

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**"OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE PRODUCCIÓN DE
CELULASAS NEUTROALCALINAS PARA *Aspergillus fumigatus*
MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE
RESPUESTA"**

Presentada por:

BRANDON AXL GÁRATE REYES

Tesis para Optar el Título de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS
"OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE PRODUCCIÓN DE
CELULASAS NEUTROALCALINAS PARA *Aspergillus fumigatus*
MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE
RESPUESTA"

Presentada por:

BRANDON AXL GÁRATE REYES

Tesis para Optar el Título de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada ante el siguiente Jurado:

Dr. Víctor Meza Contreras
Presidente

Dra. Doris Zuñiga Dávila
Miembro

Dra. Carmen Velezmoro Sánchez
Miembro

Ph. D. Gretty K. Villena Chávez
Asesora

Ph. D. Ilanit Samolski Klein
Co-Asesora

La presente tesis fue financiada por FONDECYT- CONCYTEC a través
del CONVENIO DE SUBVENCIÓN N° 181-2015-FONDECYT

DEDICATORIA

Dedico la presente investigación a mi madre Cristina, por su apoyo incondicional a lo largo de este tiempo; a mi padre Pedro, por su confianza y consejos de siempre y a mis dos hermanos Bruno y Ziany por sus ocurrencias y alegrías.

AGRADECIMIENTO

- A mis asesoras, Dra. Gretty Katherina Villena Chávez y Dra. Ilanit Samolski Klein; por su constante evaluación, confianza y esmero en hacer posible la presente investigación; gracias por la paciencia y conocimientos compartidos.
- A Teresa Damaris Rebaza Cárdenas, por acompañarme no sólo en toda la etapa universitaria, sino también a lo largo de este trabajo y por los buenos momentos, muchos éxitos.
- A Yvette Ludeña Hinojosa, por todas las grandes enseñanzas, la confianza, el tiempo y el carisma de siempre.
- A David Romero Suarez, por ser un gran amigo, mentor y extender su mano en todo momento.
- A Mary Pasmíño, por su gran alegría, paciencia, optimismo y ser mi segunda madre en el laboratorio.
- A la memoria del Dr. Marcel Gutiérrez Correa, gran maestro, hombre de ciencia y fuente de inspiración, muchas gracias por su gran legado.
- A FONDECYT - CONCYTEC por permitir que la posible investigación haya sido llevada a cabo como parte del proyecto "Secuenciamiento del transcriptoma de la cepa nativa *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa y mutantes mejorados para la producción de celulasas neutroalcalinas", a través del convenio de subvención No 181-2015-FONDECYT.
- A Jhonathan S. Benites Pariente y Rocío M., por los consejos y la disponibilidad de siempre sea cual fuere la situación.
- A José Solimano, Alonso Reyes, Luis Cuadros, Joel Cisneros y Antony Barrientos por ser buenos amigos, por escucharme, ayudarme y aportar con la presente investigación.
- A mis compañeros del Laboratorio de Micología y Biotecnología - "Marcel Gutiérrez-Correa", por la amistad, las risas y todo el tiempo compartido a lo largo de los años que pertencí a esta gran familia.
- A mi familia: abuelos, tíos, primos.
- Al Dr. Víctor Meza Contreras, Dra. Doris Zúñiga y Dra. Carmen Velezmoro por sus consejos, paciencia y recomendaciones en hacer posible esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. CELULOSA	3
2.2. ENZIMAS	3
2.3. CELULASAS	4
2.4. <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
2.5. CULTIVO SUMERGIDO.....	7
2.6. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	8
2.6.1. Diseño de cribado - Plackett Burman	8
2.6.2. Metodología de superficies de respuesta - Diseño Box Behnken.....	10
2.7. PCR EN TIEMPO REAL.....	14
2.7.1. Colorantes de unión a ADN (SYBR Green I)	16
2.7.2. Análisis de expresión de genes mediante cuantificación relativa.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	18
3.2. EQUIPOS	18
3.3. MATERIALES.....	19
3.4. REACTIVOS.....	20
3.5. CEPA UTILIZADA	21
3.6. MEDIOS DE CULTIVO.....	21
3.7. CONDICIONES DE CULTIVO	21
3.7.1. Cultivo sumergido	21
3.8. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	22
3.8.1. Determinación de la Actividad Enzimática	22
3.8.2. Diseño experimental	22
3.8.3. Validación del modelo.....	26
3.8.4. Análisis de expresión de genes de endoglucanasas	27
3.8.5. Extracción de ARN.....	27
3.8.6. Síntesis de ADN copia.....	27

3.8.7. PCR en tiempo real (qPCR).....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1. DISEÑO DE CRIBADO - DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT- BURMAN	29
4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA VARIABLE RESPUESTA - DISEÑO BOX BEHNKEN.....	34
4.3. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	37
4.4. VALIDACIÓN DEL MODELO PREDICTIVO	42
4.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE ENDOGLUCANASAS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	44
V. CONCLUSIONES	50
VI. RECOMENDACIONES	52
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
VIII. ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores de los niveles usados para cada factor evaluado en el diseño Plackett-Burman para la optimización de un medio de cultivo de producción de endoglucanasas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa.	23
Tabla 2: Arreglo aleatorio del diseño Plackett-Burman para el cribado en función de los niveles (concentración de los componentes del medio de cultivo) para cada factor, considerando la actividad enzimática como variable respuesta de la producción endoglucanasas.....	24
Tabla 3: Valores de los niveles usados para cada factor evaluado (componente del medio de cultivo) en el diseño Box-Behnken para optimización de un medio de cultivo de producción de endoglucanasas para <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa.....	25
Tabla 4: Arreglo del diseño Box-Behnken en función de los niveles para cada factor, para la etapa de optimización del medio de producción de endoglucanasas para <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa.	25
Tabla 5: Arreglo aleatorio del diseño Plackett-Burman en función de los niveles para cada factor en la etapa de cribado, considerando la actividad de endoglucanasa de <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa como variable respuesta. Se muestran los valores observados y esperados.....	30
Tabla 6: Análisis de varianza (ANVA) para los factores evaluados en la etapa de cribado mediante el diseño Plackett-Burman para optimización de medio de cultivo de producción de endoglucanasas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa.....	33
Tabla 7: Arreglo del diseño Box-Behnken para la fase de optimización de la variable respuesta (actividad de endoglucanasa) en función de los niveles para cada factor.....	35
Tabla 8: Análisis de varianza (ANVA) de los factores evaluados en la etapa de optimización de componentes del medio de producción de endoglucanasas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa mediante el diseño Box-Behnken.....	36
Tabla 9: Condiciones óptimas recomendadas por la ecuación de segundo orden, respuesta óptima estimada y respuesta óptima experimental para la producción de endoglucanasas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa	43
Tabla 10: Genes de endoglucanasas descritos para <i>Aspergillus fumigatus</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diseño Box Behnken para $k = 3$ factores. Donde la última fila en el diseño matricial indicaría la presencia de un vector de corridas centrales.	13
Figura 2: Modelo de una amplificación simple, ilustrando la nomenclatura comunmente usada en los ensayos de PCR en tiempo real. ΔR_n : indica la emisión de fluorescencia del producto en cada punto - la emisión de fluorescencia del <i>baseline</i> ; Ct: <i>threshold cycle</i> (ciclo umbral).	15
Figura 3: Intercalación del SYBR Green I sobre el ADN de doble hebra, generando fluorescencia detectable por el equipo.....	16
Figura 4: Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño Plackett Burman, donde se muestra la significancia y el efecto de los factores evaluados (componentes del medio para producción de endoglucanasas) considerando un $\alpha=0.05$	31
Figura 5: Gráfico de efectos principales sobre la variable respuesta (actividad de endoglucanasa de <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa) por cada factor evaluado (componentes del medio) en la etapa de cribado, mediante el diseño experimental Plackett-Burman.	32
Figura 6: (A) Gráfico de superficie de respuesta del diseño Box-Behnken y (B) gráfico de contorno para los efectos combinados de CMC y KH_2PO_4 en la producción de endoglucanasas por <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa.	38
Figura 7: (A) Gráfico de superficie de respuesta del diseño Box-Behnken y (B) Gráfico de contorno para los efectos combinados de CMC y peptona en la producción de endoglucanasas por <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa.	39
Figura 8: (A) Gráfico de superficie de respuesta del diseño Box-Behnken y (B) Gráfico para los efectos combinados de KH_2PO_4 y peptona en la producción de endoglucanasas por <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa.	40
Figura 9: Comparación de medianas entre la condición óptima y la condición basal del medio de producción de celulasas para <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa.....	43
Figura 10: Análisis de expresión de genes de endoglucanasas en <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa en el medio optimizado comparado con el medio basal.	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo basado en el método estándar descrito por Ghose (1987) y adaptado a microplacas de PCR de acuerdo a Xiao et al. (2005).....	65
Anexo 2: Curva estándar de glucosa para ensayo de actividad de endoglucanasa en microplaca	66
Anexo 3: Tabla de eficiencia de cebadores para la amplificación de genes de celulasas y LPMOs de <i>A. fumigatus</i> , y genes de referencia	67

RESUMEN

En el presente estudio, se realizó la optimización de un medio de cultivo para la producción de endoglucanasas de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa. Para ello, inicialmente la selección de factores (componentes del medio de cultivo del medio Mandels-Reese modificado con carboximetil celulosa) con mayor efecto sobre la actividad endoglucanasa fue realizada, para luego proceder a la optimización de tres factores mediante la metodología de superficies de respuesta (MSR). El diseño experimental Plackett-Burman con réplicas en el punto central, se utilizó para la selección de tres factores, con un alto nivel de significancia sobre la variable respuesta (actividad de endoglucanasa), de un total de siete evaluados. Se determinó que los factores más influyentes sobre la actividad endoglucanasa fueron la carboximetil celulosa (CMC), el fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) y la peptona. La etapa de optimización mediante la metodología de superficie de respuesta se realizó mediante el diseño Box-Behnken, que determinó las siguientes condiciones óptimas: concentración de CMC al 1.5 por ciento (p/v), concentración de KH_2PO_4 al 0.209 por ciento (p/v) y concentración de peptona al 0.284 por ciento (p/v). La optimización del medio a través de la evaluación de la variable respuesta (actividad de endoglucanasa) fue verificada molecularmente a través del análisis de expresión de genes de endoglucanasas de *A. fumigatus* mediante PCR en tiempo real. Los resultados indicaron que las endoglucanasas evaluadas presentaron una mayor expresión en el medio optimizado frente al medio basal, a excepción de la Monooxigenasa Lítica de Polisacáridos (LPMO) *Afu3g03950*, que presentó un menor nivel de expresión bajo la condición óptima.

Palabras Clave: Biotecnología de Sistemas, *Aspergillus fumigatus*, Bioprocesos, Diseños experimentales.

ABSTRACT

Culture medium composition was optimized for the production of endoglucanases in *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa. To this end, selected factors (components of the culture media of the modified Mandels-Reese medium with carboxymethyl cellulose) that had the higher effect on the endoglucanase activity were optimized by response surface methodology (RSM). Plackett-Burman experimental design using replicates at the central point for the selection of main influencing factors of the medium between seven components, was carried out. It was observed that carboxymethyl cellulose (CMC), potassium acid phosphate (KH_2PO_4) and peptone had significant effect on endoglucanase activity. Using the response surface methodology with Box-Behnken design, this three components were optimized. Optimal conditions for the medium were: 1.5 percent (w/v) CMC, 0.209 percent (w/v) KH_2PO_4 and 0.284 percent (w/v) peptone. Expression of endoglucanases in cultures growth in basal and optimized medium were analyzed by real-time PCR (qPCR). The results indicated that the evaluated endoglucanases had a higher expression in the optimized medium compared to the basal medium, with the exception of the Lytic Polysaccharide Monooxygenase (LPMO) *Afu3g03950*, which showed a lower level of expression under the optimal condition.

