



Revista de la Sociedad Venezolana de
Microbiología
ISSN: 1317-973X
vrodriguelemoine@gmail.com
Sociedad Venezolana de Microbiología
Venezuela

Garboza, Fátima; Frontado, Ronald; Noguera, Nirza; Ávila, Horacio; Ojeda, Luis; Ramírez, Ninoska;
Triana, Juana; Triana, Francisco

Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su
efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*

Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 31, núm. 2, julio-diciembre, 2011, pp. 138-
143

Sociedad Venezolana de Microbiología
Caracas, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199422818010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Artículo original

Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*

Fátima Garboza, Ronald Frontado, Nirza Noguera*, Horacio Ávila, Luis Ojeda, Ninoska Ramírez, Juana Triana, Francisco Triana (†)

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo (BIOMED-UC). Venezuela.

Recibido 15 de mayo de 2011; aceptado 26 de septiembre de 2011

Resumen: La búsqueda de fuentes nutricionales alternativas, para el cultivo masivo de microorganismos, ha sido una práctica común en el área de la microbiología industrial. Sin embargo, no en todos los casos es factible hacer estas sustituciones, ya que la presencia o ausencia de ciertos nutrientes puede condicionar el crecimiento celular, así como la expresión de algunos metabolitos. En la presente investigación se formularon una serie de medios a base de hidrolizado de caseína y extracto del micelio de *Aspergillus niger*, para sustituir los componentes del medio Luria-Bertani (LB) en el cultivo de una cepa de *Escherichia coli* mejorada genéticamente. Se evaluó la calidad de los medios siguiendo el crecimiento bacteriano, comparando los parámetros cinéticos y analizando el perfil electroforético de las proteínas y ácidos nucléicos celulares totales, recuperados de los paquetes celulares al final de los cultivos. Se encontró que el medio formulado con 75% de hidrolizado de caseína y 75% de extracto del hongo, favorece el crecimiento celular y la expresión genética de igual manera que el medio LB. El perfil de proteínas celulares varía significativamente si se utiliza una proporción menor, indicando un límite en la reducción de componentes nutritivos del medio alternativo.

Palabras clave: caseína, extracto de *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*.

Use of alternative media based on casein hidrolyzates and *Aspergillus niger* extract and their effect over the genetic expression of an *Escherichia coli* strain

Abstract: The search for alternative nutritional sources for mass microorganism cultures has been a common practice in the area of industrial microbiology. Nevertheless, it is not possible to use these substitutes in all cases since the presence or absence of certain nutrients can condition cellular growth, as well as the expression of certain metabolites. In the present investigation several media were formulated based on casein hidrolyzate and *Aspergillus niger* mycelium extract to substitute the components of Luria-Bertani (LB) medium, for culturing a genetically improved *Escherichia coli* strain. The quality of the media was evaluated by following bacterial growth, comparing the kinetic parameters and analyzing the protein electrophoretic profile and total cell nucleic acids recovered from the cell packages of final cultures. It was found that the medium formulated with 75% casein hidrolyzate and 75% fungus extract favors cell growth and genetic expression in a similar fashion to LB medium. The cell protein profile varies significantly if a smaller proportion is used, indicating a limit in the reduction of nutritive components of the alternative medium.

Keywords: casein, *Aspergillus niger* extract, *Escherichia coli*.

* Correspondencia:
E-mail: nirzacruz@hotmail.com

Introducción

El medio Luria-Bertani (LB), es uno de los más usados para el cultivo de *Escherichia coli* y de otras especies bacterianas, debido a que es rico en nutrientes, de fácil elaboración y permite el crecimiento de una gran variedad de cepas. Está constituido por tres componentes, de los cuales uno es mineral, el NaCl, y dos son orgánicos: la triptona (o

peptona) y el extracto de levadura [1-3].

La triptona es el producto de la digestión de la caseína proveniente de la leche con enzimas pancreáticas. Es un sustrato oneroso y puede representar más del 65% del costo de los materiales usados para la elaboración de este medio. Por ello, en muchas investigaciones, se ha planteado la sustitución de esta fuente nutricional con hidrolizados provenientes de otros orígenes [4,5]. Estas sustituciones

pueden ser factibles, debido a que las triptonas comerciales aportan básicamente péptidos pequeños y aminoácidos libres, solubles en agua y no coagulables por efecto del calor [5]. El extracto de levadura es el producto de la digestión de *Saccharomyces cerevisiae* [3] y su costo es significativamente menor al de la triptona, puesto que en general, es un subproducto generado de otros procesos productivos. En consecuencia, no es común encontrar investigaciones en las que este componente sea sustituido por fuentes nutricionales alternativas. Estos constituyentes son comercializados en polvos deshidratados y sus costos varían de acuerdo a la casa comercial que los elabora [3].

