alp2 (B8NUE0) | | Autophagic serine protease Alp2 (B8NUE0) | |
| | | | Aspergillopepsin-1 (B8NLY9) | Aspergillopepsin-1 (B8NLY9) | |
| | Extracellular metalloproteinase (B8NC58) | | | | |
| | | | | Carboxypeptidase Y homolog A (B8NXS9) | |
| | | Probable dipeptidyl-peptidase (B8NBM3) | | | |
| | | Extracellular serine carboxypeptidase, putative (B8NQR5) | | | |
| | Carboxypeptidase (B8NWI1) | | | | |
| Xilanasas | Probable endo-1,4-beta-xylanase (B8NJ86) | Probable endo-1,4-beta-xylanase B (B8NJ86) | | | |
| | | Probable endo-1,4-beta-xylanase F1 (B8NER4) | | Probable endo-1,4-beta-xylanase F1 (B8NER4) | |
| | | Beta-xylanase (B8NIB9) | | | Beta-xylanase (B8NIB9) |
| | | Probable endo-1,4-beta-xylanase F3 (B8NXJ2) | | Endo-1,4-beta-xylanase F3 (Q96VB6) | |
| | | Probable xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase A (B8N3L3) | | | |
| | | Probable acetylxylan esterase A (A9JPE6) | | | |
| Enzimas accesorias | Alpha-L-arabinofuranosidase (B8NER2) | Alpha-L-arabinofuranosidase, putative (B8NER2) | | | |
| | | Arabinosidase, putative (B8N637) | | Arabinosidase, putative (B8N637) | |
| | | Probable feruloyl esterase C (B8N7Z6) | | | Probable feruloyl esterase C (B8N7Z6) |
| | | Probable beta-galactosidase A (B8N6V7) | | | Probable beta-galactosidase A (B8N6V7) |
| | | | | Arabinan-endo 1,5-alpha-L-arabinase, putative (B8MVW0) | Arabinan-endo 1,5-alpha-L-arabinase, putative (B8MVW0) |
| | Glycosyl hydrolases family 32 (B8NTE9) | | | Glycosyl hydrolases family 32 (B8NTE9) | Glycosyl hydrolases family 32 (B8NTE9) |
| | | | | Probable arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase C (B8NMD3) | |
| Celulasas | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (B8N7G5) | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (B8N7G5) | | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (B8N7G5) | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (B8N7G5) |
| | Endoglucanase, putative (B8N9Q1) | Endoglucanase, putative (B8N9Q1) | | Endoglucanase, putative (B8N9Q1) | |
| | Endoglucanase, putative (B8NID4) | Glucanase (B8NIV4) | | Extracellular endoglucanase/cellulase, putative (B8NBF4) | Probable beta-glucosidase A (B8NRX2) |
| | | Endoglucanase, putative (B8NGX0) | | | |
| | | probable endo-beta-1,4-glucanase B (B8MW97) | | | |
| Pectinasas | Probable pectate lyase (B8NE46) | Probable pectate lyase A (B8NE46) | | | |
| | | Probable pectin lyase D (B8NVB7) | | Probable pectin lyase D (B8NVB7) | |
| | | Probable rhamnogalacturonate lyase A (B8NCU7) | | | |

A pesar de que la cepa toxigénica crece muy lentamente a comparación con la cepa no toxigénica a los tres días de incubación ya podemos identificar enzimas propias de *Aspergillus flavus*, en comparación con la cepa no toxigénica que a pesar de tener mayor crecimiento se identificaron proteínas del hongo hasta los 7 días de incubación. Lo anterior es de gran relevancia si consideramos que la respuesta de los mecanismos de defensa del grano de maíz es menor que cuando el grano está infectado con la cepa no toxigénica.

Se identificó una enzima aspergiloepsina, proteasa que por homología se sabe es secretada e hidroliza sustratos como la elastina y el colágeno. Esta proteasa no fue identificada en la cepa no toxigénica en ninguna de las muestras.

Si comparamos las amilasas producidas por ambas cepas a los 7 días de incubación la glucoamilasa putativa es compartida con la cepa no toxigénica y la α -amilasa es diferente. La α -amilasa (B8N0S9) identificada en la cepa toxigénica esta codificada en el gen AFLA_026140 y la α -amilasa (Q7LV45) identificada en la cepa no toxigénica es codificada en el gen amy1.

En el mismo periodo de incubación la cepa toxigénica secreta más proteasas comparada con la cepa no toxigénica, la enzima con la clave B8N106 es también secretadas por la cepa no toxigénica. La diferencia de las xilanasas a los 7 días de incubación explica la diferencia de actividades xilanólíticas obtenidas en el ensayo de la cuantificación de esta actividad enzimática. Por las características del crecimiento de la cepa toxigénica en donde su crecimiento es escaso, pero en su mayoría extensivo en el pericarpio del grano se esperaba una mayor cantidad en el tipo de xilanasas, debido a que el pericarpio tiene un elevado porcentaje de hemicelulosa en su composición. Las enzimas accesorias expresadas entre ambas cepas son diferentes y con diferente actividad.

Ambas cepas secretan la endoglucanasa putativa B8N9Q1 y la celobiohidrolasa B8N7G5. La endoglucanasa extracelular (B8NBF4) solo se identificó en la cepa toxigénica, aunque también se identificó una endoglucanasa en la cepa no toxigénica (B8NID4).

Como bien se demostró en los extractos enzimáticos obtenidos después de inocular el hongo en los granos de maíz se detectó actividad de pectin-liasa pudiéndose identificar a la enzima pectin liasa, inferida por homología y también es secretada por la cepa no toxigénica, pero hasta los 10 días pudimos detectar su presencia, en la cepa toxigénica ya se identifica su presencia a los 7 días de incubación.

A los 10 días de incubación la cepa no toxigénica secreta más enzimas a comparación de la cepa toxigénica. Las amilasas secretadas a los 10 días son las mismas que a los 7 días, la cepa no toxigénica secreta dos amilasas más, probablemente esto explique porque el crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 sea más abundante.

La cepa no toxigénica expresa una mayor cantidad de proteasas, lo anterior consideramos está directamente relacionado con el mayor crecimiento de esta cepa a los 10 días en comparación con la cepa toxigénica. La cepa toxigénica expresa una mayor cantidad de proteasas al inicio de la infección a comparación de la cepa no toxigénica, sin embargo a más días de incubación la cepa no toxigenica secreta una mayor cantidad de proteasas, lo anterior debido a las características del crecimiento de ambas cepas, en donde la cepa no toxigénica tiene mayor crecimiento e infección en el endospermo.

La cepa toxigénica secreta una β -xilanasas, comparando con la cepa no toxigénica también es detectada esta misma enzima, solo que la cepa no toxigénica expresa otras cinco xilanasas adicionales, lo cual explica una mayor magnitud de la actividad enzimática cuantificada en los ensayos en la cepa no toxigénica.

A los 10 días ambas cepas secretan el mismo número de enzimas accesorias compartiendo dos (B8N6V7 y B8N7Z6).

La cepa no toxigénica expresa 4 celulasas, adicionales a las secretadas por la cepa toxigénica, se explica por el mayor crecimiento de la cepa no toxigénica o la expresión de estas enzimas favorece el crecimiento de *Aspergillus flavus* en el grano de maíz.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El mejor método para realizar un análisis enzimático de *Aspergillus flavus* es la infección directa en el grano de maíz con punción en el endospermo, pues se obtiene un mejor crecimiento y es un ensayo más cercano a la realidad biológica del grano infectado por *Aspergillus flavus*.