Key words: Systems biology, *Aspergillus fumigatus*, Bioprocess, Design of experiments.

I. INTRODUCCIÓN

Las celulasas son complejos enzimáticos importantes que están involucrados en la degradación de la biomasa celulósica en la naturaleza; estas comprenden endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas que actúan de manera sinérgica junto con xilanasas y otras enzimas para la hidrólisis total de la celulosa. Desde un punto de vista biotecnológico, estas juegan un rol esencial en la generación de fuentes de energía sostenible cómo lo es la glucosa, etanol, hidrógeno y metanol principalmente, además de su aplicación en el sector industrial (Soni *et al.*, 2010).

En la industria textil, son empleadas en los procesos de lavado y acabado, especialmente en textiles a base de celulosa. Su acción radica en la eliminación de fibras cortas, mejora en el brillo del color, pulido y lavado en el acabado *denim*, aumento de hidrofiliidad y absorción de humedad, siendo estos procesos de bajo impacto ambiental y de alta productividad con reducción de costos (Bhat, 2000; Kuhad *et al.*, 2011). Sin embargo, muchas de sus aplicaciones industriales se han limitado debido a la carencia de cepas microbianas que produzcan altos niveles de celulasas neutroalcalinas, útiles en la reducción del *backstaining*, siendo además menos agresivas frente al desgaste de las fibras de algodón (Fujinami y Fujisawa, 2010).

Estas enzimas, son producidas por una variedad de organismos, incluyendo bacterias, actinomicetos y hongos, siendo estos últimos los mayores productores. Los géneros de hongos, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Fusarium* se encuentran entre las mejores especies productoras de estas enzimas (Das *et al.*, 2013b). Por esta razón, una cepa de *Aspergillus fumigatus* productora de celulasas neutroalcalinas se aisló del suelo de selva de Tingo María por el Laboratorio de Micología y Biotecnología - UNALM (Paul *et al.*, 2017).

La optimización de las condiciones de fermentación para la producción de enzimas, particularmente a nivel de parámetros físicos y químicos es de gran importancia debido a

su impacto económico y factibilidad (Abdel-Fattah *et al.*, 2012). Esto ha orientado la búsqueda de herramientas que faciliten el manejo en la producción y en la optimización, por lo que los diseños experimentales estadísticos pueden adoptarse en varias fases de una estrategia de optimización, como en experimentos de cribado o en la búsqueda de condiciones óptimas para una variable respuesta específica (Box y Behnken, 1960).

La amplia diversidad de interacciones entre los componentes del medio junto al metabolismo celular, no permiten un modelado detallado debido a su alta complejidad, sin embargo, en el presente estudio, se dará énfasis en la selección y evaluación de los componentes más relevantes sobre la respuesta global, por lo que el uso de un diseño experimental adecuado es importante (Salihu *et al.*, 2013).

El enfoque de la biotecnología de sistemas, ha permitido el uso de diferentes métodos ómicos (transcriptómica, genómica, proteómica, metabolómica) junto con herramientas matemáticas y estadísticas para establecer una relación entre las redes metabólicas, de señalización y regulación en un determinado sistema biológico, por lo que su aplicación en el uso de bioprocesos, ofrece alternativas de validación de posibles modelos predictivos a ser generados (Wang *et al.*, 2009).

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron: Utilizar el diseño factorial de Plackett-Burman para realizar el tamizado de los principales componentes del medio de cultivo, evaluando como respuesta la actividad endoglucanasa de *Aspergillus fumigatus*; determinar las óptimas concentraciones de los principales componentes del medio mediante el diseño Box-Behnken (tres niveles por componente) y correlacionar los resultados del análisis de superficie de respuesta con los perfiles de expresión de genes de celulasas de *Aspergillus fumigatus*, comparando el medio basal con el medio optimizado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CELULOSA

La celulosa es un homopolisacárido insoluble y ramificado que está formada por subunidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4-glicosídicos en las regiones de biosíntesis (Brown y Saxena, 2000). Es uno de los polímeros orgánicos más comunes en la naturaleza, encontrada casi de manera exclusiva en la pared celular de plantas, representando cerca de 1.5×10^{12} toneladas de material celulósico seco anualmente producidos por procesos fotosintéticos, siendo también considerada una de las mayores fuentes de materia prima para diferentes productos, por ser uno de los materiales de desecho dominantes en el sector agrario (Kaur y Joshi, 2015; Lynd *et al.*, 2002). También, es usado como fuente energética por un número diverso de microorganismos, como hongos y bacterias, los cuales degradan este material orgánico, mediante complejos enzimáticos denominados celulasas (Kubicek *et al.*, 1993).

A pesar de las diferencias en composición estructural de las paredes celulares vegetales, el contenido de celulosa corresponde aproximadamente al 35-50 por ciento del peso seco total de la planta. Estas fibras de celulosa se encuentran embebidas en una matriz junto a otros polímeros como la hemicelulosa (20-35 por ciento) y la lignina (5-30 por ciento) principalmente, siendo esta estructura en conjunto la limitante en el uso industrial directo de los materiales lignocelulósicos no tratados (Mansfield *et al.*, 1999).

2.2. ENZIMAS

Las enzimas son moléculas de alto peso molecular, compuestas por polímeros de aminoácidos, que actúan como catalizadores en diferentes reacciones biológicas y químicas. Los sitios catalíticos en estas moléculas generalmente se encuentran en

regiones hidrofóbicas de una alta especificidad a sus substratos, a su vez reducen la energía de activación en las reacciones y son por lo general moléculas de gran implicancia en el desarrollo de la vida (Choi *et al.*, 2015). Las enzimas son empleadas en diferentes procesos industriales, por lo que la búsqueda de fuentes enzimáticas que requieran bajos niveles energéticos, sean amigables con el medio ambiente, reduzcan la formación de contaminantes y que ofrezcan procesos económicos, han ganado interés (Li *et al.* 2012). El mercado global de las enzimas industriales se estimó en alrededor de 4.2 billones de dólares en el 2014 y se espera que se desarrolle a una tasa de crecimiento anual de aproximadamente 7 por ciento, llegando a los 6.2 billones de dólares en el 2020 (Singh *et al.*, 2016). Las enzimas empleadas de manera comercial son producidas principalmente mediante fermentación sumergida, en la cual los microorganismos son cultivados en un medio líquido con nutrientes específicos para la producción del metabolito de interés (Zhuang *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta este aspecto, un enfoque en la mejora de cepas microbianas para la producción de enzimas y en la optimización de los medios para producción a mayor escala sería beneficioso para los diferentes sectores industriales, considerando la reducción de costos del proceso y la obtención directa de características deseadas (Prabakaran *et al.*, 2009).

2.3. CELULASAS

La conversión biotecnológica de biomasa celulósica con fines sostenibles permite el desarrollo de nuevos bioprocesos y productos, siendo las celulasas microbianas las de mayor interés en su uso, debido a su naturaleza compleja y su gran implicancia en el sector industrial (Das *et al.*, 2013b). Las celulasas son enzimas inducibles, pertenecientes al grupo de las glicosil hidrolasas, sintetizadas por una amplia variedad de microorganismos degradadores de celulosa, durante su crecimiento en materiales celulósicos, pero solo algunos géneros de hongos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Talaromyces* son los más usados comercialmente en la producción de celulasas (Kuhad *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2013b).

Las celulasas fúngicas poseen dos dominios separados, un dominio catalítico (CD) y un dominio de unión a la celulosa (CBD), el cual está conformado por secuencias *linker* ricas en serina en el extremo N-terminal de la enzima (Kuhad *et al.*, 2011, Sajith *et al.*, 2016).

Las celulasas son una familia de al menos tres grupos de enzimas (Lynd *et al.*, 2002; Kuhad *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2013a; de Oliveira *et al.*, 2016; Sajith *et al.*, 2016): las endo-(1,4)- β -D-glucanasas (EC 3.2.1.4), exo-(1,4)- β -D-glucanasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), que actúan de manera sinérgica durante la conversión de celulosa a glucosa. La degradación de la celulosa empieza por la acción aleatoria de las endoglucanasas sobre los enlaces O-glicosídicos internos, liberándose cadenas de glucano de diferentes longitudes. Las celobiohidrolasas (exoglucanasas) actúan en los extremos de estas cadenas generando unidades de β -celobiosa, y finalmente las β -glucosidasas actúan sobre estos disacáridos de β -celobiosa liberando glucosa como producto final (Lynd *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2013a).

La producción de enzimas celulolíticas es inducida generalmente mediante substratos celulósicos, muchos de los cuales son productos derivados de la hidrólisis de la celulosa como la celobiosa (Sun *et al.*, 2008). La lactosa es también un inductor conocido de estas enzimas, por lo que su uso en la producción comercial está ampliamente distribuido (Lynd *et al.* 2002). Si bien su inducción está asociada a diferentes derivados de la celulosa, la biosíntesis de estas enzimas es reprimida por substratos fácilmente metabolizables como la glucosa (Sun *et al.*, 2008).

El uso industrial de las celulasas que provienen de microorganismos, tiene como objetivo la búsqueda de procesos más económicos, con mayores aplicaciones comerciales, de mayor eficiencia y de bajo impacto ambiental (Shah, 2013). Por ello, es necesaria la aplicación de estrategias que incrementen la obtención y producción volumétrica de estas enzimas, empleando substratos más económicos y de fácil disposición (Zhang *et al.*, 2006).

En el ámbito de la industria textil, estas enzimas son empleadas principalmente en el procesamiento y acabado de textiles de origen celulósico (Karmakar y Ray, 2011; Choi *et al.*, 2015), ya que permiten la eliminación de fibras cortas, mejoramiento del brillo del color, pulido y lavado en el acabado *denim*, un aumento de la hidrofiliidad y absorción de humedad. Además, se ha probado que diversos preparados de celulasas con una alta cantidad de endoglucanasas permiten mejores resultados en los procesos de *biofinishing* (Bhat, 2000; Kuhad *et al.*, 2011). Sin embargo, estas aplicaciones industriales se han visto

limitadas debido a la carencia de cepas microbianas que produzcan celulasas neutroalcalinas, útiles en la reducción del *backstaining*, proceso en el cual la redeposición de los tintes empleados afectan las zonas no teñidas de las prendas (Vega *et al.*, 2012) y que además propician menos desgaste de las fibras de algodón tratadas con celulasas ácidas (Miettinen-Oinonen *et al.*, 2004; Fujinami y Fujisawa, 2010). En este sentido cabe destacar que recientemente, se aisló una cepa de *Aspergillus fumigatus* productora de celulasas neutro alcalinas (Paul *et al.*, 2017).