En Venezuela, la adquisición de este tipo de productos importados, se dificulta debido al control cambiario y los problemas de importación existentes. Por ello, en la presente investigación se planteó formular un medio similar al LB, utilizando sustratos orgánicos más económicos y disponibles en el país. Se decidió sustituir la triptona comercial por un hidrolizado de caseína elaborado a partir de leche descremada comercial, y sustituir el extracto de levadura por un extracto del micelio del hongo *Aspergillus niger*. Se seleccionó este hongo porque está considerado, tanto el hongo como sus metabolitos, como un microorganismo seguro para el consumo humano y animal [lista GRAS (Generally Recognized as Safe, generalmente reconocido como seguro) de la US FDA (United States Food and Drug Administration)]. Sus metabolitos tienen una gran variedad de aplicaciones a nivel industrial para la producción de enzimas propias y foráneas, dada su capacidad de exportación y de llevar a cabo los procesos de modificación post-transduccional, como la glucosilación [6,7]. Esto trae consigo la generación de una gran cantidad de biomasa como subproducto de desecho, la cual es rica en elementos químicos y biológicos, y que ha sido utilizada para la elaboración de alimentos para animales [8] y la producción de biopelículas [7].

Materiales y métodos

Microorganismos: (1) Se utilizó la bacteria *E. coli*, cepa DH5- α transformada con el plásmido pTZDec-m [9], que confiere resistencia a la ampicilina. Para reactivar las células congeladas, se realizó un pre-inóculo en medio líquido Luria-Bertani (LB: triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% y NaOH para neutralizar el pH), bajo agitación continua (250 rpm), a 37 °C durante 12 h, en presencia de ampicilina a una concentración final de 100 mg/mL [10]. (2) Se trabajó con una cepa silvestre inocua de *A. niger*, aislada y caracterizada por el Departamento de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo - Sede Aragua. El micelio se obtuvo a partir de cultivos realizados a mediana escala (2 L), destinados a la producción de glucosa oxidasa [11,12], esto con el fin de acoplar los procesos productivos de ambos microorganismos. El micelio fue sometido a lavado, pesado y almacenado a -80 °C hasta su uso.

Preparación del hidrolizado de caseína: La caseína fue aislada a partir de leche líquida descremada, por calentamiento a 50 °C bajo agitación continua y agregando ácido acético al 10% en una relación 1:10 con respecto al volumen de leche usado, para facilitar la precipitación [13]. La mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos a 4 °C y luego se sometió a centrifugación a 5.000 rpm (rotor JA-10 Beckman) durante 10 minutos a temperatura ambiente, a fin de separar la caseína del sobrenadante. El precipitado fue sometido a lavados sucesivos con agua y etanol al 70 y 100%, para garantizar la eliminación completa de lactosa y favorecer el secado, el cual se hizo en estufa a 37 °C durante 48 horas.

Para la hidrólisis, la caseína obtenida fue sometida a trituración y disuelta en una solución de buffer fosfato a pH 8,0 (KH_2PO_4 150 mM) y NaOH (0,1 N), a razón de 12,5 g de caseína en 10 mL de solución. El extracto enzimático usado se obtuvo a partir de un medicamento comercial (Pankreón ©), rico en enzimas digestivas [14], y se incorporó a razón de 16 µg/mL de solución. Se incubó la solución a 37 °C durante 24 horas para garantizar el proceso de hidrólisis, el cual fue monitoreado tomando muestras de 100 µL de la solución cada 30 minutos durante las primeras 6 horas de incubación y luego cada 6 horas hasta el final del proceso. El hidrolizado obtenido fue caracterizado de acuerdo con sus propiedades ópticas a 230, 260 y 280 nm [15], y el grado de hidrólisis fue determinado por precipitación con ácido tricloroacético al 10% (TCA 10%) y electroforesis en geles de acrilamida [16].