Con base a las actividades enzimáticas calculadas directamente sobre los extractos líquidos, sin considerar la cantidad de proteínas totales extraídas (U/mL), se determinó que en *A. flavus* CECT 2687 no hay diferencia significativa entre las actividades de amilasas, exopectinasas, celulasas y xilanasas en los diferentes tipos de maíz (blanco, rojo y morado). En el caso de la cepa *A. flavus* NRRL 6541, si hay diferencia significativa entre la producción de amilasas, xilanasas, celulasas y exopectinasas en los diferentes tipos de maíz (blanco, rojo y morado) siendo mayor la actividad en el maíz rojo y para el caso de la actividad xilanólítica es mayor en el maíz blanco. Lo anterior no concuerda con lo esperado, pues inicialmente se planteó que la cepa toxigénica se vería afectada por la presencia de antocianinas en el grano de maíz, pues existe evidencia de que las antocianinas afectan la síntesis de aflatoxinas (Norton, 1999), siendo estas uno de los mecanismos de patogenicidad relacionada con la resistencia al estrés oxidativo y su posible efecto tóxico en el tejido vegetal (Fountain, et al., 2015), sin embargo en donde se encontraron diferencias en cuanto al crecimiento y la actividad de las enzimas hidrolíticas fue en la cepa no toxigénica por lo que se debe investigar posteriormente si es debido a la variabilidad biológica de la cepa, pues en comparación con la cepa toxigénica tiene un mayor crecimiento y este puede influir en los resultados obtenidos o la diferencia observada puede deberse a otros componentes del grano de maíz que no fueron considerados, es conveniente realizar un análisis químico del tipo y cantidad de antocianinas presentes en estos dos tipos de maíz (rojo y morado).

Inicialmente se tenía contemplado identificar el secretoma de la cepa que presentara diferencias significativas en la actividad enzimática utilizando diferentes tipos de maíz, sin embargo solo se realizó la identificación de las proteínas en el maíz blanco y el análisis comparativo de la cepa toxigénica y no toxigénica derivado de la diferencia que se observaron en el crecimiento de las cepas, pues la cepa toxigénica crece menos que la no toxigénica y tiene la característica de invadir primero el pericarpio del grano a comparación de la no toxigénica en donde gran parte del crecimiento del hongo es en la zona de inoculación (germen).

Se pudieron identificar las proteínas que integran el secretoma (100% de probabilidad de pertenecer al secretoma según la base de datos FunSecKB), muchas otras proteínas y enzimas metabólicas de las cepas *A. flavus* CECT 2687 (toxigénica) y *A. flavus* NRRL 6541 (no toxigénica), cuando utiliza el grano de maíz blanco como sustrato, en diferentes días de incubación. Se determinó el orden en que fueron secretadas a los 3, 7 y 10 días de incubación. Lo anterior es importante debido a que no se tiene evidencia en la literatura científica de ningún estudio del secretoma de *Aspergillus flavus* cuando utiliza como sustrato granos de maíz, a pesar de los riesgos que implica a la salud y a las pérdidas económicas que genera. En el análisis comparativo no se consideró el tiempo de incubación de 5 días, debido a que no se tiene la identificación de las proteínas en este periodo de la cepa toxigénica y en la cepa no toxigénica las proteínas identificadas pertenecen al grano de maíz, siendo la cepa que presentó mayor crecimiento.

En el análisis proteómico de los extractos obtenidos de los granos de maíz blanco infectado con las dos cepas de *Aspergillus flavus* (toxigénica y no toxigénica) a los 3 días, en su mayoría se identificaron proteínas pertenecientes al grano de maíz, varias de las cuales corresponden a mecanismos de defensa del grano, solo se identificó una proteasa en la cepa toxigénica (Aspergillopepsin-1), es de interés estudiar y caracterizar esta enzima que ha sido identificada en otras especies de *Aspergillus*, como *Aspergillus saitoi*, según se indica en UniprotKB con evidencia experimental de la proteína y determinar si es un posible factor de virulencia al ser secretada en los primeros días de la infección en el grano de maíz de la cepa toxigénica.

Se identificaron 7 diferentes quitinasas en el ensayo de la cepa no toxigénica y 8 quitinasas en el ensayo de la cepa toxígena (Ver Tabla 3 y Tabla 38 del Anexo 2), tres de las quitinasas coinciden con las identificadas en el análisis de ambas cepas (B8QUT5, B8QUV05 y P29023). La diferencia en el tipo de quitinasas es probablemente debida al tipo de la cepa inoculada y a la variabilidad biológica de los granos de maíz, ya que no se tiene un control estricto del origen de los mismos.

Las quitinasas son producidas como mecanismo de respuesta del grano de maíz ante la infección de *Aspergillus flavus*, ya que son enzimas que hidrolizan los enlaces β (1-4) de la N-acetil-D-glucosamina en los polímeros de quitina y quitodextrinas, compuestos que constituyen la pared celular del hongo. Se han reportado dos bandas con actividad de quitinasas (25-29 kDa) en extractos de granos de maíz (Darnetty, *et al* 1993) por lo que las quitinasas

identificadas en nuestros extractos concuerdan con las encontradas en una de las bandas (29 kDa) de dicho estudio, las quitinasas expresadas dependen de la variedad del maíz analizado. La endoquitinasa B identificada está catalogada como una enzima de defensa contra infecciones bacterianas y fúngicas que sufre el grano de maíz, como se indica en UniprotKB.

Podemos inferir que el grano de maíz está respondiendo a la infección del hongo al expresar estas enzimas que en los granos control no se expresan y a la identificación de enzimas específicas de respuesta a la infección de hongos filamentosos (Ver Tabla 4 y 39 del Anexo 2), las cuales han sido previamente reportadas en la literatura como es la enzima β -1,3-glucanasa.

La enzima β -1,3-glucanasa esta reportada como una proteína de defensa del grano de maíz (Darnetty; *et al*, 1993) en dicho estudio se encontraron dos bandas de 24 y 36 kDa con dicha actividad enzimática en extractos de granos de maíz, dicha enzima nosotros la encontramos con un peso molecular de 35.977 kDa e igual que las quitinasas debilitan la pared celular de los hongos. En otro estudio se relacionó el incremento de la actividad de esta enzima en los genotipos de maíz resistentes (Tex6 X Mo17) con la presencia de *A. flavus* en los granos de maíz y una disminución del crecimiento del hongo (Lozovaya V.V., *et al*, 1998) La enzima identificada concuerda con las encontradas anteriormente por lo que el grano de maíz en los primeros tres días ya está defendiéndose de la infección de *A. flavus*.

En el caso del ensayo de la cepa no toxigénica se identificaron otras proteínas de defensa como la α -amilasa/inhibidor de tripsina que se ha identificado en otro estudio en donde se analizaron 13 genotipos de maíz que reveló la presencia de una proteína de 14 kDa identificada como proteína inhibidora de tripsina (TI) su mecanismo de acción es inhibir la α -amilasa del hongo (Cary, *et al*, 2011), la proteína identificada difiere en su peso molecular (22 kDa) pero esta proteína ya se encuentra ampliamente caracterizada y esta descrita como proteína de defensa anti fúngica (Huynh, *et al*, 1992).

Las otras tres enzimas identificadas, incluidas dos rRNA N-glicosidasas y una proteína de inactivación de ribosomas, son designadas como proteínas de inhibición de Ribosomas y juegan un papel importante en el mecanismo de defensa de las plantas, incluyendo al maíz, según se refiere en la base de datos UniprotKB porque inhiben la actividad de ribosomas de otras especies.

Se identificaron menos proteínas producidas por el grano de maíz para fines de defensa ante la infección de la cepa toxigénica. Lo anterior es probablemente debido a la secreción de la proteasa Aspergillopepsin-1 (B8NLY9) desde los 3 días de incubación y a una mayor secreción de proteasas en los siguientes días, lo que podría explicar una degradación de las proteínas de defensa del grano de maíz.

La identificación de estas proteínas no se esperaba, ya que se sometieron los granos de maíz a un proceso de esterilización por calor húmedo que conlleva la inactivación del grano de maíz con la finalidad de evitar que las enzimas del grano de maíz (amilasas, entre otras) interfirieran con la cuantificación de la actividad e identificación de las enzimas del hongo. Sin embargo, es interesante que aún con este proceso el grano de maíz responda a la infección del hongo y el presente estudio da evidencia experimental de la producción de algunas enzimas de las cuales solo se tenía evidencia experimental a nivel de transcripción, según se indica en la base de datos UniprotKB. En cuanto a la respuesta del grano de maíz a la infección de ambas cepas el perfil enzimático encontrado varía considerablemente por lo que se puede inferir que el grano de maíz activa diferentes mecanismos de defensa dependiendo de las características del hongo que invade, como podemos observar en el perfil de las quitinasas para ambas cepas.