2.4. *Aspergillus fumigatus*

El género *Aspergillus* pertenece al phylum Ascomycota, el cual abarca una amplia variedad de especies de hongos filamentosos que poseen un alto impacto económico y social (Samson *et al.*, 2014). Las especies del género *Aspergillus* se distribuyen en diferentes hábitats y muchas cepas son empleadas en biotecnología para la producción, mejoramiento y estudio de una gama amplia de metabolitos secundarios, antibióticos, ácidos orgánicos y enzimas (Dagenais y Keller, 2009). Algunas cepas también pueden ser productoras de micotoxinas o patógenos oportunistas de diferentes especies animales e incluso humana; debido a su adaptabilidad a condiciones físicas, químicas y biológicas adversas en diferentes hábitats o ambientes (Dagenais y Keller, 2009).

Uno de los hábitats más comunes para las especies del género *Aspergillus* son los suelos, donde intervienen en la degradación de substratos orgánicos como los materiales lignocelulósicos, biomasa vegetal, lo cual propicia la capacidad de estos hongos de producir enzimas extracelulares. Su capacidad de producción y secreción de enzimas son de gran importancia y utilidad en biotecnología, pues ha permitido la investigación y el desarrollo de esta área en beneficio del sector industrial, para la adquisición de bienes económicos y rentabilidad de procesos (Baker y Bennett, 2008). La clasificación de estas especies estuvo basada en las diferentes características fenotípicas, pero actualmente la caracterización molecular y filogenética son las herramientas de uso más común en las ramas taxonómicas para la clasificación de estas especies (Samson *et al.*, 2014).

Dentro de este género, *Aspergillus fumigatus* es una especie ubicua y saprofítica, cuyo

hábitat corresponde a suelos, compost y materia orgánica, siendo su función principal la descomposición (Dagenais y Keller, 2009). Al tener una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C, conidias de tamaño pequeño e hidrofóbicas a nivel proteico, su condición de patógeno y organismo oportunista, deriva en más de 100 000 muertes anuales en individuos inmunocomprometidos, que lleguen a tener infecciones por este hongo (Dagenais y Keller, 2009); sin embargo presenta un gran potencial biotecnológico en la producción de enzimas y metabolitos industriales (Soni *et al.*, 2010).

2.5. CULTIVO SUMERGIDO

Las enzimas de interés e importancia industrial, han sido obtenidas tradicionalmente mediante cultivo sumergido empleando microorganismos como hongos filamentosos. Este sistema permite un adecuado manejo y control de diferentes factores fisicoquímicos, tales como la temperatura, la transferencia de oxígeno, la agitación y el pH, los cuales son importantes en la formación de los productos o metabolitos de interés; y en efecto generan otras ventajas como el establecimiento de bases para el escalamiento industrial de los procesos (Shobana y Maheswari, 2013).

Fisiológicamente, los estadíos en los cuales la producción enzimática es óptima, son alcanzados cuando las hifas adquieren su mayor longitud, lo cual en los sistemas de cultivo sumergido se obtiene al conseguir *pellets* o micelios dispersos (Krull *et al.* 2013). Cabe mencionar, que la morfología de los hongos en los sistemas de cultivo sumergido, dependen mucho del esfuerzo de corte aplicado, lo cual está relacionado de manera directa con la tasa de agitación empleada en el cultivo; en el caso de emplear niveles de agitación elevados, la morfología del hongo se distribuirá más uniformemente a diferencia del uso de bajos niveles de agitación, en los cuales la formación de los *pellets* será predominantemente de tamaños heterogéneos. A su vez, la transferencia de masa, los valores de pH, la concentración de sales, el intercambio gaseoso dentro del medio líquido con respecto al diámetro de los *pellets*, etc. también son factores que influyen en gran medida a la morfología de los *pellets* (Krull *et al.* 2013). Sin embargo, una relación entre la morfología y la productividad asociada al hongo no está definida en totalidad, pues esta varía en diferentes especies que produzcan respuestas más eficientes en base a la dispersión miceliar, al crecimiento de los *pellets* y la composición de los medios de

cultivo empleados (Krull *et al.*, 2013).

2.6. DISEÑOS EXPERIMENTALES

Dentro de las diferentes ramas de la ciencia, los métodos de estudio y análisis de fenómenos físicos, químicos y biológicos han sido mejorados gracias al desarrollo de metodologías matemáticas y estadísticas para el procesamiento y comprensión de los datos numéricos, como lo son el análisis factorial, reconocimiento de patrones, el diseño de experimentos, etc. De estos, el diseño de experimentos es uno de las metodologías más usadas en investigación, pues refiere al proceso de planear experimentos que deriven a datos adecuados que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos, generando conclusiones válidas y objetivas, considerándose la realización de réplicas, la aleatorización y la formación de bloques (Montgomery, 1991). El uso de herramientas que faciliten el manejo de la producción y optimización, puede ser adoptado en diferentes fases dentro de la estrategia aplicada, tal es el caso de los experimentos de cribado o la búsqueda de condiciones óptimas para una variable respuesta específica considerando los parámetros o factores involucrados en estos procesos (Box y Behnken, 1960).

La optimización de procesos podría dividirse en seis etapas: la selección de variables independientes y las respuestas, la selección del diseño experimental, la ejecución de los experimentos y la obtención de resultados, la determinación de la ecuación modelo en base a la data experimental, la obtención de gráficos de superficie de respuesta y la validación del modelo (Witek-Krowiak *et al.*, 2014). El empleo de bioprocesos, considerando los niveles de los parámetros físicos y químicos, ha tenido una gran importancia en el desarrollo y diseño de estos aplicados a procesos fermentativos, debido al impacto económico y la factibilidad que estos ofrecen (Abdel-Fattah *et al.*, 2012).

2.6.1. Diseño de cribado - Plackett Burman

El uso de metodologías estadísticas que tengan como objetivo identificar las variables que presentan significancia en un proceso, refieren a los diseños experimentales de cribado. Si los factores afectan de manera sensible a la variable respuesta a analizar

cuando se varían en base a su nivel bajo y alto, se permitirá el acceso o búsqueda de regiones óptimas mediante la aplicación de otros diseños experimentales, sin considerar las variables poco significativas (Montgomery, 1991). Mientras el número de factores se incrementa en un diseño factorial común 2^k , el número de corridas experimentales para la realización y viabilidad del diseño, excede los recursos necesarios en la mayoría de etapas que se requiera utilizar. Por ejemplo, en un diseño 2^6 , se requerirían 64 experimentos, de los cuales solo seis de los 63 grados de libertad se emplearían para estimar los efectos principales y 15 corresponderían a las interacciones entre dos factores; el resto de corridas experimentales abarcaría interacciones de tres a más factores. Muchas variables afectan la respuesta deseada, y no es posible la identificación individual de cada una de ellas. Sin embargo, existe una necesidad de seleccionar las variables significativas o de efecto marcado sobre la variable respuesta como ha sido mencionado anteriormente. Por esta razón, el uso de diseños factoriales fraccionados propiciaría un menor gasto de recursos, tiempo y experimentos, siendo este tipo de diseños los más empleados en la industria, especialmente en los experimentos de cribado (Myers *et al.*, 2009).

Uno de los diseños de cribado más aplicados en el sector industrial es el diseño Plackett-Burman, el cual es un diseño factorial fraccionado de dos niveles, que permite seleccionar un gran número de factores que afectan significativamente un proceso. Este diseño permite dos niveles por cada una de las variables o factores que se deseen evaluar, además la condición de diseño fraccionado significa que frente a un diseño factorial convencional, se requieren menos corridas experimentales, característica que es deseada con el fin de ahorrar tiempo y recursos (Aanchal *et al.*, 2016). Estos diseños se generan al colocar columnas predefinidas de niveles sobre la base del número de factores a evaluar, las cuales se derivan de la anterior moviendo los elementos de la primera columna y colocando el último elemento en la primera posición de la columna siguiente; completándose con el nivel -1 para la última corrida experimental. Los signos para un número de factores igual a $k = 8$ y $k = 12$ es el siguiente:

$k = 7, N = 8$ + + + - + - -
 $k = 11, N = 12$ + + - + + + - - - + -

Si se parte de un número de factores menor al estimado en un diseño saturado, la estimación será más adecuada por el aumento del número de corridas experimentales, lo

que quiere decir que puede usarse el diseño de $N = 12$ corridas experimentales si se tienen sólo $k = 7$, siendo el diseño no saturado, lo cual permitiría estimar si el diseño es adecuado o no mediante el uso de otras pruebas estadísticas que estimen el error puro del diseño (Myers *et al.*, 2009).

El diseño experimental de Plackett-Burman está basado en el siguiente modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad \dots (1)$$

donde Y es la variable respuesta, β_0 es el intercepto, β_i es el coeficiente lineal y X_i es el nivel de la variable independiente (factor).

Este modelo no describe la interacción entre los factores y es utilizado para seleccionar y evaluar los factores de mayor influencia en la variable respuesta. Para la estimación de los efectos principales de cada variable independiente sobre la variable respuesta se ha establecido la siguiente ecuación:

$$E_{xi} = 2[(M_{i+} - M_{i-})] / N \quad \dots (2)$$

Donde E_{xi} es el efecto principal de la variable independiente X_i sobre la variable respuesta Y , $M_{i+} - M_{i-}$ son los valores de la variable independiente en sus niveles altos y bajos (+1, -1) respectivamente, y N el número de corridas experimentales.

2.6.2. Metodología de superficies de respuesta - Diseño Box Behnken

Usualmente, la optimización de procesos, requiere de una fase previa de cribado, para dar pase a las metodologías de superficie de respuesta (MSR), las cuales, son un conjunto de herramientas estadísticas y matemáticas, utilizadas para optimizar una variable de respuesta de interés sujeta a variables independientes (Montgomery, 1991). Estas técnicas son aplicadas cuando las relaciones entre las variables no son completamente entendidas como para representarlas de manera directa a través de un modelo matemático exacto, sino cuando es necesario construir un modelo empírico para aproximar su

comportamiento. Por lo general, son empleados diseños factoriales fraccionados de resolución III, en los cuales los efectos principales no se confunden, a excepción de las interacciones entre dos factores, para determinar las regiones predictoras donde se ubiquen los valores óptimos para la variable respuesta a analizar (Piña *et al.*, 2006). Las regiones predictoras pueden ser alcanzadas mediante la aplicación de otras técnicas como el escalamiento ascendente o el ajuste de diferentes modelos polinomiales de segundo orden (Box y Draper, 1987). Una de las propiedades deseables de los diseños de superficie de respuesta es la comprobación de varianzas constante, la ortogonalidad y rotabilidad, la detección de falta de ajuste, la estimación de error puro, la formación de bloques, la construcción de diseños de orden superior y análisis gráficos (Steinberg y Bursztyn, 2010; Aanchal *et al.*, 2016).

De acuerdo a estos diseños, la respuesta implicada en el proceso a ser evaluado, depende de las variables independientes o factores ($\xi_1, \xi_2, \xi_3, \dots, \xi_k$), donde el modelo a ser optimizado se representa como:

$$Y = f(\xi_1, \xi_2, \xi_3, \dots, \xi_k) + \varepsilon_{ij} \quad \dots (3)$$

donde la variable respuesta Y es una función basada en ξ_j , las cuales son las variables naturales del proceso y el componente ε_{ij} representa el error aleatorio debido a diferentes fuentes de variabilidad no consideradas en la función f (Montgomery, 1991; Myers *et al.*, 2009).

En el diseño de experimentos basados en la metodología de superficie de respuesta, la transformación de estas variables naturales del proceso a variables codificadas, permiten el mejor manejo de los modelos y los valores reales esperados η , que están en función de la combinación de los niveles de k factores cuantitativos: $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$ (Montgomery, 1991); así de esta relación, la superficie de respuesta para estas variables está dada por:

$$\eta = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) \quad \dots (4)$$

donde η , es la superficie de respuesta en función de varias variables independientes a optimizar (x_1, x_2, \dots, x_k).