Preparación del extracto de *Aspergillus niger*: El micelio fue sometido a trituración mecánica con un homogenizador de hojas giratorias durante 5 minutos, utilizando arena estéril como agente abrasivo con adición de agua en una proporción 3:1 (v/p). La suspensión obtenida se incubó a 60 °C por 1 hora y seguidamente se separó la fase líquida por filtración y prensado [17]. Al igual que en el caso del hidrolizado de caseína, se evaluaron las características espectroscópicas del material midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm, y se calcularon los índices: 260/280; 230/280 y 230/260 [15]. Un análisis similar se realizó con una solución del extracto de levadura (5 g/L), con el fin de establecer comparaciones respecto a la composición química general de los materiales, asociada principalmente al contenido y a la naturaleza del nitrógeno en solución [3,15].

Formulación de los medios de cultivo: Se preparó un medio de cultivo LB estándar, utilizando 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 1 mL de NaOH (1N), disueltos en agua destilada hasta un volumen final de 1 L.

Para formular los medios alternativos, previamente se caracterizaron las soluciones de triptona comercial (10 g/L) y del extracto de levadura (5 g/L) en el espectro UV 230, 260 y 280 nm. Tomando como base esta información, se calculó el aporte que estas soluciones proporcionan al medio de cultivo en unidades de densidades ópticas (DO), específicamente DO₂₈₀ de la triptona y DO₂₆₀ del extracto de

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo formulados en esta investigación.

MEDIO	COMPOSICIÓN
Medios de Sustitución Parcial	
100% HC	Hidrolizado de caseína al 100%, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L
75% HC	Hidrolizado de caseína al 75%, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L
50%HC	Hidrolizado de caseína al 50%, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L
25%HC	Hidrolizado de caseína al 25%, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L
100% EA	Triptona 10 g/L, extracto <i>A. niger</i> 100% y NaCl 10 g/L
75% EA	Triptona 10 g/L, extracto <i>A. niger</i> 75% y NaCl 10 g/L
50% EA	Triptona 10 g/L, extracto <i>A. niger</i> 50% y NaCl 10 g/L
25% EA	Triptona 10 g/L, extracto <i>A. niger</i> 25% y NaCl 10 g/L
Medios de Sustitución Total	
75% HC-75% EA	Hidrolizado de caseína al 75%, extracto de <i>A. niger</i> 75% y NaCl 10 g/L
50% HC-75% EA	Hidrolizado de caseína al 50%, extracto de <i>A. niger</i> 75% y NaCl 10 g/L

levaduras, y en función de éstas se determinó el volumen a utilizar del hidrolizado y del extracto de micelio, para formular los medios. Se formularon un total de 10 tipos de medios de cultivo (Tabla 1). Los porcentajes indicados para el hidrolizado de caseína (HC) y el extracto de *A. niger* (EA) corresponden a la proporción de unidades de densidad óptica (a 280 nm para HC y a 260 nm para EA) agregadas en cada caso, tomando como base las incorporadas en el medio LB estándar por la triptona y el extracto de levadura, respectivamente.

Cultivos: Las células de *E. coli* cepa DH5 α fueron cultivadas a 37 °C bajo agitación continua a 200 rpm en presencia de oxígeno, en fioles con capacidad de 125 ml que contenían 25 ml de medio de cultivo estéril (LB o los alternativos en prueba) y en presencia de ampicilina a razón de 50 μ g/mL. La inoculación se hizo a partir de un pie de inoculo, ajustado a una densidad óptica inicial de 600 nm a 0,05 OD/mL. El crecimiento celular fue monitoreado mediante la medición de la densidad óptica del caldo de cultivo a 600 nm (DO₆₀₀) cada 30 minutos, hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente a las 5 ó 6 horas), utilizando un espectrofotómetro Beckman Du 650. Se establecieron las curvas de crecimiento, calculándose las velocidades de crecimiento (μ) y los tiempos de generación de los cultivos (TG). Al final del proceso, las células se recuperaron mediante centrifugación a 5.000 rpm (rotor JA-20 Beckman) por 30 minutos a 4 °C.

Los cultivos de *E. coli* se realizaron primero con medios de cultivo de sustitución parcial de componentes (un componente orgánico del medio LB estándar) y luego se realizaron con medios de cultivo con sustitución total de ambos componentes. Todos los experimentos se realizaron con un diseño experimental de bloque al azar con 3 repeticiones por cada tipo de medio de cultivo (ver análisis

estadístico).