A los 7 días de incubación, la cepa toxigénica secreta 6 proteasas y ninguna lipasa en comparación con la cepa no toxigénica, la cual en el mismo periodo solo secreta 3 proteasas y una lipasa, la identificación de lipasas se esperaba porque el sitio de inoculación en el germen tiene en su composición lípidos, sin embargo el perfil de las enzimas que degradan el pericarpio (xilanasas, enzimas accesorias, exo-pectinasas y celulasas) en cuanto a cantidad es el mismo en ambas cepas. La diferencia radica en el tipo de enzimas que se expresan y en su caso se secretan en ambas cepas. En donde podemos observar una diferencia es en la cantidad de proteasas por lo que podemos inferir que las proteasas son un factor de virulencia importante para la cepa toxigénica. En cuanto a las amilasas a los 7 días de incubación se identifican 2 amilasas en ambas cepas, tal como se esperaba a este periodo de incubación, ya que el hongo accede al almidón como principal fuente de carbono, en este periodo ambas cepas expresan la misma glucoamilasa y una α -amilasa diferente.

Se identificaron 4 amilasas después de 10 días de incubación en la cepa no toxigénica *A. flavus* NRRL 6541 y 2 amilasas en la cepa toxigénica *A. flavus* CECT 2687 de las cuales solo se tenía evidencia de proteína predicha e inferida por homología, sin embargo, con este ensayo

se tiene evidencia de que la proteína se expresa y es de gran importancia estudiarlas en un futuro para caracterizarlas debido a la relación que tiene las amilasas con la producción de aflatoxinas.

En la cepa no toxigénica a los 10 días de incubación se identificaron una mayor cantidad de enzimas hidrolíticas (amilasas, proteasas, xilanasas, enzimas accesorias, celulasas y pectinasas) a comparación con la cepa toxigénica, lo anterior relacionado directamente con el mayor crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 sobre el grano de maíz, como nos muestran los resultados del ensayo de crecimiento y la observación de los granos infectados bajo el microscopio estereoscópico.

A los 10 días en la cepa toxigénica se identificaron menos enzimas hidrolíticas (amilasas, proteasas, xilanasas y celulasas) con respecto a los 7 días de incubación, solo se incrementan las enzimas accesorias lo cual puede estar relacionado con el crecimiento observado de la cepa, la cual invade más el pericarpio y necesita secretar estas enzimas para degradar el xilano que compone esta estructura del grano de maíz.

En la cepa no toxigénica se identificó un grupo de enzimas que no se tenía contemplado, y que no se identificaron en la cepa toxigénica, las fosfatasas, dentro de la cual la fitasa es secretada para tener acceso al fosforo que contiene el grano de maíz, hasta el momento esta enzima tiene la categoría de proteína putativa.

Según la evidencia de los secretomas de los hongos filamentosos estos varían con respecto al sustrato, en este estudio ambas cepas crecieron en el mismo sustrato (grano de maíz blanco), razón por la cual se identificaron varias de las enzimas en ambas cepas, las diferencias pueden ser atribuibles a la variabilidad biológica de las cepas y a que la cepa toxigénica crece lentamente. Por lo anterior es ideal realizar un estudio de análisis del secretoma de *A. flavus* CECT 2687 con más días de incubación para verificar si se identifican las enzimas que ya fueron identificadas en *Aspergillus flavus* NRRL 6541 a los 10 días y confirmar que ambas cepas comparten el secretoma o existen diferencias debidas a la variabilidad biológica. Debido a que *Aspergillus flavus* NRRL 6541 presentó diferencias significativas en los diferentes tipos de maíz, como perspectiva se debería realizar un análisis de la composición del grano y la identificación de las enzimas hidrolíticas cuando utilice el maíz rojo y morado como sustrato.

11. CONCLUSIONES

El método ideal para realizar el análisis enzimático de *Aspergillus flavus* es la infección directa en el grano de maíz con punción en el endospermo.

En la cepa de *A. flavus* NRRL 6541 (no toxigénica) se determinó que hay diferencia significativa entre las actividades enzimáticas de amilasas, exopectinasas, celulasas y xilanasas en los diferentes tipos de maíz (blanco, rojo y morado), después de 10 días de incubación, en el caso de *A. flavus* CECT 2687 (toxigenica) no hay diferencia significativa.

En el análisis proteómico de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 (no toxigénica) obtenido después de su crecimiento en el grano de maíz blanco a los 7 y 10 días se identificaron 33 enzimas con actividad para degradar la estructura del grano de maíz, con probabilidad del 100% de pertenecer al secretoma, las cuales se agruparon en 9 proteasas, 6 celulasas, 6 xilanasas, 5 enzimas accesorias, 4 amilasas y 3 pectinasas; en comparación con la cepa de *A. flavus* CECT 2687 (cepa toxigénica) en donde se identificaron 23 enzimas, las cuales se agruparon en: 7 proteasas, 4 celulasas, 3 xilanasas, 6 enzimas accesorias, 2 amilasas y 1 pectinasa.

El secretoma de las cepas *A. flavus* NRRL 6541 (no toxigénica) y *A. flavus* CECT 2687 (cepa toxigénica) es diferente a los 3, 7 y 10 días de incubación. A los 10 días de incubación en la cepa no toxigénica se identificaron un mayor número de proteínas (68 proteínas) en comparación con la cepa toxigénica (28 proteínas), lo anterior está directamente relacionado con la diferencia observada en el crecimiento de ambas cepas sobre el grano de maíz, el cual es mayor en la cepa no toxigénica en los tiempos de incubación analizados en el presente estudio.

Los resultados aquí presentados son los primeros datos descritos de enzimas hidrolíticas secretadas identificadas en condiciones *in vitro* de *Aspergillus flavus* cuando utiliza el grano de maíz como sustrato. Con este trabajo se establecieron las bases para el estudio posterior del secretoma del hongo en diferentes tipos de granos de maíz.

12. REFERENCIAS

- **Amaiike S y Keller N.P.** (2011). *Aspergillus flavus*. Annu. Rev. *Phytopathology*. 49,107-133.
- **Arenas R.** (1993) *Micología Medica Ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica*. México D.F. Mc Graw Hill. 397
- **Arias Cifuentes E.L. y Piñeros Espinosa P.A.** (2008) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C.
- **Bennet J.W.** (2009) *Aspergillus: a primer for the novice*. *Medical Mycology* 47, S5-S12.
- **Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.**,(2007), *Bioquímica*, (6a.ed.), España, Reverté.
- **Biscaro, D., Costa, A., Gomes, E., Cano, E.** (2009). Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*. 3, 9-18.
- **Boddi S, Comparini C, Calamassi R., Pazzagli L., Cappugi G., Scala A.** (2004) Ceratoplatenin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. Platani. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 233, pp 341-346.
- **Boyer, C. D. y Shannon, J. C.** (2001) Carbohydrates of the Kernel, Corn: chemistry and technology. *Journal of cereal Science*, Inc. I: 253-272.
- **Brown R.L., Cleveland T.E. Payne G.A., Woloshuk C.P., Cambell K.W. y White D.G.**(1995) Determination of resistance to aflatoxin production in Maize kernels and detection of fungal colonization using an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* β -glucuronidase. *Phytopathology* 85, 983-989.
- **Burge, R.M., Duesing, W.J.** (1989). Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World* 34: 535-538.
- **Camacho Lara Michelle M.** (2014) Producción, purificación y caracterización de la pectiniliasa de *Aspergillus flavus* CECT 2687, TESIS de Licenciatura para obtener el título de Químico de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- **Carrillo, L.** (2003) Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Salta, 44-60.
- **Cary J.W., Rajasekaran K., Brown L.R. , Lou M., Chen Zhi-Yuan y Bhatnagar D.**(2011) Developing resistance to aflatoxin in Maize and Cotton seed. *Toxins* 2, 678-696.
- **Castañeda García Diana** (2013) Crecimiento de cepas de *Aspergillus flavus* en medio sólido y la relación entre la fuente de carbono utilizada y la secreción de enzimas, TESIS de Licenciatura para obtener el título de Químico de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- **Cuevas-Montilla E., Antezana A. y Winterhalter P.** (2008). Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea Mays*) boliviano. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Red Alpha Lagrotech, 79-95
- **Darnetty, J.F., Muthukrishnan S., Swegle M., Vigers A.J, Selitrennikoff C.P** (1993) Variability in antifungal proteins in the grains of maize, sorghum and wheat. *Physiologic Plantarum*, Volumen 88, Issue 2
- **de Vries R.P.** (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 10-20