Por lo que, de acuerdo a esta relación, la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) + \varepsilon \quad \dots (5)$$

Donde Y es la variable respuesta, η indica la relación existente entre la función y los niveles de k factores determinantes de la superficie de respuesta y ε es el ruido o error observado en la respuesta Y (Myers *et al.*, 2009).

Una de las alternativas más empleadas debido a sus menores costos operativos al ser ejecutados frente a otros diseños experimentales como los diseños centrales compuestos (CCD), es el diseño Box-Behnken. A diferencia del diseño Plackett-Burman, este diseño evalúa los efectos cuadráticos y de interacciones bidireccionales entre las variables, determinando así la naturaleza no lineal de la variable respuesta. Este es un diseño rotativo de segundo orden basado, que considera tres niveles para cada factor a evaluar en un diseño factorial junto con un diseño de bloques incompletos que se ajusta al modelo de metodología de superficies de respuesta (Box y Behnken, 1960). La relación entre la variable respuesta y los parámetros influyentes, se analizan a partir de los gráficos de contorno generados por estadísticas y los modelos matemáticos (Montgomery, 1991; Myers *et al.*, 2009). La construcción del diseño está basada en la formación de bloques balanceados incompletos, junto con un diseño factorial 2^k , como se observa en la siguiente Tabla:

	X1	X2	X3
Bloque 1	O	O	
Bloque 2	O		O
Bloque 3		O	O

Por ejemplo, sea el caso de un diseño con tres factores $k = 3$, la agrupación por pares de los factores X1 y X2, implica simbólicamente que en la superficie de respuesta estas variables formarán un diseño factorial 2^2 , mientras la variable X3 se mantiene fija en el centro (0). Lo cual se aplica para los otros dos bloques restantes, mientras el tercer factor se mantiene en el nivel central (Myers *et al.*, 2009). Como resultado el diseño Box Behnken para $k = 3$ factores, de acuerdo a la Figura 1:

$$\mathbf{D} = \begin{array}{c} \begin{array}{ccc} x_1 & x_2 & x_3 \\ \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 \\ -1 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & -1 \\ -1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & -1 \\ 0 & -1 & 1 \\ 0 & 1 & -1 \\ 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \end{array} \end{array}$$

Figura 1: Diseño Box Behnken para k = 3 factores. Donde la última fila en el diseño matricial indicaría la presencia de un vector de corridas centrales.

FUENTE: Myers *et al.* (2009).

Estos factores que determinan el comportamiento de la variable de respuesta, son analizados en diseños de experimentos iterativos para que a través del análisis de varianza (ANVA) puedan determinarse cuáles son significativos (Montgomery, 1991). La predicción del punto óptimo se ajusta a una función polinomial de segundo orden para correlacionar la relación entre las variables independientes y la variable respuesta (Box y Behnken, 1960). Otra característica resaltante del diseño Box-Behnken es que es un diseño esférico, debido a que los puntos del diseño se encuentran en las caras y orillas de un cubo en lugar de los extremos y vértices como en los diseños centrales compuestos (Myers *et al.*, 2009). La ecuación general del modelo de segundo orden se representa cómo:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \dots (6)$$

donde por ejemplo, para tres factores, la ecuación es:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \varepsilon \quad \dots (7)$$

Donde, Y es la variable respuesta predicha, β_0 la constante modelo; X_1 , X_2 y X_3 las variables independientes; β_1 , β_2 y β_3 son coeficientes lineales; β_{12} , β_{13} y β_{23} son

coeficientes de interacción y β_{11} , β_{22} y β_{33} son los coeficientes cuadráticos. La calidad del ajuste de la ecuación del modelo polinomial se expresa mediante el coeficiente de determinación R^2 (Box y Behnken, 1960).

2.7. PCR EN TIEMPO REAL

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa, es un método ampliamente utilizado para amplificar segmentos específicos de ADN, siendo una herramienta fundamental en el campo de la biología molecular. Cada ciclo de PCR incluye tres etapas: la desnaturalización de la cadena de doble hebra de ADN, alineamiento de los cebadores y la extensión de la cadena de ADN. En la etapa de desnaturalización, la solución de reacción que contiene el ADN diana se eleva a una temperatura mayor al punto de fusión de las dos cadenas complementarias, lo cual permite su separación. La siguiente etapa de reacción, corresponde a el alineamiento o hibridación de los cebadores a las secuencias diana complementarias de ADN, al disminuir la temperatura. Luego en la etapa de extensión, la temperatura vuelve a elevarse para que la enzima polimerasa pueda agregar nucleótidos a la cadena de ADN en formación; y el ciclo vuelve a repetirse entre 20 a 40 veces de acuerdo al protocolo deseado por el ejecutor (Garibyan y Avashia, 2013).

Por su parte, la técnica de PCR en tiempo real, abarca los mismos procedimientos que una reacción convencional pero ofrece la detección y medida de los productos generados durante cada ciclo del proceso de la reacción, lo cual es directamente proporcional a la cantidad de cadena molde (Arya *et al.*, 2005). El uso de termocicladores modificados permite la detección en los incrementos de fluorescencia de la técnica por cada ciclo del proceso, siendo el *software* de computadora el que construye los modelos de amplificación utilizando los datos de fluorescencia que son recolectados en las fases de amplificación de la técnica (Arya *et al.*, 2005). Esta técnica se divide en cuatro fases: la fase inicial, la fase exponencial temprana, la fase exponencial y la fase estacionaria o *plateau*.

Durante la fase inicial, la cual corresponde a los diez o quince primeros ciclos, la PCR recién comienza y por lo tanto los niveles de fluorescencia emitidos en cada ciclo no

sobrepasan los límites de detección (Tichopad *et al.*, 2003), es en este nivel en donde se procede a calcular la fluorescencia base, *baseline*. Al llegar a la fase exponencial inicial, la cantidad de fluorescencia ha alcanzado el nivel del umbral detectable, que es significativamente más alto (unas diez veces la desviación estándar del *baseline*) que los niveles de fondo (*background*); el ciclo en el que ocurre este proceso, es denominado Ct (*threshold cycle*), el cual es un valor representativo de la cantidad inicial de copias en el molde original y se emplea para calcular resultados experimentales (Tichopad *et al.* 2003). Durante la fase exponencial, la técnica del PCR alcanza su período de amplificación óptima, con los productos de PCR incrementándose el doble por cada ciclo, considerando condiciones ideales, lo cual es detectado por el equipo, generándose los datos requeridos para su posterior análisis (Wong y Medrano, 2005). En la fase *plateau* o estacionaria, debido a la limitación de componentes de la reacción, a la disminución de la actividad polimerasa y la competencia por parte de los productos de PCR, la intensidad de fluorescencia no sigue siendo útil en el cálculo de datos (Heid *et al.*, 1996; Tichopad *et al.*, 2003), en la Figura 2, se ilustra la terminología mencionada.

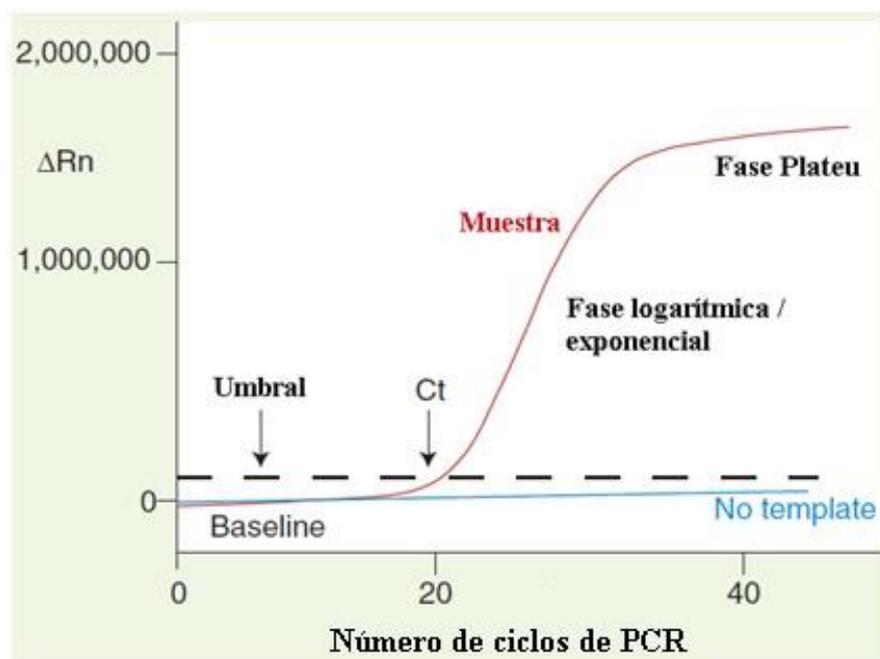


Figura 2: Modelo de una amplificación simple, ilustrando la nomenclatura comúnmente usada en los ensayos de PCR en tiempo real. ΔRn : indica la emisión de fluorescencia del producto en cada punto - la emisión de fluorescencia del *baseline*; **Ct: *threshold cycle* (ciclo umbral).**

FUENTE: Arya *et al.* (2015).

2.7.1. Colorantes de unión a ADN (SYBR Green I)

Los tintes de unión al ADN emiten fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hebra (ADNs), a medida que el producto de PCR se va acumulando durante el ciclo, más colorante se puede unir y emitir fluorescencia, ver Figura 3. Por lo tanto, la intensidad de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la concentración del ADNs (Vandesompele *et al.*, 2002). Una de las ventajas del uso de sistemas de tinción de doble cadena (ADNs) como el SYBR Green I es su eficiencia en la detección de los productos formados, además de ser una alternativa más económica a diferencia de otros métodos (Arya *et al.*, 2005).

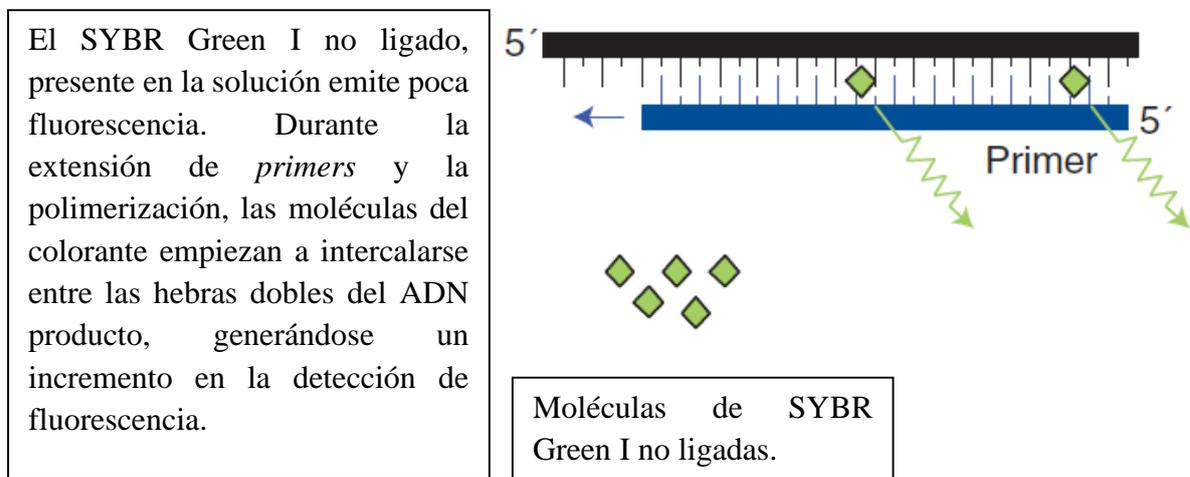


Figura 3: Intercalación del SYBR Green I sobre el ADN de doble hebra, generando fluorescencia detectable por el equipo.