Análisis electroforético de proteínas y ácidos nucléicos: Los paquetes celulares recuperados se sometieron a un proceso de extracción de proteínas y ácidos nucléicos celulares, para evaluar si los medios alternativos utilizados tuvieron algún efecto sobre la expresión genética de estas células y/o sobre la replicación del plásmido presente en las mismas. Para ello, las células fueron lavadas y resuspendidas en un buffer tris-salino isotónico (NaCl 0,85%; Tris 50 mM, pH 7,5) y luego fueron centrifugadas para resuspenderlas en SDS (Docecil Sulfato de Sodio) al 2%; esta mezcla posteriormente se incubó a 96 °C por 10 minutos para liberar las proteínas celulares [18]. La concentración de proteínas disueltas se determinó mediante el método de Lowry [19]. Se tomaron muestras de 30 μ g de proteínas para someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes [20] y el perfil electroforético se reveló por tinción con azul de Coomassie. El plásmido presente en las muestras de células cultivadas fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% [18]. La cantidad de muestra usada correspondió al volumen contentivo de 30 μ g de proteína y la tinción se realizó con bromuro de etidio.

Análisis estadístico: Se utilizó un diseño de bloques al azar ajustado al siguiente modelo: $y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$, donde:

y_{ij} : representa el valor de la variable respuesta en el j-ésimo bloque del i-ésimo tratamiento (medio de cultivo).

μ : es la media global para la variable en estudio (DO₆₀₀, μ ó TG).

τ_i : es el efecto o desviaciones sobre el valor de la variable respuesta debidas al i-ésimo tratamiento (medio de cultivo)

β_j : es el efecto o desviaciones sobre el valor de la variable respuesta debidas al j-ésimo bloque, es decir, efecto del

ensayo o repetición.

ε_{ij} : error aleatorio.

El análisis estadístico fue del tipo no paramétrico, debido a que el crecimiento bacteriano no cumplió con los supuestos del análisis de varianza. Se utilizó el método de Kruskall-Wallis para la evaluación de las variaciones por rango en el caso de los diseños completamente al azar, y el método de Friedman para los diseños en bloque. Las comparaciones de media también se realizaron por la vía no paramétrica [21].

Resultados y discusión

Crecimiento celular: Las curvas de crecimiento obtenidas en los ensayos con los medios de sustitución parcial, donde se graficaron las unidades de DO_{600} en función del tiempo (figuras no mostradas), exhibieron un comportamiento típico sigmoidal, con un modelo de ajuste cúbico ($r^2=0,99$). A partir de éstas, se calcularon características cinéticas importantes tales como la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial del cultivo (entre 120 y 180 minutos), el tiempo de generación mínimo y el rendimiento final en unidades de DO_{600}/mL (Tabla 2). De estos resultados se pudo destacar que las células crecidas en los medios de sustitución parcial con hidrolizado de caseína (HC), mostraron valores estadísticamente similares a los obtenidos a partir de las células crecidas en el medio LB ($p>0,05$), con rendimientos finales promedios superiores en el caso de los medios con 75% HC y 50% HC ($1,4 \pm 0,2$ unidades DO_{600}/mL). Estos resultados eran de esperarse, dado el efecto positivo que tienen la presencia de péptidos pequeños y aminoácidos libres sobre la cinética del crecimiento de *E. coli* [4]. En el caso de los medios de sustitución parcial con extracto de *A. niger* (EA), se encontró que el medio con 25% EA no favoreció el crecimiento celular de la misma manera que el medio LB ($p>0,05$), arrojando velocidades de crecimiento bajas y una DO_{600}/mL al final del cultivo inferior a 1. Los demás cultivos exhibieron una cinética de crecimiento similar al medio LB.

Tabla 2. Caracterización del crecimiento de la bacteria *E. coli*, cepa DH5- α transformada con el plásmido pTZDec-m en el medio LB y en los medios de sustitución parcial formulados en esta investigación.