- **de Vries R.P.**, (1999) Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation, Universidad Wageningen, 1-47.
- **de Vries, R. P., y Visser, J.** (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65, 497-522.
- **de Vries, R.P., et al** (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology*. 18(28); 1-45.
- **Durst R, Wrolstad Re.** (2001) Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: Handbook of Food Analytical Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons. p. 33-45
- **Earle F.R., Curtis J.J. and Hubbard, J. E.** (1946). Cereal chemistry. 23, 504.
- **Enguita F.J., Costa M.C., Fusco-Almeida A.M., Mendes-Giannini M.J. Leitao A.L.** (2016). Transcriptomic Crosstalk between Fungal Invasive Pathogens and Their Host Cells: Opportunities and Challenges for Next-Generation Sequencing Methods. *Journal of Fungi*. 2,7; doi:10.3390/jof2010007.
- **Fakhoury A.M., Woloshuk C.P.** (1999). Amy1, the alpha-Amylase Gene of *Aspergillus flavus*: Involvement in Aflatoxin Biosynthesis in Maize Kernels. *Phytopathology*, Vol 89 (10): 908-914.
- **Fleury A. Pons Y., Roncin, F. and Buré, J.** (1979). Cereales, Gran Larousse Universal. (Vol. 9: 2621-2622). Plaza & Janes, S.A., USA.
- **Fountain J.C., Khera P., Yang L., Nayak, S.N., Scully, B.T., Lee, R.D. Zhi-Yuan Chen, Kemerait R.C, Varshney, R.K., Gou B.** (2015) Resistance to *Aspergillus flavus* in maize and peanut: Molecular biology, breeding, environmental stress, and future perspectives. *The Crop Journal*, Vol 3, p. 229-237.
- **Fountain J.C, Scully, B.T., Xinzi N., Kemerait R.C., Lee R.D., Zhi-Yuan Chen, Gou B.** (2014) Environmental influences on maize *Aspergillus flavus* interactions and aflatoxin production, *Front Microbial*, 2014:5:40
- **Frisvard J.C., Hubka V., Ezekiel C.N. Hong A. Novakova A.J. Chen M. Arzanlou T.O. Larsen F. Sklenar W. Mahakarnchanakul R.A. Samson J. Houbraken** (2019) Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins, *Studies in Mycology* Vol. 93, 1-63.
- **Gallardo R.E.D., Ibarra M.M., Sánchez M.R.I.** (2006). Micobiota del Maíz (*Zea mays* L.) Recién cosechados y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Revista mexicana de fitopatología*, 27-32
- **García Cortes V.** (2004) Introducción a la microbiología. Editorial Universidad estatal a distancia. 2ª edición
- **Gonzalez U.** 1995. El maíz y su conservación. Trillas. México.
- **Goodman, M.M. y Brown, W.L.** (1988). Races of corn. In G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3rd ed., p. 33-79. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.
- **Gou B.Z. Russin J.S, Cleveland T.E., Brown R.L. Damann K.E.** (1996). Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Phytopathology* 86, 824-829
- **Grabber J.H.** (2005) How lignin composition, structure and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci Society of America* 45:820-831.
- **Hedayati M.T., Pasqualotto A.C., Warn P.A., Bowyer P. y Denning D.W.** (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153, 1677-1692.

- **Herrera T., U. M.** (2004). *El reino de los hongos, Micología básica y aplicada*. México, D. F.: UNAM. Fondo de Cultura Económica.
- **Horn B.W., Gell R.M., Singh R., Sorensen, R.B., Carbone I.** (2016). Sexual Reproduction in *Aspergillus flavus* Sclerotia: Acquisition of Novel Alleles from Soil Populations and Uniparental Mitochondrial Inheritance. *Plos One*, 11(1): e0146169
- **Hugh I., Doebley, J.F.** (1980). Taxonomy of *zea (gramineae)*. ii. *subspecific* categories in the *zea* mays complex and a generic synopsis, *American Journal of Botany* 67(6): 982-993.
- **Huynh Q.K., Borgmeyer J.R., Zobel J.F.** (1992). Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 182, 1-5
- **Jackson, D. S. y Shandera, J. R.** (1995) Corn Wet Milling: Separation Chemistry and Technology, *Advances in Food and Nutrition Research*. 38, 271-297.
- **Jung H.J.G., Ni W** (1998) Lignification of plant cell wall: Impact of genetic manipulation. *Natl Acad Sci USA* 95:12742-12743.
- **Kendrick, B.** (2000) The fifth kingdom. Third edition. Focus publishing. Massachusetts, E.U.A., 373
- **Lozovaya V.V., Waranyuwat A., Widholm J.M.** (1998). β -1,3-glucanasa and resistance to *Aspergillus flavus* infection in maize. *Crop Science*. 38, 1255-1260.
- **Lukas H., Gastebois A., Amanianda V., Latge J.P.** (2011) Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*. Volumen 48, Issue 2, pp 185-191.
- **Martínez-Bustos, F., H.E. Martínez-Flores, E. Sanmartín-Martínez, F. Sánchez-Sinencio, Y. K. Chang, D. Barrera-Arellano, and E. Rios.** (2001). "Effect of the Components of Maize on the Quality of Masa and Tortillas during the Traditional Nixtamalisation Process." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (15): 1455–62. doi:10.1002/jsfa.963
- **Martínez Padrón H. Y. y Hernández Delgado S.** (2013). El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, pp 126-146
- **McVaugh, R.** (1983) A descriptive account of vascular plants of western Mexico. Vol 14 Gramineae Ann Arbor The University of Michigan Press E.U.A
- **Medina M.L., Haynes P.A., Brecci L. y Francisco W.A.** (2005). Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics* 5, 3153-3161
- **Mellon J.E., Cotty P.J., Dowd M.K.** (2007) *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied Microbiology Biotechnology*. 77, 497-504
- **Miller, G.L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Anal Chem*. 31, 426-428.
- **Mohnen, D.** (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266 277.
- **Mossel, D.** (2002). Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad microbiológica de los alimentos. Zaragoza. Acribia.
- **Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios.** Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones Sanitarias.
- **Norton R.A.** (1999). Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* by Anthocyanidins and related flavonoids. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 47,1230-1235
- **Paredes L. O. y Saharópulos P.M.E.** (1983). Maize: a review of tortilla production technology. *Bakers Digest*. Sept: 16-25.

- **Patterson, J.I., Brown, R.R., Linkswiler, H. y Harper, A.E.** (1980). Excretion of tryptophan-niacin metabolites by young men: effects of tryptophan, leucine and vitamin B6 intakes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 33, 2157-2167.
- **Paz L. D. y Hernández, M.** (2000). Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasa a partir del preparado comercial NOVOBAN 240. *Cultivos tropicales*, 27-31
- **Quintero J.C., Feijoo G., Lema J.** (2006) Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulosicos VITAE, Revista de la Facultad de química farmacéutica. ISSN-0121-4004 Universidad de Antioquia. Medellín Colombia 13: 61-67.
- **Romano J., Nimrod G., Ben-Tal N., Shadkchan Y., Baruch K., Sharon H., Osherov N.,** (2006). Disruption of the *Aspergillus fumigatus* ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. *Microbiology (Reading)*, Vol. 153, 1919-1928.
- **Romo Rios Maria Guadalupe** (2012). Analisis comparativo de las enzimas producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* creciendo en desechos agroindustriales como fuentes complejos de carbono. TESIS de licenciatura para obtener el titulo de Química en Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- **Ruedas Casales Yanira Rosario** (2012). Aislamiento y selección de cepas de *Aspergillus* e identificación de la enzimas que produce. TESIS de licenciatura para obtener el titulo de Química en Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- **Rzedowski, G.C. y J. Rzedowski** (2001) Flora fanerogámica del Valle de México. 2 ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la biodiversidad, Pátzcuaro. Michoacán. México
- **Scarpari M., Punelli M, Scala V, Zaccaria M.,Nobili C.,Ludovici, Camera E., Fabbri A., Reverberi M., Fanelli C.** (2014) Lipids in *Aspergillus Flavus*-maize interaction. *Frontiers in Microbiology*. Volumen 5 Artículo 74 pp 1-9.
- **SAGARPA** (2017) Planeacion agricola nacional 2017-2030. Maíz grano blanco y Amarillo mexicano.
- **Serna, S. S. R.** (2001). Química e industrialización de los cereales. AGT Editor. México, D.F. 3-28pp
- **Sheih MT, Brown RL, Whitehead MP, Cary JW, Cotty PJ, Cleveland TE, Dean RA** (1997) Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Appl Environ Microbiol* 63:3548–3552
- **Solis Ares Paola** (2014). Comparación de la producción de amilasas por *Aspergillus flavus* CECT 2687, *Aspergillus flavus* NRRL 6542 y *Aspergillus parasiticus* NRRL 502 en fermentacion sumergida utilizando maiz como sustrato. TESIS de licenciatura para obtener el titulo de Química en Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- **Squibb, R.L., Bressani, R. y Scrimshaw, N.S.** (1957). Nutritive value of Central American corns. V. Carotene content and vitamin A activity of three Guatemalan yellow corns. *Food Res.*22, 303-307.
- **Tester, R.F., Karkalas, J., & Qi, X.** (2004). Starch – composition, fine structure, and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165. doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001
- **Torres R.L. y Aguilar G.** (2012) El estado actual del proteoma de *Aspergillus*. *Biotecnología* 16 (2), 129-152.
- **Upadhyay S.K., Mahajan L., Ramjee S., Singh Y., Basir S.F., Madan T.** (2009) Identification and characterization of a laminin-binding protein of *Aspergillus fumigatus*:

extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp). *Journal of Medical Microbiology*. Vol. 58. Issue 6, pp 714-722.

- **Walker, G. M. y White N.A.** (2011). Introduction to fungal physiology. *Fungi: Biology and applications*, Estados Unidos, Wiley, 2° edición
- **Watson, S. A.** (1988) Structure and composition. *Corn: chemistry and technology*. Pag. 53-82. Published by the American Association of Cereal Chemists, Inc. ST.
- **Watson, A. S. y Ramstad, E. D.** (1987) Structure and composition. In *Corn: Chemistry and Technology*. Ed. Published by the American Association of Cereal Chemists. Inc St. Paul, MN.
- **Weber E.J.** (1988) Lipids of the kernel. *Corn: chemistry and technology*. Publish by American association of cereal chemists. Inc. ST Paul Minnesota USA pp 311.349
- **Wong K.K., Richardson J.D., Mansfield S.D.** (2000). *Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties*. *Biotechnol Prog* 16:1025-1029.
- **Yadav, S., Kumar, P., Yadav, D., Singh, K.** (2009). Pectin lyase: A review, *Process Biochemistry*. 44 (9): 1-10.
- **Yan, S., Liang Y., Zhang J., Chen Z., Liu C.M.,** (2015) Autoxidated linolenic acid inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* via oxylipin species. *Fungal genetics and biology*, Volumen 81, pp 229-237.
- **Yen, J.T., Jensen, A.H. y Baker, D.H.** (1976). Assessment of the concentration of biologically available vitamin B6 in corn and soybean meal. .1. *Anim. Sci.*, 42:866 870.
- **Yu J., Bhatnagar D, C. Ehrlich K.** (2002) Aflatoxin Biosynthesis, *Revista Iberoamericana de Micología*, 19:191-200.
- **Yu J., Mohawed S.M., Bhatnagar D., Cleveland T.E.** (2003) Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 95, Issue 6
- **Yu, J.** (2012) Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, 4:1024-1057

13. ANEXOS

13.1 Anexo 1

Tabla 1 Anova de las actividades de amilasas (U/mL) de la cepa *A. flavus* CECT 2687 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| RESUMEN | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 4 | 507.0281124 | 126.757028 | 18.3968807 | | |
| Columna 2 | 4 | 522.0883534 | 130.522088 | 102.820922 | | |
| Columna 3 | 4 | 479.9196787 | 119.97992 | 56.7867185 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 228.3229303 | 2 | 114.161465 | 1.92402076 | 0.20152322 | 4.25649473 |
| Dentro de los grupos | 534.0135643 | 9 | 59.3348405 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 762.3364946 | 11 | | | | |

Tabla 2 Anova de las actividades de amilasas (U/mg) de la cepa *A. flavus* CECT 2687 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| Análisis de varianza de un factor | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 3 | 1369.98074 | 456.660247 | 103.327334 | | |
| Columna 2 | 3 | 1399.09638 | 466.365461 | 1063.95379 | | |
| Columna 3 | 3 | 1134.31322 | 378.104408 | 524.500035 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 14055.2246 | 2 | 7027.61231 | 12.4619173 | 0.00730422 | 5.14325285 |
| Dentro de los grupos | 3383.56232 | 6 | 563.927054 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 17438.787 | 8 | | | | |

Tabla 3 Anova de las actividades de amilasas (U/mL) de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| RESUMEN | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 4 | 835.3413655 | 208.835341 | 24.8651903 | | |
| Columna 2 | 3 | 919.6787149 | 306.559572 | 590.044247 | | |
| Columna 3 | 3 | 713.8554217 | 237.951807 | 158.263576 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 16713.67532 | 2 | 8356.83766 | 37.2310629 | 0.00018599 | 4.73741413 |
| Dentro de los grupos | 1571.211217 | 7 | 224.458745 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 18284.88653 | 9 | | | | |

Tabla 4 Anova de las actividades (U/mg) de amilasas de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| RESUMEN | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 4 | 1775.004615 | 443.751154 | 737.429349 | | |
| Columna 2 | 3 | 1513.254932 | 504.418311 | 2650.98663 | | |
| Columna 3 | 3 | 1383.936186 | 461.312062 | 83.2274915 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 6459.001117 | 2 | 3229.50056 | 2.94328069 | 0.11813089 | 4.73741413 |
| Dentro de los grupos | 7680.716287 | 7 | 1097.24518 | | | |
| Total | 14139.7174 | 9 | | | | |

Tabla 5. Anova de las actividades de exopectinasas (U/mL) de la cepa *A. flavus* CECT 2687 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| Análisis de varianza de un factor | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 4 | 78.4309401 | 19.607735 | 1.16942226 | | |
| Columna 2 | 4 | 82.0524928 | 20.5131232 | 1.2943262 | | |
| Columna 3 | 4 | 80.4309021 | 20.1077255 | 1.64201202 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 1.64542071 | 2 | 0.82271035 | 0.60113859 | 0.56879302 | 4.25649473 |
| Dentro de los grupos | 12.3172815 | 9 | 1.36858683 | | | |
| Total | 13.9627022 | 11 | | | | |

Tabla 6. Anova de las actividades exopectinosas (U/mL) de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| Análisis de varianza de un factor | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 4 | 127.619193 | 31.9047984 | 5.28126968 | | |
| Columna 2 | 4 | 165.834682 | 41.4586706 | 1.69070751 | | |
| Columna 3 | 3 | 97.3494991 | 32.449833 | 0.80737127 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 221.627111 | 2 | 110.813555 | 39.346734 | 7.2513E-05 | 4.45897011 |
| Dentro de los grupos | 22.5306741 | 8 | 2.81633427 | | | |
| Total | 244.157785 | 10 | | | | |

Tabla 7 Anova de las actividades de celulasas (U/mL) de la cepa *A. flavus* CECT 2687 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| RESUMEN | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 4 | 12.46114565 | 3.11528641 | 0.12702459 | | |
| Columna 2 | 4 | 12.21136767 | 3.05284192 | 0.03389034 | | |
| Columna 3 | 4 | 11.2955151 | 2.82387877 | 0.2451273 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 0.18832246 | 2 | 0.09416123 | 0.69570028 | 0.52367025 | 4.25649473 |
| Dentro de los grupos | 1.21812669 | 9 | 0.13534741 | | | |
| Total | 1.40644915 | 11 | | | | |

Tabla 8. Anova de las actividades de celulasas (U/mL) de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| Análisis de varianza de un factor | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 4 | 10,6294405 | 2,657360124 | 0,03459639 | | |
| Columna 2 | 3 | 16,84613677 | 5,615378922 | 0,197436911 | | |
| Columna 3 | 4 | 14,93117229 | 3,732793073 | 0,051605747 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 15,0939048 | 2 | 7,5469524 | 92,3908886 | 2,9655E-06 | 4,45897011 |
| Dentro de los grupos | 0,65348023 | 8 | 0,08168503 | | | |
| Total | 15,747385 | 10 | | | | |