FUENTE: Adaptada de Arya *et al.* (2005).

2.7.2. Análisis de expresión de genes mediante cuantificación relativa

El análisis de expresión de genes por cuantificación relativa implica la determinación de los niveles y cambios, sobre la base de un estándar externo denominado gen de referencia, expresando los resultados como una relación entre el gen diana y el gen de referencia. La normalización de la técnica o empleo de un gen de referencia, busca corregir las variaciones entre muestras; siendo los genes *housekeeping* los más empleados, pues de manera ideal, deberían expresarse de manera uniforme sin importar las condiciones experimentales aplicadas, por lo que su uso como genes de referencia o normalizadores es común (Arya *et al.*, 2005).

Existen muchos modelos matemáticos disponibles para generar la normalización de la expresión del gen o genes, a partir de la cuantificación relativa (Wong y Medrano, 2005).

El método expuesto por Pfaffl (2001); combina la cuantificación de genes y la normalización en una sola expresión matemática, pues incorpora las eficiencias de amplificación de las dianas y los genes de referencia. La ecuación descrita por Pfaffl, 2001 es la siguiente:

$$\text{ratio} = \frac{(\text{Eficiencia diana})^{\Delta\text{Ct diana (prom.control-prom.muestra)}}}{(\text{Eficiencia referencia})^{\Delta\text{Ct referencia (prom.control-prom.muestra)}}} \dots (8)$$

En el caso de una normalización con más de un gen de referencia, se procederá a utilizar la media geométrica de estos y los resultados podrán expresarse en función del *Log₂ fold change*.

Este método ha sido adaptado también por otros autores (Hellemans *et al.*, 2007). También, la eficiencia de amplificación de la reacción de PCR es un parámetro de importancia al realizar ensayos de cuantificación relativa, de manera general los métodos comunes asumen que la eficiencia de amplificación de la reacción es ideal, lo cual indica que las concentraciones de producto de PCR aumenta a el doble en cada ciclo dentro de la fase exponencial de la reacción (Wong y Medrano, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Micología y Biotecnología - "*Marcel Gutiérrez Correa*" (LMB) perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. EQUIPOS

- Agitador magnético
- Agitador vórtex
- Autoclave
- Balanza analítica
- Baño María
- Bomba de vacío
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de siembra
- Congeladora -20 °C y -80 °C
- Espectrofotómetro
- Equipo de electroforesis
- Horno microondas.
- Incubadora de 28 °C
- Microcentrífuga
- Microscopio
- Nanodrop
- pHmetro
- Refrigerador

- Baño maría agitado
- Termobloque
- Termociclador

3.3. MATERIALES

- Algodón
- Asa de Kölle
- Gorra
- Gradilla
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla
- Matraces Erlenmeyer
- Matraces Kitazato
- Mechero
- Micropipetas de 10, 100, 200, 1000 μl
- Microtubos
- Mortero y pilón
- Parafilm
- Pipetas
- Pinza larga
- Placas Petri
- Probetas
- Puntas de micropipeta
- Rollo de papel aluminio
- Tubos de centrifuga
- Vaso de precipitado

3.4. REACTIVOS

- Ácido 3.5 dinitrosalicílico
- Agar
- Agarosa
- Agua destilada
- Agua ultra pura estéril
- DNAsa A.
- Buffer Glicina 50 mM pH 8.6
- Buffer de Reacción 5X GoTaq.
- Carboximetil celulosa (CMC)
- Cebadores
- Cloroformo grado biología molecular
- Cloruro de calcio.
- Dextrosa
- dNTPs (10 mM de cada uno).
- Etanol al 75 por ciento grado biología molecular.
- Fosfato ácido de potasio.
- Glicerol
- GoTaq Polimerasa (5 U/ μ L).
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Isopropanol grado biología molecular.
- Kit comercial Kapa SYBR Fast qPCR Kit Master Mix (2x).
- Marcadores de peso molecular
- $MgCl_2$ 25 mM.
- Nitrógeno líquido
- Peptona
- Sulfato de amonio
- Sulfato de magnesio
- Tampón de carga
- Tween 80
- Urea

3.5. CEPA UTILIZADA

Se utilizó la cepa silvestre *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, aislada de muestras de suelo del departamento de Tingo María (Paul *et al.*, 2017).

3.6. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Papa Dextrosa (PDA): papa 20 por ciento (p/v), dextrosa 10 por ciento (p/v), agar 15 por ciento (p/v).
- Medio producción de celulasas (medio de cultivo Mandels-Reese modificado): CMC 5 g/L; KH₂PO₄ 2 g/L; (NH₄)₂SO₄ 1.4 g/L; urea 0.3 g/L; CaCl₂·2H₂O 0.3 g/L; MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L; peptona 1 g/L; Tween 80 (0.1 por ciento v/v); FeSO₄·7H₂O 5 mg/L; MnSO₄·2H₂O 1.6 mg/L; ZnSO₄·7H₂O 1.4 mg/L; CaCl₂·6H₂O 2 mg/L. Con un pH inicial de 5.5 (Mandels y Reese, 1957; Gutiérrez-Correa y Villena, 2012).

3.7. CONDICIONES DE CULTIVO

3.7.1. Cultivo sumergido

Para los ensayos de cribado fueron empleados tubos de ensayo de 30 ml a los cuales se les añadió 10 ml del medio de producción de celulasas correspondiente al del diseño experimental y un volumen de inóculo de 300 µl (3 por ciento v/v) a una cantidad final de 1x10⁶ esporas. Luego se procedió a colocarlos en agitación a 175 rpm por un período de 72 h a 28 °C en un baño agitado. En los ensayos de optimización, se inoculó un volumen de 2.1 ml (3 por ciento v/v) de suspensión de esporas a una cantidad final de 1x10⁶ esporas/ml a matraces de 250 ml que contenían 70 ml de medio de producción de celulasas correspondiente a los parámetros del diseño experimental. Luego se incubaron a 28 °C en un baño de agitación a 175 rpm por 72 h.

3.8. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Para los ensayos de actividad enzimática se utilizaron los sobrenadantes de cultivo obtenidos mediante filtración, de los sistemas de cultivo.

3.8.1. Determinación de la Actividad Enzimática

El ensayo de actividad de endoglucanasa fue determinado utilizando carboximetil celulosa, la cual, es una forma químicamente modificada y soluble de celulosa (Bono *et al.*, 2009). Este reactivo se empleó al 1 por ciento (p/v) en *buffer* glicina (50 mM, pH 8.6) de acuerdo a lo descrito por Ghose, (1987). Los ensayos de actividad endoglucanasa fueron llevados a cabo en microplacas de acuerdo al método de Xiao *et al.* (2005). La reacción que contenía una mezcla de la enzima y el substrato, fue incubada a 50 °C por 30 minutos, esta se detuvo por la adición de DNS, seguido por una fase de hervor por 5 minutos (Miller, 1959), los productos provenientes de la reducción del DNS fueron medidos en un espectrofotómetro a 540 nm, empleando una solución de glucosa de 1 mg/ml como estándar. La cuantificación de la enzima fue expresada en UI/L, como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones del ensayo.

3.8.2. Diseño experimental

El diseño experimental Plackett-Burman y el diseño Box-Behnken fueron generados y analizados en el *software* Statgraphics Centurión XVI.II (Statpoint Technologies Inc., VA, USA).

a. Fase de cribado

Se aplicó un diseño experimental de cribado denominado Plackett-Burman, el cual se emplea al poseer un número alto de factores a analizar; además estima los efectos principales de cada factor sobre la variable respuesta y omite las interacciones entre los mismos en un número menor de corridas experimentales frente a otros diseños factoriales (Montgomery, 1991).

Sobre la base de la variable respuesta o dependiente (actividad de endoglucanasa), fueron evaluados siete factores (componentes del medio de cultivo) a dos niveles en catorce corridas experimentales aleatorias realizadas por triplicado, buscando el mayor efecto y significancia de tres de estos, para la fase de optimización. Los factores evaluados fueron X₁: CMC (2.5 y 7.5 g/L); X₂: KH₂PO₄ (1 y 3 g/L); X₃: CaCl₂·2H₂O (0.15 y 0.45 g/L); X₄: MgSO₄·7H₂O (0.15 y 0.45 g/L); X₅: Urea (0.15 y 0.45 g/L); X₆: (NH₄)₂SO₄ (0.7 y 2.1 g/L) y X₇: Peptona (0.5 y 1.5 g/L), como se detalla en la Tabla 1. El diseño incluyó un punto central evaluado dos veces, los cuales corresponden al medio de producción de celulasas basal. Los niveles mínimos y máximos de cada factor se establecieron de acuerdo a la revisión de literatura (Das *et al.*, 2013b; Mahmood *et al.*, 2013; Cupul *et al.*, 2014), tomándose el criterio del cincuenta por ciento arriba y abajo para cada factor en base a los niveles basales (Tabla 2). Fueron empleadas dos réplicas en el punto central, además la importancia y significancia de cada factor en la etapa de cribado se determinó mediante el diagrama de Pareto estandarizado y el análisis de varianza (ANVA) ($\alpha = 0.05$).

Tabla 1: Valores de los niveles usados para cada factor evaluado en el diseño Plackett-Burman para la optimización de un medio de cultivo de producción de endoglucanasas de *A. fumigatus* LMB-35Aa

Factor (g/L)	Nivel bajo (-1)	Nivel central (0)	Nivel alto (+1)
X ₁ :CMC	2.5	5	7.5
X ₂ : KH ₂ PO ₄	1	2	3
X ₃ : CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15	0.3	0.45
X ₄ : MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	0.3	0.45
X ₅ : Urea	0.15	0.3	0.45
X ₆ : (NH ₄) ₂ SO ₄	0.7	1.4	2.1
X ₇ : Peptona	0.5	1	1.5

Tabla 2: Arreglo aleatorio del diseño Plackett-Burman para el cribado en función de los niveles (concentración de los componentes del medio de cultivo) para cada factor, considerando la actividad enzimática como variable respuesta de la producción endoglucansasas.

Corrida	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	1	-1	1	1	-1	1	-1
2	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	0	0	0	0	0	0	0
4	1	-1	-1	-1	1	1	1
5	-1	1	1	1	-1	1	1
6	-1	1	-1	-1	-1	1	1
7	-1	-1	1	1	1	-1	1
8	1	-1	1	-1	-1	-1	1
9	1	1	-1	1	1	-1	1
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
11	1	1	1	-1	1	1	-1
12	0	0	0	0	0	0	0
13	1	1	-1	1	-1	-1	-1
14	-1	1	1	-1	1	-1	-1

Donde X₁: CMC, X₂: KH₂PO₄, X₃: CaCl₂·2H₂O, X₄: MgSO₄·7H₂O, X₅: Urea, X₆: (NH₄)₂SO₄ y X₇: Peptona.

b. Fase de optimización

La metodología de superficies de respuesta (MSR) se ejecutó con el diseño Box-Behnken para optimizar los tres factores seleccionados (componentes del medio de cultivo) a partir del diseño de cribado.