Medio	Velocidad de crecimiento específica entre 120 y 280 min (DO_{600}/min)	TG mínimo (min) [tiempo generación mínimo]	DO_{600}/mL al final del cultivo
100% HC	$0,0048 \pm 0,0002$	30 ± 2	$1,1 \pm 0,2$
75% HC	$0,0045 \pm 0,0003$	29 ± 2	$1,4 \pm 0,2$
50% HC	$0,0046 \pm 0,0002$	29 ± 2	$1,4 \pm 0,2$
25% HC	$0,0038 \pm 0,0003$	34 ± 3	$1,2 \pm 0,3$
100% EA	$0,0047 \pm 0,0003$	24 ± 2	$1,2 \pm 0,2$
75% EA	$0,0050 \pm 0,0002$	29 ± 3	$1,1 \pm 0,2$
50% EA	$0,0040 \pm 0,0003$	35 ± 2	$0,8 \pm 0,1$
25% EA	$0,0030 \pm 0,0003^*$	$47 \pm 3^*$	$0,6 \pm 0,2^*$
LB	$0,0046 \pm 0,0003$	28 ± 2	$1,2 \pm 0,2$

*Diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) con respecto al medio control.

En función de estos resultados, se escogieron los que tuvieron mejores respuestas en la sustitución parcial (75% HC, 50% HC y 75% EA) y se establecieron las siguientes formulaciones para la sustitución total: 75% HC-75% EA, 50% HC-75% EA. En todos los casos se encontró un comportamiento cinético similar al exhibido en el medio LB (resultados no mostrados). En consecuencia, se escogieron los medios formulados a partir de una menor concentración de sustratos 75% HC-75% EA y 50% HC-75% EA, para realizar los cultivos preparativos para la extracción de las proteínas y ácidos nucleicos, con la intención de maximizar el uso de los materiales propuestos.

Análisis de las proteínas y ácidos nucleicos de las células cultivadas: El análisis electroforético del contenido proteico celular, de las células recuperadas de los medios alternativos, permitió evidenciar un patrón aparentemente similar al obtenido en las recuperadas en el medio LB, en cuanto a los polipéptidos visibles. Sin embargo, se destacaron unas regiones (A, B y C), donde se observaron algunas diferencias entre el patrón de células cultivadas con el medio 50% HC-75% EA y el perfil de las cultivadas en los otros medios (Figura 1).

Por tal motivo, se realizó un densitograma de los perfiles correspondientes a los carriles 2, 3 y 4 de la figura 1, y se confirmó que las proteínas de las bacterias crecidas en el medio 50% HC-75% EA tenían modificaciones significativas en las regiones marcadas, indicativo de que ocurrió una variación de la expresión genética (Figura 2A). En la región A se evidenció la ausencia una banda polipeptídica de 46 kDa y en las regiones B y C se observó disminución de las bandas correspondientes a 34 y 24 kDa, respectivamente.

En el caso de las proteínas recuperadas a partir de células crecidas en 75% HC-75% EA, estas mostraron un patrón muy similar al obtenido a partir del medio LB (Figura 2B), con tan sólo un incremento de la intensidad en péptidos de 15 kDa. Esto se puede atribuir a la disminución del aporte nutricional con esta menor proporción del hidrolizado. En

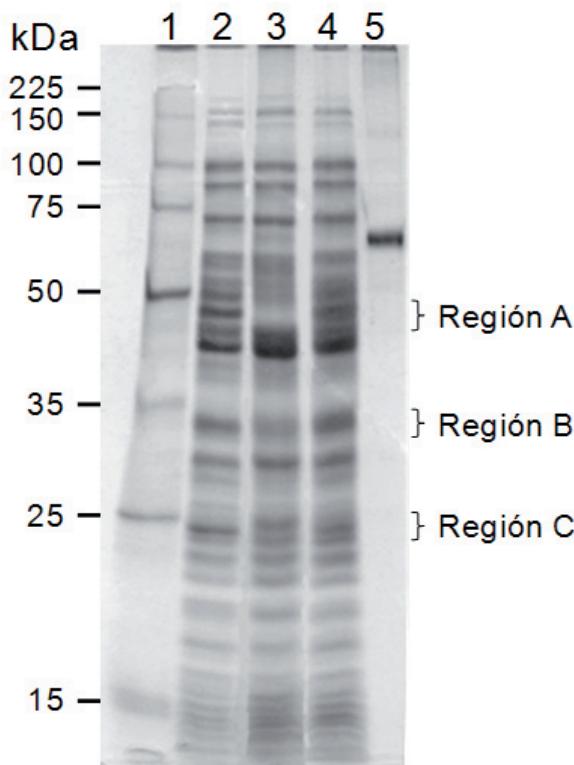


Figura 1. Análisis electroforético de las proteínas celulares en muestras tomadas en la fase estacionaria de cultivos en medio LB estándar y medios alternativos. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: medio LB estándar. Carril 3: medio 50% HC-75% EA. Carril 4: medio 75% HC-75% EA. Carril 5: control de albúmina.

consecuencia, se deduce que la proporción de hidrolizado, que asegura el aporte de péptidos pequeños y aminoácidos libres suficientes para satisfacer los requerimientos nutricionales de las células procariotas, debe ser de 75% o más.