Tabla 9. Anova de las actividades de las xilanasas (U/mL) de la cepa *A. flavus* CECT 2687 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| RESUMEN | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|--------------|----------------------|
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 3 | 9,22533804 | 3,07511268 | 0,461791807 | | |
| Columna 2 | 4 | 9,291946979 | 2,322986745 | 0,554131681 | | |
| Columna 3 | 4 | 9,591687204 | 2,397921801 | 0,024402129 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 1,12556501 | 2 | 0,562782505 | 1,693097684 | 0,243694329 | 4,45897010 |
| Dentro de los grupos | 2,659185045 | 8 | 0,332398131 | | | |
| Total | 3,784750055 | 10 | | | | |

Tabla 10 Anova de las actividades de xilanasas (U/mL) de la cepa *A. flavus* NRRL 6541 en los tres tipos de maíz $\alpha=0.05$

| RESUMEN | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|
| Grupos | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> | | |
| Columna 1 | 4 | 83.2278692 | 20.8069673 | 0.70572067 | | |
| Columna 2 | 3 | 40.3983215 | 13.46610715 | 11.3318311 | | |
| Columna 3 | 4 | 60.8139612 | 15.20349031 | 4.89928201 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| Entre grupos | 107.751273 | 2 | 53.87563654 | 10.9174167 | 0.0051697 | 4,4589701 |
| Dentro de los grupos | 39.4786703 | 8 | 4.934833785 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 147.229943 | 10 | | | | |

13.2 Anexo 2

Tabla 1. Proteínas identificadas en los granos controles de maíz blanco incubados por 10 días.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Q7M1Z8 | Globulin-2 OS=Zea mays OX=4577 GN=542382 PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B6UGJ0 | Globulin-1 S allele OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0PE24 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 2. Proteínas no caracterizadas identificadas en los granos de maíz Blanco inoculados con la cepa no toxígena *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B4FRC6 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| C0P9K2 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| B4FHQ4 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| B4FQ97 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| B4G1C2 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| B4F9T3 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| B4FZB0 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| B6THL2 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia a nivel de transcripción |
| C0PE24 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 3. Quitinasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| B8QUT5 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QUV0 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QUZ2 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QUZ8 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| D0EM57 | Chitinase OS=Zea mays OX=4577 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QV05 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiB PE=4 SV= | Proteína predicha |
| P29023 | Endochitinase B (Fragment) OS=Zea mays OX=4577 PE=1 SV=1 | Proteína con evidencia experimental |

Tabla 4. Proteínas defensivas de los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| E1AFV5 | Beta-1,3-glucanase OS=Zea mays OX=4577 GN=glucA PE=2 SV=1 | Proteína con evidencia experimental |
| P13867 | Alpha-amylase/trypsin inhibitor OS=Zea mays OX=4577 PE=1 SV=1 | Proteína con evidencia experimental |
| B8QXF6 | rRNA N-glycosidase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=rip1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |
| B8QXI5 | rRNA N-glycosidase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=rip1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |
| Q2XXF4 | Ribosome inactivating protein 1 (Fragment) OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=rip1 PE=4 SV=1 | Proteína Predicha |

Tabla 5. Proteínas estructurales de los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Q7M1Z8 | Globulin-2 OS=Zea mays OX=4577 GN=542382 PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| O04288 | Endosperm specific protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Proteína con evidencia experimental |

Tabla 6. Proteínas identificadas que participan en diferentes procesos metabólicos en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B4FWP0 | Fructose-bisphosphate aldolase OS=Zea mays OX=4577 GN=100272913 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| Q8S4W9 | Pyruvate decarboxylase OS=Zea mays OX=4577 GN=fdc3 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FVH1 | Malate dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| E9JVD4 | Aldose reductase OS=Zea mays OX=4577 GN=AR3 PE=1 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6T3P9 | Enolase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| O24595 | Glutathione transferase OS=Zea mays OX=4577 GN=GST5 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6UAK0 | Probable 6-phosphogluconolactonase OS=Zea mays OX=4577 GN=100285843 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B8A0J4 | Phospholipase D OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| I1VEW1 | Granule-bound starch synthase I OS=Zea mays subsp. mays OX=381124 GN=wx1 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6T2R0 | Triosephosphate isomerase, cytosolic OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6SMQ5 | Triose phosphate isomerase5 OS=Zea mays OX=4577 GN=100280823 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0PK05 | Lactoylglutathione lyase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 Lactoylglutathione lyase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FAL9 | Fructose-bisphosphate aldolase OS=Zea mays OX=4577 GN=542261 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FQQ1 | Reactive Intermediate Deaminase A chloroplastic OS=Zea mays OX=4577 GN=100273379 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0P5Y3 | 5methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1 OS=Zea mays OX=4577 GN=541942 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FWU6 | Glutathione reductase OS=Zea mays OX=4577 GN=100273659 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FFK9 | Oil body-associated protein 2A OS=Zea mays OX=4577 GN=OBAP2A PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4G1G1 | Desiccation-related protein PCC13-62 OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 7. Proteínas transportadoras de lípidos y lipoproteínas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Q2XX18 | Non-specific lipid-transfer protein (Fragment) OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=plt1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |
| B4FFZ9 | Oil body-associated protein 1A OS=Zea mays OX=4577 GN=OBAP1A PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 8. Proteasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B6THH6 | Prolyl carboxypeptidase like protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6TJB6 | Proteasome subunit alpha type OS=Zea mays OX=4577 GN=100283546 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 9. Oxido-reductasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Q53CF4 | Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| Q7FS90 | Putative aldose reductase-related protein OS=Zea mays OX=4577 GN=Z138B04_Z333J11.16 PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B4FNZ9 | General stress protein 39 OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6TIS2 | Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Zea mays OX=4577 GN=103639134 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FN24 | Peroxiredoxin OS=Zea mays OX=4577 GN=100283392 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| P23345 | Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4A OS=Zea mays OX=4577 GN=SODCC.3 PE=2 SV=2 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 10. Proteínas de respuesta al estrés identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| C4J410 | Heat shock protein1 OS=Zea mays GN=ZEAMMB73_501274 PE=2 SV=1 - [C4J410_MAIZE] | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| K7VJF3 | Heat shock 70 kDa protein 5 OS=Zea mays OX=4577 GN=100272911 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Q2XX01 | Protease inhibitor OS=Zea mays subsp. parviglumis GN=mpi PE=4 SV=1 - [Q2XX01_ZEAMP] | Proteína predicha |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|

Tabla 11. Proteínas de membrana y extracelulares en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B6TZG5 | Fasciclin-like arabinogalactan protein 10 OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6SJS2 | Protein Z OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6UI56 | Oil body-associated protein 2B OS=Zea mays OX=4577 GN=OBAP2B PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 12. Proteínas involucradas en la síntesis de proteínas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B4FBD6 | Ribonuclease 1 OS=Zea mays OX=4577 GN=100192110 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6TQL6 | Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein OS=Zea mays OX=4577 GN=100281315 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 13. Proteínas no caracterizadas identificarlas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 5 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B6T9F2 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B8A0W7 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6UHT3 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 GN=100279102 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 14. Proteínas de defensa identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 5 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| B8QUU3 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| P29023 | Endochitinase B (Fragment) OS=Zea mays OX=4577 PE=1 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de proteína |

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| E1AFV5 | Beta-1,3-glucanase OS=Zea mays OX=4577 GN=glucA PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel transcripcional |
|--------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|

Tabla 15. Proteínas estructurales de los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 5 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|
| Q7M1Z8 | Globulin-2 OS=Zea mays PE=4 SV=1 - [Q7M1Z8_MAIZE] | Proteína predicha |