Se establecieron quince corridas experimentales realizadas por triplicado y bajo aleatoriedad, de las cuales tres representan los puntos centrales de cada factor respecto a sus niveles altos y bajos, según se detalla en la Tabla 4. Los factores evaluados fueron X₁: CMC (5, 10 y 15 g/L); X₂: KH₂PO₄ (2, 3 y 4 g/L) y X₃: Peptona (1, 2, 3 g/L) (Ver Tabla 3).

La variable respuesta evaluada fue la actividad enzimática de endoglucanasa (U/L). Los gráficos de superficie de respuesta fueron realizados sobre la base de

dos factores en sus respectivos niveles, manteniendo el tercer factor constante al nivel central.

Tabla 3: Valores de los niveles usados para cada factor evaluado (componente del medio de cultivo) en el diseño Box-Behnken para optimización de un medio de cultivo de producción de endoglucanasas para *A. fumigatus* LMB-35Aa.

Factor (g/L)	Nivel bajo (-1)	Nivel central (0)	Nivel alto (+1)
X ₁ :CMC	5	10	15
X ₂ :KH ₂ PO ₄	2	3	4
X ₃ :Peptona	1	2	3

Tabla 4: Arreglo del diseño Box-Behnken en función de los niveles para cada factor, para la etapa de optimización del medio de producción de endoglucanasas para *A. fumigatus* LMB-35Aa

Corrida	X ₁ : CMC	X ₂ : KH ₂ PO ₄	X ₃ : Peptona
1	-1	0	-1
2	-1	0	1
3	0	-1	-1
4	-1	-1	0
5	1	1	0
6	0	-1	1
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	1	0	1
12	1	-1	0
13	-1	1	0
14	0	0	0
15	1	0	-1

Los factores y sus niveles inferiores y superiores se establecieron de acuerdo a la revisión de literatura (Moreno-Galván *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013b) y a lo obtenido en la fase de cribado. La significancia, efecto y valores óptimos de cada

uno de los tres factores seleccionados en la etapa de cribado, se determinó mediante el análisis de varianza (ANVA, $\alpha = 0.05$) y las superficies de respuesta generadas.

3.8.3. Validación del modelo

Las condiciones óptimas de los niveles de las variables independientes, se obtuvieron mediante la metodología de superficie de respuesta. Para la validación, se realizaron tres repeticiones experimentales. Los valores obtenidos experimentalmente (con los niveles óptimos de las variables independientes) se compararon con los valores estimados por el modelo, y se realizó una prueba de significancia no paramétrica de Mann-Whitney en Minitab 18.1, comparando ambas condiciones:

Mann-Whitney: Medio Basal vs Medio Óptimo

Método:

η_1 : mediana del Medio Basal

η_2 : mediana del Medio Óptimo

Diferencia: $\eta_1 - \eta_2$

De acuerdo a los datos:

Lote	Replica biológica	Medio Basal	Medio Óptimo
1	1	122.629	170.446
1	2	120.701	168.904
1	3	121.215	166.076
2	1	75.247	164.533
2	2	84.976	165.765
2	3	91.380	139.533
3	1	104.776	157.564
3	2	119.858	159.163
3	3	101.919	159.277

Muestra	N	Mediana
Medio Basal	9	104.776
Medio Óptimo	9	164.533

Prueba:

Hipótesis nula	$H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$
Hipótesis alterna	$H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$

Valor W	Valor p
45.00	0.0004

Se aprecia que el estadístico de Mann-Whitney fue de 45.00 y el valor de p es 0.0004 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre los resultados de actividad endoglucanasa obtenidos entre la condición basal y óptima con un nivel de confianza del 95 por ciento.

3.8.4. Análisis de expresión de genes de endoglucanasas

Para el análisis de expresión de genes de endoglucanasas, se procedió a realizar las siguientes técnicas:

3.8.5. Extracción de ARN

Se realizó a partir de la biomasa obtenida del cultivo sumergido de *Aspergillus fumigatus*, recuperada mediante filtración. La extracción de ARN se realizó con el kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research) a partir de 50 mg de biomasa previamente pulverizada con nitrógeno líquido, según las instrucciones del fabricante. Las muestras obtenidas de ARN se conservaron a -80 °C hasta su utilización. La concentración de las muestras de ARN se determinó por espectrofotometría en un Nanodrop (Thermo Scientific) a 260, 280 y 230 nm.

3.8.6. Síntesis de ADN copia

Se realizó la síntesis de ADNc mediante transcripción reversa, empleando 2 µg de ARN extraídos a partir de los cultivos sumergidos, utilizando como cebador 0.5 µg/µl de

Oligo(dT)₁₅, 200 U/μl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) (Promega), 25 U de inhibidor RNAsa, 0.5 mM de dATP/dGTP/dCTP/dTTP y 1X de *buffer*; en un volumen final de 25 μl. La reacción se incubó a 42 °C por 60 minutos en un Termociclador S1000™ – BIORAD.

3.8.7. PCR en tiempo real (qPCR)

Se analizaron los genes de endoglucanasas de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, cuyo genoma ha sido publicado recientemente (Paul *et al.*, 2017). Las reacciones de qPCR se realizaron con el kit KAPA SYBR Fast (KAPA Biosystems) utilizando ADNc como cadena molde y como genes de referencia se utilizó *β-tubulina* y *tef1*. La reacción de PCR en tiempo real, consistió en: 1X del tampón Kapa Sybr Fast qPCR (HotStarTaq® DNA Polimerasa, SYBR Green, dNTP mix y 2.5 mM de MgCl₂), 0.3μM de cebador sentido y anti sentido y 1μl de ADNc. La reacción de qPCR se realizó en un volumen de 10μl por triplicado a partir de cada muestra biológica en un Termociclador de Tiempo Real CFX96 (BioRad) utilizando los siguientes parámetros: activación inicial a 95 °C por tres minutos, desnaturalización a 95 °C por tres segundos, alineamiento/extensión y adquisición de datos a 60 °C por 20 segundos durante 40 ciclos. A su vez, se realizó la curva de disociación que incluyó una etapa de desnaturalización a 95 °C por diez segundos y la adquisición de datos a 65-95 °C por cinco segundos. El análisis de la eficiencia de amplificación de los cebadores se realizó en el software LinRegPCR-Versión 2017.1. Mientras que para el cálculo de la expresión relativa se utilizó la ecuación NRQ (Normalized relative quantities) (Hellemans *et al.*, 2007).

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{E_{ref}^{\Delta Ct, ref}}$$

Donde:

E: Eficiencia de amplificación del gen de interés

ΔCt goi: Diferencia del Ct del gen de interés en la muestra versus el control

ΔCt ref: Diferencia del Ct del gen de referencia en la muestra versus el control

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DISEÑO DE CRIBADO - DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN

La metodología del diseño Plackett-Burman, es aquella donde se evalúan los efectos principales de una gran cantidad de factores, estimando solamente los efectos principales, obviándose las interacciones entre ellos en el modelo de primer orden correspondiente al diseño (Kuhad *et al.*, 2011; Briefs, 2013). Se consideraron siete de los factores que componen el medio Mandels de producción de celulasas modificado (Mandels y Reese, 1957; Gutierrez-Correa y Villena, 2012) para realizar la fase de cribado, empleando CMC como fuente de carbono.

El objetivo de esta fase fue seleccionar los tres factores con mayor efecto y significancia sobre la variable respuesta (actividad de endoglucanasa), para la posterior optimización de concentraciones, en el medio de cultivo modificado. El diseño empleó dos réplicas en el punto central, para permitir la estimación de la suma de cuadrados del error (Montgomery, 2002; Myers *et al.*, 2009). El diseño de la matriz Plackett-Burman para la selección de tres factores entre los siete evaluados se muestra en la Tabla 5 con los valores observados y esperados de la actividad de endoglucanasa. El diseño fue creado de manera aleatoria, ejecutándose catorce corridas experimentales, incluyendo dos puntos centrales.

Tabla 5: Arreglo aleatorio del diseño Plackett-Burman en función de los niveles para cada factor en la etapa de cribado, considerando la actividad de endoglucanasa de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa como variable respuesta. Se muestran los valores observados y esperados

Corrida	X ₁ : CMC	X ₂ : KH ₂ PO ₄	X ₃ : CaCl ₂ ·2H ₂ O	X ₄ : MgSO ₄ ·7H ₂ O	X ₅ : Urea	X ₆ : (NH ₄) ₂ SO ₄	X ₇ : Peptona	Observado (UI/L)	Estimado (UI/L)
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	100.196 ± 8.409	102.137
2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	45.772 ± 6.474	47.793
3	0	0	0	0	0	0	0	90.475 ± 5.361	89.319
4	1	-1	-1	-1	1	1	1	89.996 ± 7.336	92.654
5	-1	1	1	1	-1	1	1	85.793 ± 10.922	91.068
6	-1	1	-1	-1	-1	1	1	84.509 ± 15.07	80.427
7	-1	-1	1	1	1	-1	1	79.011 ± 4.015	72.162
8	1	-1	1	-1	-1	-1	1	113.844 ± 6.474	115.866
9	1	1	-1	1	1	-1	1	120.395 ± 13.397	124.953
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	58.575 ± 10.830	60.365
11	1	1	1	-1	1	1	-1	100.100 ± 4.177	95.868
12	0	0	0	0	0	0	0	95.325 ± 6.163	89.319
13	1	1	-1	1	-1	-1	-1	127.160 ± 10.186	123.796
14	-1	1	1	-1	1	-1	-1	59.310 ± 6.596	64.736

Los experimentos fueron realizados por triplicado. Para el análisis estadístico, la variable respuesta evaluada fue la actividad de endoglucanasa (UI/L), los valores obtenidos variaron entre 47.793 hasta 127.160 UI/L. Sobre la base de los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANVA) y el diagrama de Pareto estandarizado, cuatro factores (X_1 , X_2 , X_5 y X_7) mostraron significancia sobre la variable respuesta. La no selección de los tres factores restantes sugiere que no hay contribución de significancia ($p > 0.05$) a la variable respuesta en el nivel de confianza del 95 por ciento, seleccionado para el estudio. Como se observa en la Figura 4, la longitud de las barras es proporcional al efecto sobre la variable respuesta, aquellas que cruzan la línea vertical azul presentan significancia a un nivel de confianza del 95 por ciento (Jayasree *et al.*, 2016). El gráfico de efectos principales en la Figura 5, muestra la media de la variable respuesta predicha como una función de cada factor experimental. Puede observarse que CMC (X_1), KH_2PO_4 (X_2) y peptona (X_7) presentan una pendiente positiva desde el nivel (-1) al (+1), a diferencia de la urea que presentó pendiente negativa. Por esta razón y sobre la base de los resultados obtenidos, este componente no fue considerado para la búsqueda de una región de máximo valor en la fase de optimización (Palvannan y Sathishkumar, 2010; Pirzadah *et al.*, 2014). Además, Shahriarinour *et al.*, (2011), reportó un efecto inhibitorio de urea a concentraciones mayores de 3 g/L en la producción de células con *Aspergillus terreus*.