Al realizar el aislamiento del plásmido, se evidenció que los medios de sustitución probados mantienen la viabilidad del plásmido en el cultivo, ya que se observó un patrón de corrida similar al del medio LB estándar (Figura 3). Sin embargo, es notable que el plásmido recuperado a partir de las células cultivadas en el medio 50% HC-75% EA, exhibió una menor intensidad en las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos (16S y 23S). Esto puede indicar una mayor degradación de material intracelular por una respuesta de “estrés” por falta de nutrientes.

Se conoce que durante la fase exponencial de crecimiento, ocurren cambios rápidos y continuos de la expresión genética de las células microbianas. Durante estos cambios, la presencia o ausencia de ciertos nutrientes determina el éxito de la producción de los metabolitos de interés [22]. Este aspecto es muy importante cuando se trabaja con bacterias recombinantes, ya que se debe garantizar que el medio satisfaga todas las demandas nutricionales y permita la expresión de los productos de interés, en proporciones iguales o superiores a las que se logran con un medio estándar de referencia, tal como lo lograron otros investigadores, al

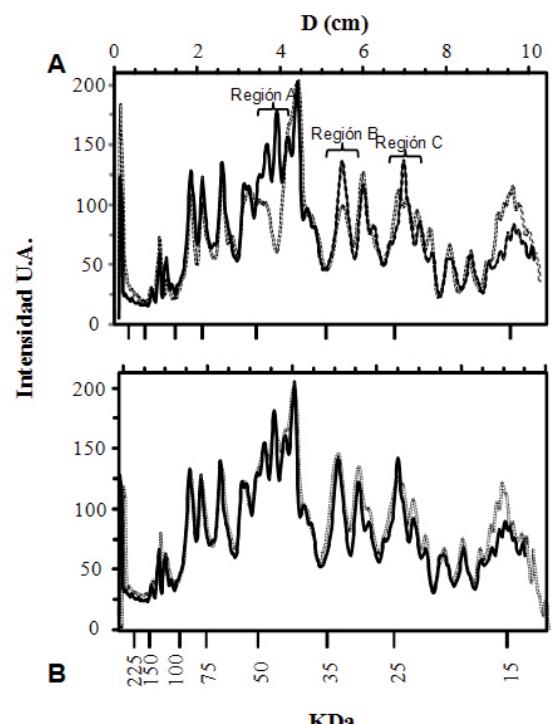


Figura 2. Análisis densitométrico. (A) Comparación de los densitogramas correspondientes a las proteínas celulares de *E. coli* crecidas en el medio LB estándar (línea negra) y medio 50% HC-75% EA (línea punteada). (B) Comparación de los densitogramas correspondientes a las proteínas celulares de *E. coli* crecida en el medio LB estándar (línea negra) y medio 75% HC-75% EA (línea punteada).