Tabla 16. Proteínas identificadas que participan en diferentes procesos metabólicos de los granos de maíz inoculados por la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 5 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B4FVH1 | Malate dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FZU8 | Malate dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 GN=100274264 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6SLL8 | Malate dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0PHR4 | Adenosylhomocysteinase OS=Zea mays OX=4577 GN=100282150 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0PK05 | Lactoylglutathione lyase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6T7A4 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6TZG5 | Fasciclin-like arabinogalactan protein 10 OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 17. Proteínas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 5 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Q2XX18 | Non-specific lipid-transfer protein (Fragment) OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=plt1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |
| B6THH6 | Prolyl carboxypeptidase like protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6SKJ7 | Early nodulin-like protein 3 OS=Zea mays OX=4577 GN=100280687 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| Q03865 | Vicilin-like embryo storage protein OS=Zea mays OX=4577 GN=Glb1-L PE=4 SV=1 | Proteína predicha |

Tabla 18. Amilasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8N482 | Glucosylase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_034950 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| Q7LV45 | Alpha-amylase OS= <i>Aspergillus flavus</i> OX=5059 GN=amy1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 19. Proteasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| <u>B8N106</u> | Alkaline protease 1 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=alp1 PE=1 SV=1 | Evidencia experimental de la proteína | 100% |
| B8NWE1 | Neutral protease 2 homolog AFLA_119780 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 | Proteína inferida por homología | 0% |
| <u>B8NC58</u> | Extracellular metalloproteinase mep OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=mep PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 20. Xilanasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NF60 | Alpha-xylosidase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_061040 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 0% |
| B8NJ86 | Probable endo-1,4-beta-xylanase B OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=xlnB PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 21. Enzimas accesorias identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NER2 | Alpha-L-arabinofuranosidase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_063490 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NTE9 | Glycosyl hydrolases family 32 superfamily OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_097890 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 22. Celulasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8N7G5 | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohidrolase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=cbhA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NID4 | Endoglucanase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_066300 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| <u>B8N9Q1</u> | Endoglucanase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_111970 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |

Tabla 23. Pectinasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NE46 | Probable pectate lyase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN SPFN =plyA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 24. Péptido hidrolasa identificada en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NJC1 | Peptide hydrolase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_065540 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 25. Proteínas y enzimas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8NLE2 | Catalase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_090690 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| C5H8J4 | SspA OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) OX=510516 GN=sspA PE=4 SV=1 | Proteína predicha | - |
| H6UZJ5 | Monoamine oxidase OS=Aspergillus flavus OX=5059 GN=maoA PE=4 SV=1 | Proteína predicha | - |

Tabla 26. Proteínas no caracterizadas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| B8NDD7 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_056980 PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8NJZ8 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_070470 PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| Q2UAM5 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) OX=510516 GN=AO090102000327 PE=4 SV=1 | Proteína predicha |

Tabla 27. Amilasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| Q7LV45 | Alpha-amylase OS= <i>Aspergillus flavus</i> OX=5059 GN=amy1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N482 | Glucosylase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_034950 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NX52 | Glucosylase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_122400 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N0S9 | Alpha-amylase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_026140 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 28. Proteasas no caracterizadas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NWE1 | Neutral protease 2 homolog AFLA_119780 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_119780 PE=3 SV=1 | Proteína con evidencia experimental | 0% |
| B8N106 | Alkaline protease 1 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=alp1 PE=1 SV=1 | Proteína con evidencia experimental | 100% |
| B8NUL2 | Carboxypeptidase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_100650 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NUE0 | Autophagic serine protease Alp2 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_099020 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N3P1 | Aspartic endopeptidase Pep2 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_031250 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NPM2 | Tripeptidyl peptidase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_000860 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NBM3 | Probable dipeptidyl-peptidase 5 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=dpp5 PE=3 SV=2 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NQR5 | Extracellular serine carboxypeptidase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_002090 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N9B4 | Aminopeptidase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_110600 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 0% |
| B8N5Q5 | Peptide hydrolase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_013980 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 80% |

| | | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------|
| B8NWI1 | Carboxypeptidase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_120180 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NCG4 | Peptide hydrolase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_038700 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 60% |

Tabla 29. Xilanasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NXJ2 | Probable endo-1,4-beta-xylanase F3 OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=xynF3 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción | 100% |
| B8NJ86 | Probable endo-1,4-beta-xylanase B OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=xlnB PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NIB9 | Beta-xylanase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_066150 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NER4 | Probable endo-1,4-beta-xylanase F1 OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=xynF1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N3L3 | Probable xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase A OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=xgeA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| A9JPE6 | Probable acetylxylan esterase A OS=Aspergillus flavus OX=5059 GN=axeA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 30. Enzimas accesorias identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NER2 | Alpha-L-arabinofuranosidase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_063490 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N637 | Arabinosidase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_016210 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N7Z6 | Probable feruloyl esterase C OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=faeC PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N6V7 | Probable beta-galactosidase A OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=lacA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 31. Celulasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8N7G5 | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=cbhA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NGX0 | Endoglucanase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_138380 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N9Q1 | Endoglucanase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_111970 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8MW97 | probable endo-beta-1,4-glucanase B OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NIV4 | Glucanase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_069820 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 32. Pectin liasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NE46 | Probable pectate lyase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=plyA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NVB7 | Probable pectin lyase D OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=peID PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NCU7 | Probable rhamnogalacturonate lyase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=rgIA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 33. Lipasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8MXI4 | Secretory lipase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_077710 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

| | | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------|
| B8NJC1 | Peptide hydrolase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_065540 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------|

Tabla 34. Fosfatasa identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NVT9 | Phytase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_117760 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NK66 | Extracellular phytase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_089400 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NQZ7 | Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_003810 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N5N1 | Acid phosphatase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_013740 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |

Tabla 35. Proteínas identificadas con diferentes actividades de *A. flavus* NRRL 6541 a los 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8MXV3 | Beta-hexosaminidase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_078900 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NVX6 | Muramidase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_119040 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NHG5 | Allergenic cerato-platanin Asp F13 OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_135700 PE=4 SV=1 | Proteína inferida por homología | 60% |
| Q8TG42 | Cell wall mannoprotein 1 OS=Aspergillus flavus OX=5059 GN=mp1 PE=2 SV=1 | Proteína con evidencia a nivel de transcripción | 100% |

| | | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------|
| B8MXL0 | Rieske 2Fe-2S family protein, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_077970 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |
| B8NC16 | Actin-bundling protein Sac6, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_047410 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |
| B8N417 | Probable mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase 1B OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=mns1B PE=3 SV=2 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NTV2 | Glutaminase GtaA OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_101230 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NQ44 | Phosphatidylserine decarboxylase family protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_004350 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 60% |
| B8N894 | Aldehyde reductase (AKR1), putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_106880 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NI10 | Beta-cyclopiasonate dehydrogenase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=cpaO PE=1 SV=1 | Proteína con evidencia experimental | 100% |
| B8NA16 | GPI-anchored cell wall organization protein Ecm33 OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_113120 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8MWN6 | Viral-enhancing factor, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_074940 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| C5H8J2 | SspA OS=Aspergillus flavus OX=5059 GN=sspA PE=4 SV=1 S | Proteína predicha | - |
| Q157Q9 | PLC-A OS=Aspergillus flavus OX=5059 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | - |

Tabla 36. Proteínas no caracterizadas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa no toxigénica *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con 10 días de incubación.

| Clave de identificación | Nombre de la proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer al secretoma |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| B8NVR8 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722) | Proteína predicha | 0% |

| | | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------|
| | / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_117550 PE=4 SV=1 | | |
| B8NVR7 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_117540 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |
| B8MX30 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_076170 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |
| B8NJZ8 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_070470 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NC41 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_038360 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8MX31 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_076180 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |
| B8NRW0 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_051020 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NTD5 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_097750 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 60% |
| B8NB11 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_043860 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NMV0 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_127130 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N729 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_019620 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NEH5 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_061730 PE=4 SV=1 pr | Proteína predicha | 60% |
| B8NDD7 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_056980 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |

Tabla 37. Proteínas no caracterizadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B4FRC6 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6TFN2 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6UHT3 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 GN=100279102 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FPM1 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4G0I7 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4G1C2 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0PE24 | Uncharacterized protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 38. Quitinasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| B8QUT5 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QV05 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiB PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QV28 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiB PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QUT1 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QUU3 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QUX0 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QUY0 | Chitinase OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=chiA PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| P29023 | Endochitinase B (Fragment) OS=Zea mays OX=4577 PE=1 SV=1 | Evidencia experimental |