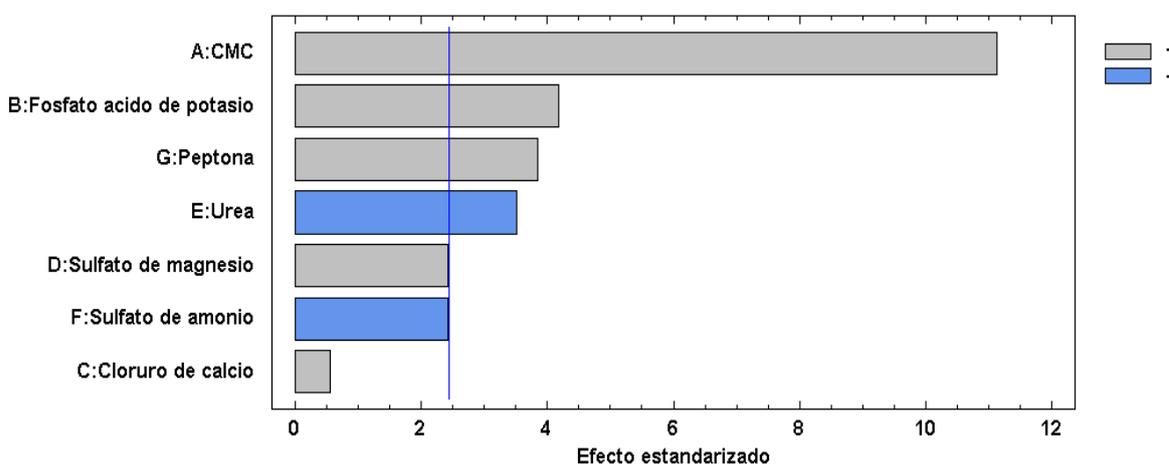


Figura 4: Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño Plackett Burman, donde se muestra la significancia y el efecto de los factores evaluados (componentes del medio para producción de endoglucanasas) considerando un $\alpha=0.05$.

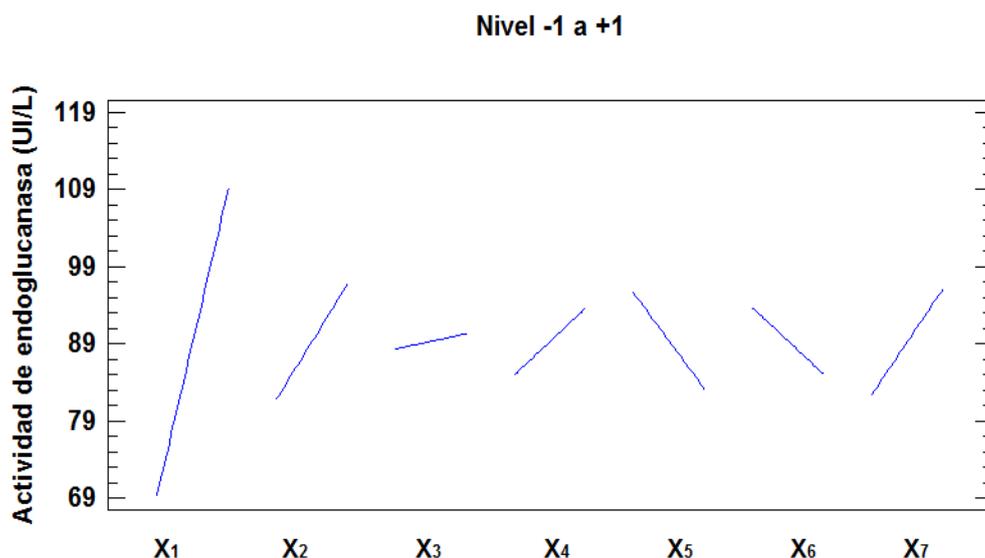


Figura 5: Gráfico de efectos principales sobre la variable respuesta (actividad de endoglucanasa de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa) por cada factor evaluado (componentes del medio) en la etapa de cribado, mediante el diseño experimental Plackett-Burman.

El modelo lineal para este diseño, establece una relación entre la actividad de endoglucanasa (variable dependiente) y los factores (variables independientes): CMC (X_1), KH_2PO_4 (X_2), CaCl_2 (X_3), MgSO_4 (X_4), urea (X_5), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_6) y Peptona (X_7); los cuales se representan en la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de endoglucanasa} = 31.4107 + 7.95738 \cdot X_1 + 7.48937 \cdot X_2 + 6.5831 \cdot X_3 + 28.885 \cdot X_4 - 41.9402 \cdot X_5 - 6.18225 \cdot X_6 + 13.7391 \cdot X_7 \quad \dots (9)$$

Por ello, el análisis de varianza (ANVA) del modelo lineal para el diseño experimental Plackett-Burman (Ver Tabla 6), presentado en la ecuación (9), indica que a un nivel de significancia del 95 por ciento los factores CMC (X_1), KH_2PO_4 (X_2), urea (X_5) y peptona (X_7) fueron significativos ($p < 0.05$) a diferencia de los factores CaCl_2 (X_3), MgSO_4 (X_4) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_6) que no mostraron significancia sobre la variable respuesta evaluada, resultado que se contrasta con lo obtenido en el diagrama de Pareto presentado anteriormente (Figura 4).

Tabla 6: Análisis de varianza (ANVA) para los factores evaluados en la etapa de cribado mediante el diseño Plackett-Burman para optimización de medio de cultivo de producción de endoglucanasas de *A. fumigatus* LMB-35Aa

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
X ₁	4749	1	4749	123.64	0
X ₂	673.089	1	673.089	17.52	0.0058
X ₃	11.701	1	11.701	0.3	0.6009
X ₄	225.272	1	225.272	5.87	0.0517
X ₅	474.924	1	474.924	12.36	0.0126
X ₆	224.735	1	224.735	5.85	0.0519
X ₇	566.286	1	566.286	14.74	0.0086
Error puro	11.7606	1	11.7606		
Error					
Total	230.452	6	38.4087		
Total	7155.46	13			
R-cuadrado = 96.78%					
R-cuadrado (ajustado por g.l.) = 93.02%					

Puede observarse de acuerdo a la Tabla 6 que la suma de cuadrados del error puro presenta un valor pequeño en relación a la suma de cuadrados del total, lo cual indica la correcta reproducibilidad del punto central evaluado y su correspondencia con el modelo lineal (Myers *et al.*, 2009). Además, con respecto al coeficiente de determinación (R^2) se pudo establecer que el 96.78 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo lineal mostrando la adecuación del modelo en predecir el efecto de CMC, KH_2PO_4 y peptona en la producción de endoglucanasas en fermentación sumergida por *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa. El valor del R^2 ajustado fue de 93.02 por ciento, lo cual indicaría un alto grado de correlación entre los valores observados y estimados de la variable respuesta al ser cercano al coeficiente de determinación R^2 (Soni *et al.*, 2010).

Analizando los resultados obtenidos, CMC presentó un efecto muy marcado sobre la variable respuesta, seguido por KH_2PO_4 y la peptona. De acuerdo a los estudios de Pham *et al.* (2010) con una cepa de *Aspergillus niger* VTCC-F021 para la producción de endoglucanasas, el uso de CMC como substrato desde una concentración de 0.1 por ciento hasta el 1 por ciento (p/v), incrementó la producción de celulasas de 0.08 UI/ml a 2.53

UI/ml. También concentraciones mayores al 2 por ciento (p/v), propiciarían un decrecimiento de la actividad de endoglucanasa debido a la saturación del medio de cultivo, la baja transferencia de oxígeno y nutrientes hacia los *pellets* de micelio debido a la viscosidad que genera este sustrato (Phillips, 1966), por lo que se sugiere el uso de soluciones con bajos grados de polimerización pues propician un incremento en las actividades enzimáticas (de Oliveira *et al.*, 2016). El componente KH_2PO_4 en comparación con otras fuentes de fosfato inorgánico evaluadas, influye positivamente en la producción máxima de celulasas y además cumple un efecto tampón en el medio de cultivo, útil para mantener el pH que tiende a acidificarse (Das *et al.*, 2013b). La producción de celulasas es dependiente de las fuentes nitrogenadas empleadas, así como su concentración en el medio de cultivo, lo cual varía con la cepa empleada (Soni *et al.*, 2010). La peptona, ha reportado efectos positivos significativos en la producción de endoglucanasas frente a otras fuentes de nitrógeno con *Aspergillus hortai* bajo condiciones de cultivo por fermentación sumergida, siendo el máximo valor obteniendo el de 0.13 UI/ml (El-Hadi *et al.*, 2014). Por lo general se ha observado que las fuentes de nitrógeno orgánicas producen un mejor efecto sobre la actividad endoglucanasa que las fuentes inorgánicas en el género *Aspergillus*.

4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA VARIABLE RESPUESTA - DISEÑO BOX BEHNKEN

Para la fase de optimización de la actividad de endoglucanasa, se empleó el diseño Box-Behnken considerando los factores seleccionados en la fase de cribado: CMC (X_1), KH_2PO_4 (X_2) y peptona (X_7). Los factores CaCl_2 (X_3), MgSO_4 (X_4), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_5), urea (X_6) fueron mantenidos en sus niveles originales de acuerdo al medio basal. Los factores fueron evaluados en tres niveles (-1, 0, +1) para los ensayos cuantitativos de actividad de endoglucanasa, dando los valores observados y estimados de la actividad para cada corrida experimental del diseño, tal como se observa en la Tabla 7. Las quince corridas experimentales fueron realizadas en orden aleatorio, con tres puntos centrales para la estimación de la suma de cuadrados del error (Montgomery, 2002; Myers *et al.*, 2009).

Tabla 7: Arreglo del diseño Box-Behnken para la fase de optimización de la variable respuesta (actividad de endoglucanasa) en función de los niveles para cada factor

Corrida	X ₁ :CMC	X ₂ :KH ₂ PO ₄	X ₃ :Peptona	Observado (UI/L)	Estimado (UI/L)
1	0	0	0	142.569 ± 11.676	141.137
2	0	-1	-1	122.266 ± 16.289	119.552
3	1	-1	0	154.737 ± 17.111	156.681
4	1	0	1	161.490 ± 18.915	155.854
5	0	1	-1	130.103 ± 15.521	126.411
6	0	0	0	139.532 ± 13.503	141.137
7	1	0	-1	134.667 ± 18.235	135.437
8	0	0	0	141.310 ± 10.762	141.137
9	-1	0	-1	95.607 ± 20.201	101.243
10	-1	-1	0	101.487 ± 8.404	98.5648
11	-1	1	0	112.308 ± 20.866	110.364
12	0	-1	1	137.804 ± 16.474	141.497
13	-1	0	1	104.975 ± 22.734	104.205
14	1	1	0	135.169 ± 23.428	138.09
15	0	1	1	125.131 ± 12.347	127.845

Los resultados presentados en la Tabla 7, indican que la actividad de endoglucanasa varió de 95.60 a 154.73 (U/L) respecto a las corridas experimentales empleadas. El modelo cuadrático obtenido para este diseño, establece una relación entre la actividad de endoglucanasa (variable dependiente) y los factores (variables independientes): CMC (X₁), KH₂PO₄ (X₂) y peptona (X₇); los cuales se representan en la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad endoglucanasa (U/L)} = -82.6503 + 15.0464*X_1 + 55.4632*X_2 + 40.602*X_7 - 0.397062*X_1^2 - 1.51949*X_1*X_2 + 0.872753*X_1*X_7 - 5.28514*X_2^2 - 5.12774*X_2*X_7 - 7.0254*X_7^2 \dots (10)$$

El análisis de varianza (ANVA) del modelo cuadrático obtenido a partir del diseño experimental Box Behnken, que se muestra en la Tabla 8, muestra que los factores CMC (X₁) y peptona (X₇) tuvieron efectos significativos (p<0.05) a diferencia del KH₂PO₄ (X₂). Respecto a los términos cuadráticos, CMC (X₁²) y peptona (X₇²) mostraron efectos significativos (p<0.05) a diferencia del efecto no significativo de KH₂PO₄ (X₂²); sobre la base de las interacciones entre factores. Solo la interacción CMC-KH₂PO₄ (X₁X₂) mostró significancia (p<0.05) a diferencia de las interacciones KH₂PO₄-peptona (X₂X₇) y CMC-peptona (X₁X₇).