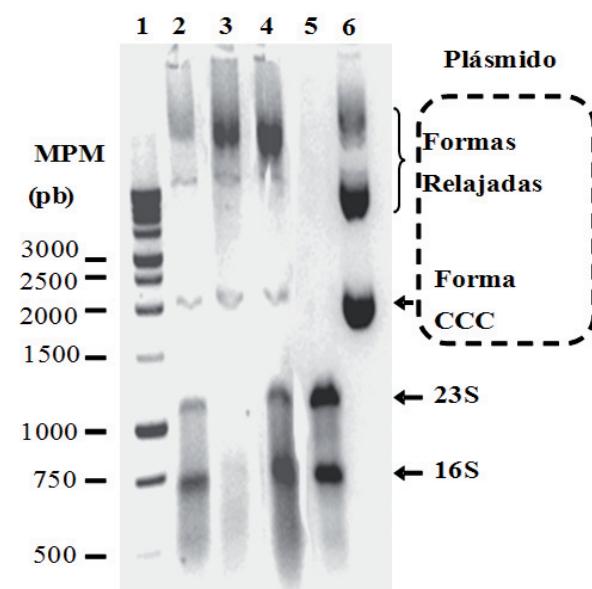


Figura 3. Gel de agarosa con preparaciones de plásmidos provenientes de *E. coli* cepa DH5- α transformada con el plásmido pTZDec-m cultivadas en medio LB estándar y medios alternativos. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: plásmido proveniente de bacterias cultivadas en medio LB estándar. Carril 3: plásmido proveniente de bacterias cultivadas en medio 50% HC-75% EA. Carril 4: plásmido proveniente de bacterias cultivadas en medio de 75% HC-75% EA. Carril 5: ARN ribosomal (70S) de *E. coli*. Carril 6: plásmido purificado de pTZDec-m.

producir plásmidos en diferentes medios de cultivo [23].

Los resultados de este estudio indican que los sustratos seleccionados, hidrolizado de caseína y el extracto de *A. niger*, como sustituyentes de la triptona comercial y extracto de levadura, favorecen el crecimiento celular y no afectan la expresión de proteínas de la bacteria, siempre y cuando se incorporen en las proporciones adecuadas. La formulación que arrojó los mejores resultados fue el medio 75% HC-75% EA.

Referencias

1. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1951; 62:293-300.
2. Luria S, Burrous J. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Bacteriol*. 1957; 74:461-76.
3. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*. 2007; 189:8746-9.
4. De la Broise D, Dauer G, Gildber A, Guerard F. Evidence of positive effect of peptone hydrolysis rate on *Escherichia coli* culture kinetics. *J Mar Biotech*. 1988; 6:111-5.
5. Kurbanoglu E, Kurbanoglu N. A new process for the utilization as peptone of ram horn waste. *J Biosci Bioeng*. 2002; 94:202-4.
6. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; 59:426-35.
7. Villena G, Gutiérrez M. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulosa: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev Peru Biol*. 2003; 10:78-87.
8. Méndez R, Guerrero B, De Jesús R, O'Callaghan J. Estudio preliminar del *Aspergillus niger* como componente del pienso para ratas de laboratorio. *Agroalimentación y Desarrollo Sustentable* 2004; 5:1-6.
9. Triana-Alonso F, Dabrowski M, Wadzack J, Nierhaus KH. Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase. *J Biol Chem*. 1995; 270:6298-307.
10. Prescott L, Harley J, Klein D. *Microbiología*. 4ta ed. España: Editorial Mc Graw-Hill; 2003.
11. Zoghbi N, Ojeda L, Noguera N, Yépez A, Camargo H, Triana-Alonso F. Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos producida en medios a base de fertilizantes y azúcar industrial. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2008; 28:31-7.
12. Mirón J, Vázquez J, González M, Murado M. Joint effect of nitrogen and phosphorous on glucose oxidase production by *Aspergillus niger*: discussion of an experimental design with a risk of co-linearity. *Biochem Engineer J*. 2008; 40:54-63.
13. Viana J, Fernández A, Iglesias A, Sánchez L, Becerra J. Análisis de los genotipos más frecuentes de la K-caseína en la raza vacuna rubia galega mediante PCR/RFLPs. *Archiv Zootec*. 2001; 50:91-6.
14. Guadix A, Guadix E, Páez M, González P, Camacho F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharm*. 2002; 41:79-89.
15. Pons M, Le Bont'e S, Potier O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedia characterization. *J Biotech*. 2004; 113:211-30.
16. Gandolfo B, Peralta M. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamari*. *J Basic Microbiol*. 2000; 40:75-80.
17. Noguera N, Triana-Alonso F. Extracto del micelio de *A. niger* como sustrato alternativo para el crecimiento de bacterias. *Memorias del VI Congreso de Investigación UC* 2008, Tomo I: 432-437.
18. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3era ed. Capítulo 1. Estados Unidos. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-75.
20. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
21. Chacín F. *Diseño y análisis de experimentos*. Maracay: Ediciones y Publicaciones Vicerrectorado Académico UCV; 2000.
22. Murray H, Schneider D, Gourse G. Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. *Mol Cell*. 2003; 12:125-34.
23. Danquah M, Forde G. Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *J Bioscienc*. 2007; 104:490-7.