Tabla 39. Proteínas de resistencia identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| E1AFV5 | Beta-1,3-glucanase OS=Zea mays OX=4577 GN=glucA PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción. |

Tabla 40. Proteínas transportadoras de lípidos de los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Q2XX18 | Non-specific lipid-transfer protein (Fragment) OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=plt1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |
| B8QW69 | Non-specific lipid-transfer protein (Fragment) OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=plt2 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |

Tabla 41. Proteínas de respuesta al daño o estrés de los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Q2XX01 | Protease inhibitor OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=mpi PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| B8QVR9 | Proteinase inhibitor OS=Zea mays subsp. parviglumis OX=76912 GN=mpi PE=4 SV=1 | Proteína predicha |
| C4J410 | Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays OX=4577 GN=100501536 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| K7VJF3 | Heat shock 70 kDa protein 5 OS=Zea mays OX=4577 GN=100272911 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología |

Tabla 42. Enzimas metabólicas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| B6UI15 | Subtilisin-chymotrypsin inhibitor Cl-1B OS=Zea mays OX=4577 GN=100286333 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| Q53CF4 | Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6THH6 | Prolyl carboxypeptidase like protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6TX01 | Glycoside hydrolase, family 28 OS=Zea mays OX=4577 GN=100284735 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6T440 | Adenosylhomocysteinase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FRJ1 | Malate dehydrogenase OS=Zea mays OX=4577 GN=100272900 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0PK05 | Lactoylglutathione lyase OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6SMV7 | Triosephosphate isomerase, cytosolic OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6SKJ7 | Early nodulin-like protein 3 OS=Zea mays OX=4577 GN=100280687 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FTK0 | Early nodulin-like protein 9 OS=Zea mays OX=4577 GN=100273206 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B6TZG5 | Fasciclin-like arabinogalactan protein 10 OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| O04288 | Endosperm specific protein OS=Zea mays OX=4577 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0P5Y3 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1 OS=Zea mays OX=4577 GN=541942 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| B4FQQ1 | Reactive Intermediate Deaminase A chloroplastic OS=Zea mays OX=4577 GN=100273379 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |
| C0PG78 | Monocopper oxidase-like protein SKU5 OS=Zea mays OX=4577 GN=100383470 PE=2 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de transcripción |

Tabla 43. Proteínas identificadas del hongo en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 3 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| G3YAV2 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus niger (strain ATCC 1015 / CBS 113.46 / FGSC A1144 / LSHB Ac4 / NCTC 3858a / NRRL 328 / USDA 3528.7) OX=380704 GN=ASPNIDRAFT_48047 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | - |
| B8NLY9 | Aspergillopepsin-1 OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL167) OX=332952 GN=pepA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 44. Amilasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8N482 | Glucoamilase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL167) OX=332952 GN=AFLA_034950 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N0S9 | Alpha-amylase OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL167) OX=332952 GN=AFLA_026140 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 45. Proteasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| B8NQJ3 | Vacuolar aspartyl aminopeptidase Lap4, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_006750 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 0% |
| B8NUL2 | Carboxypeptidase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_100650 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N106 | Alkaline protease 1 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=alp1 PE=1 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de proteína | 100% |
| B8N3P1 | Aspartic endopeptidase Pep2 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_031250 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NWE1 | Neutral protease 2 homolog AFLA_119780 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_119780 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 0% |
| B8NLY9 | Aspergillopepsin-1 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=pepA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NXS9 | Carboxypeptidase Y homolog A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=cpyA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NUE0 | Autophagic serine protease Alp2 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_099020 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 46. Xilanasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| Q96VB6 | Endo-1,4-beta-xylanase F3 OS= <i>Aspergillus oryzae</i> (strain ATCC 42149 / RIB 40) OX=510516 GN=xynF3 PE=1 SV=1 | Evidencia experimental a nivel de proteína | 100% |
| B8NER4 | Probable endo-1,4-beta-xylanase F1 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=xynF1 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 47. Enzimas accesorias identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8MVW0 | Arabinan-endo 1,5-alpha-L-arabinase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_073070 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N637 | Arabinosidase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_016210 PE=4 SV=1 | Proteína predictiva | 100% |
| B8NTE9 | Glycosyl hydrolases family 32 superfamily OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_097890 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 48. Celulasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8N9Q1 | Endoglucanase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_111970 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N7G5 | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=cbhA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NBF4 | Extracellular endoglucanase/cellulase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_045290 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 49. Pectin liasa identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8NVB7 | Probable pectin lyase D OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167) OX=332952 GN=peID PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 50. Enzimas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8N0T0 | Alpha-glucosidase AgdA, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_026150 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NHG5 | Allergenic cerato-platanin Asp F13 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_135700 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 60% |
| B8NRL4 | FAD/FMN-containing isoamyl alcohol oxidase MreA OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_049190 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N1C3 | FAD dependent oxidoreductase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_029880 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |
| B8NLE2 | Catalase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_090690 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N7P5 | Glycosyl hydrolase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_104880 PE=4 SV=1 | Proteína predictiva | 100% |

Tabla 51. Proteínas no caracterizadas identificadas en los granos de maíz inoculados por la de la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 7 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8NMV0 | Uncharacterized protein OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_127130 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N729 | Uncharacterized protein OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_019620 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NQS3 | Uncharacterized protein OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_002170 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 60% |
| B8NC41 | Uncharacterized protein OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) OX=332952 GN=AFLA_038360 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |

Tabla 52. Amilasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8N482 | Glucoamilase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_034950 PE=4 SV=1 | Proteína predictiva | 100% |
| B8N0S9 | Alpha-amylase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_026140 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 53. Proteasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| B8N106 | Alkaline protease 1 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=alp1 PE=1 SV=1 | Proteína con evidencia experimental | 100% |
| B8NQJ3 | Vacuolar aspartyl aminopeptidase Lap4, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_006750 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 0% |
| B8NWE1 | Neutral protease 2 homolog AFLA_119780 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_119780 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 0% |
| B8N3P1 | Aspartic endopeptidase Pep2 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_031250 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NPM2 | Tripeptidyl peptidase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_000860 PE=4 SV=1 | Proteína predictiva | 100% |
| B8N5Q5 | Peptide hydrolase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_013980 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 80% |

Tabla 54. Xilanasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8NIB9 | Beta-xylanase OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_066150 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 55. Enzimas accesorias identificadas en los granos de maíz inoculados por la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8NMD3 | Probable arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase C OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=abnC PE=3 SV=2 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8MVW0 | Arabinan-endo 1,5-alpha-L-arabinase, putative OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_073070 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N6V7 | Probable beta-galactosidase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=lacA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8N7Z6 | Probable feruloyl esterase C OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=faeC PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NTE9 | Glycosyl hydrolases family 32 superfamily OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_097890 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 56. Celulasas identificadas en los granos de maíz inoculados por la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8N7G5 | Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=cbhA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8NRX2 | Probable beta-glucosidase A OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=bglA PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 57. Enzimas identificadas en los granos de maíz inoculados por la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8NT56 | GPI-anchored cell wall beta-1,3-endoglucanase EglC OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_053390 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 80% |
| B8NIY9 | Lysosomal alpha-glucosidase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_070170 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |
| B8MZM4 | Extracellular thaumatin domain protein, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_085140 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NIM1 | Cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_068080 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8N1C3 | FAD dependent oxidoreductase, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_029880 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 0% |
| B8NHG5 | Allergenic cerato-platanin Asp F13 OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_135700 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 60% |
| B8N0T0 | Alpha-glucosidase AgdA, putative OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_026150 PE=3 SV=1 | Proteína inferida por homología | 100% |

Tabla 58. Proteínas no caracterizadas identificadas en los granos de maíz inoculados por la cepa toxigénica *Aspergillus flavus* CECT 2687 con 10 días de incubación.

| Clave de la Proteína | Nombre de la Proteína | Estado de la proteína en UniProtKB | Probabilidad de pertenecer a Secretoma |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| B8N729 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_019620 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NMV0 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_127130 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 100% |
| B8NQS3 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_002170 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 60% |
| I8IAJ5 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus oryzae (strain 3.042) OX=1160506 GN=Ao3042_09516 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | - |
| B8NEH5 | Uncharacterized protein OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRRC 167) OX=332952 GN=AFLA_061730 PE=4 SV=1 | Proteína predicha | 60% |