Tabla 8: Análisis de varianza (ANVA) de los factores evaluados en la etapa de optimización de componentes del medio de producción de endoglucanasas de *A. fumigatus* LMB-35Aa mediante el diseño Box-Behnken.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
X ₁	3684.54	1	3684.54	135.46	0.0001
X ₂	23.0646	1	23.0646	0.85	0.3994
X ₇	273.282	1	273.282	10.05	0.0248
X ₁ ²	363.826	1	363.826	13.38	0.0146
X ₁ X ₂	230.884	1	230.884	8.49	0.0333
X ₁ X ₇	76.1698	1	76.1698	2.8	0.1551
X ₂ ²	103.136	1	103.136	3.79	0.1091
X ₂ X ₇	105.175	1	105.175	3.87	0.1064
X ₇ ²	182.238	1	182.238	6.7	0.0489
Error puro	4.6564	2	2.3282		
Error total	136.004	5	27.2007		
Total (corr.)	5100.55	14			
$R^2 = 97.33\%$ R^2 (ajustada por g.l.) = 92.53%					

Puede observarse de acuerdo a la Tabla 8 que la suma de cuadrados del error puro presenta un valor pequeño en relación a la suma de cuadrados del total, lo cual indica la correcta reproducibilidad del punto central evaluado (Myers *et al.*, 2009). Además, con respecto al coeficiente de determinación (R^2) se pudo establecer que el 97.33 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático, mostrando la adecuación del modelo en predecir el efecto del CMC, KH_2PO_4 y peptona en la producción de endoglucanasas en fermentación sumergida por *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa. El valor del R^2 ajustado (92.53 por ciento) fue cercano al del R^2 , indicando que existe correlación entre los valores estimados y observados de la actividad de endoglucanasa en la etapa de optimización (Soni *et al.*, 2010).

4.3. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA

A partir del modelo cuadrático de la ecuación (10), se elaboraron los gráficos tridimensionales de superficie de respuesta y los gráficos de contorno bidimensionales respectivos (Figuras 6, 7 y 8), para representar la relación entre las variables independientes y la variable respuesta (actividad de endoglucanasa) a nivel de efectos principales, de interacción y cuadráticos (no lineal). La identificación de los valores óptimos de cada factor, que generen la maximización de la variable respuesta es el principal objetivo de estos gráficos, en conjunto con los análisis previamente mostrados. La formación de cada gráfico resulta de variar dos factores dentro del rango experimental, mientras el tercero se mantiene en su punto central.

Puede observarse que en la Figura 6, al nivel central para el factor peptona (X_7), se estima la variable respuesta en función de la interacción CMC y KH_2PO_4 . El componente KH_2PO_4 presenta un efecto de tendencia negativa sobre la variable respuesta, pues el incremento de su concentración desde 2 g/L hasta 4 g/L genera un decrecimiento de los valores de actividad de endoglucanasa (UI/L), por lo que los valores óptimos para este factor corresponderían a los más cercanos a su nivel (-1). Sin embargo, respecto al componente CMC, su efecto cuadrático genera un incremento de los valores de actividad de endoglucanasa (UI/L) cuando varía desde 5 g/L hasta 15 g/L.

Por otra parte, en la Figura 7 se describe la interacción del efecto de la concentración de CMC (X_1) y peptona (X_7) sobre la variable respuesta, mientras el factor KH_2PO_4 (X_5) se mantiene en su nivel central (0). Tanto CMC como peptona, al incrementar su concentración de 5 g/L a 15 g/L y 1 g/L a 3 g/L respectivamente, generan un aumento de los valores de actividad de endoglucanasa (UI/L), por lo que los valores óptimos de ambos factores se encontrarían en el nivel (+1). En la Figura 8 se observa la interacción del efecto de la concentración de KH_2PO_4 (X_5) y peptona (X_7), mientras el factor CMC (X_1) se mantiene fijado en su nivel central (0). En este caso, el KH_2PO_4 muestra el mismo comportamiento anterior, en el que a 2 g/L la superficie de respuesta alcanza un punto máximo junto a la interacción de la peptona a su nivel (+1).

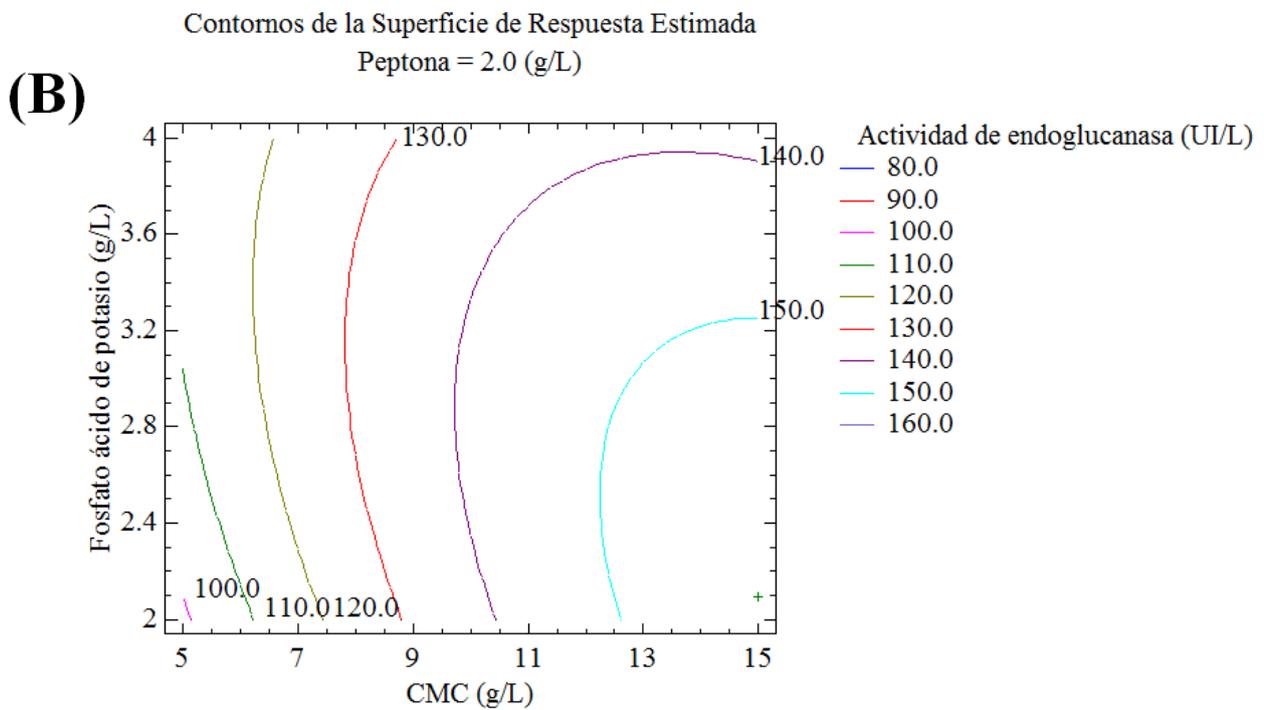
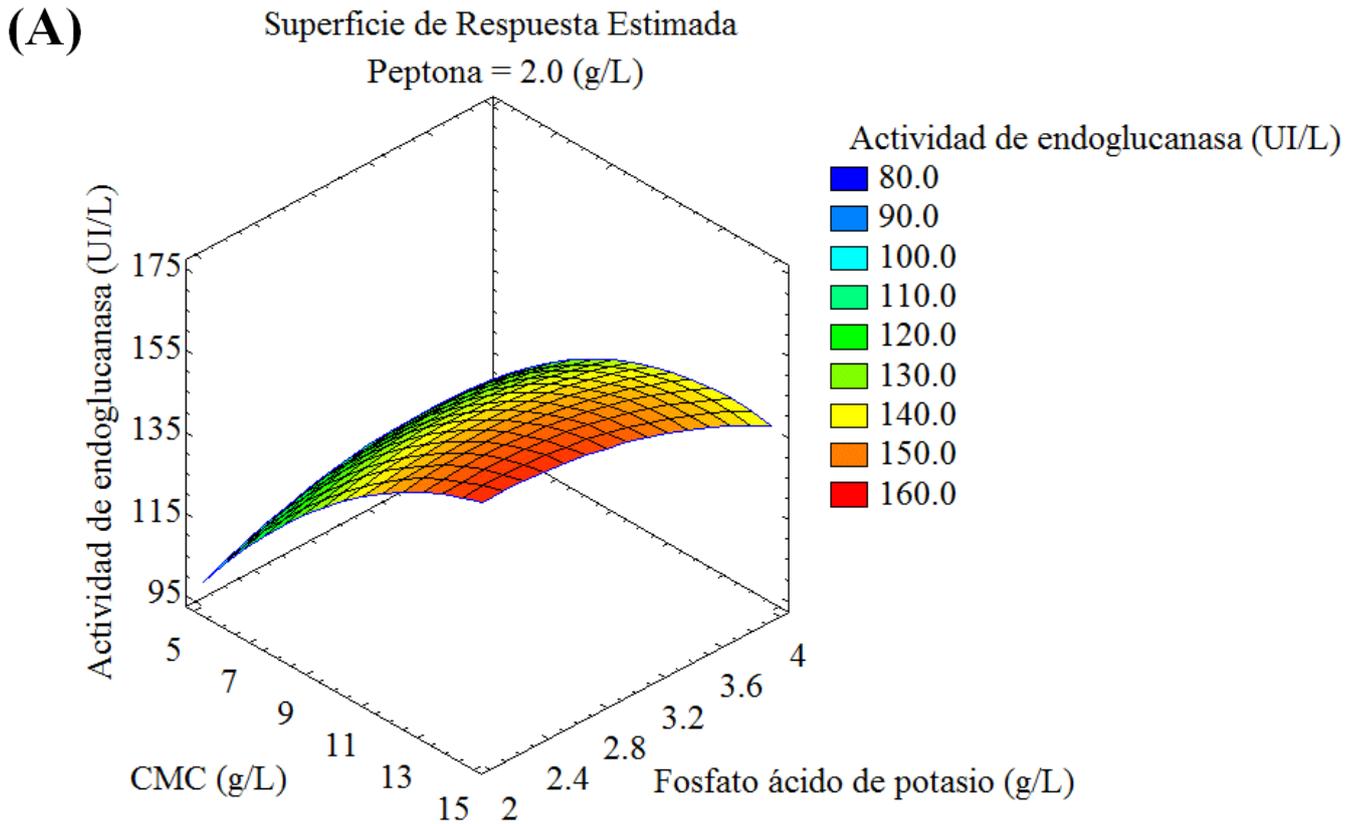


Figura 6: (A) Gráfico de superficie de respuesta del diseño Box-Behnken y (B) gráfico de contorno para los efectos combinados de CMC y KH_2PO_4 en la producción de endoglucanasas por *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa.

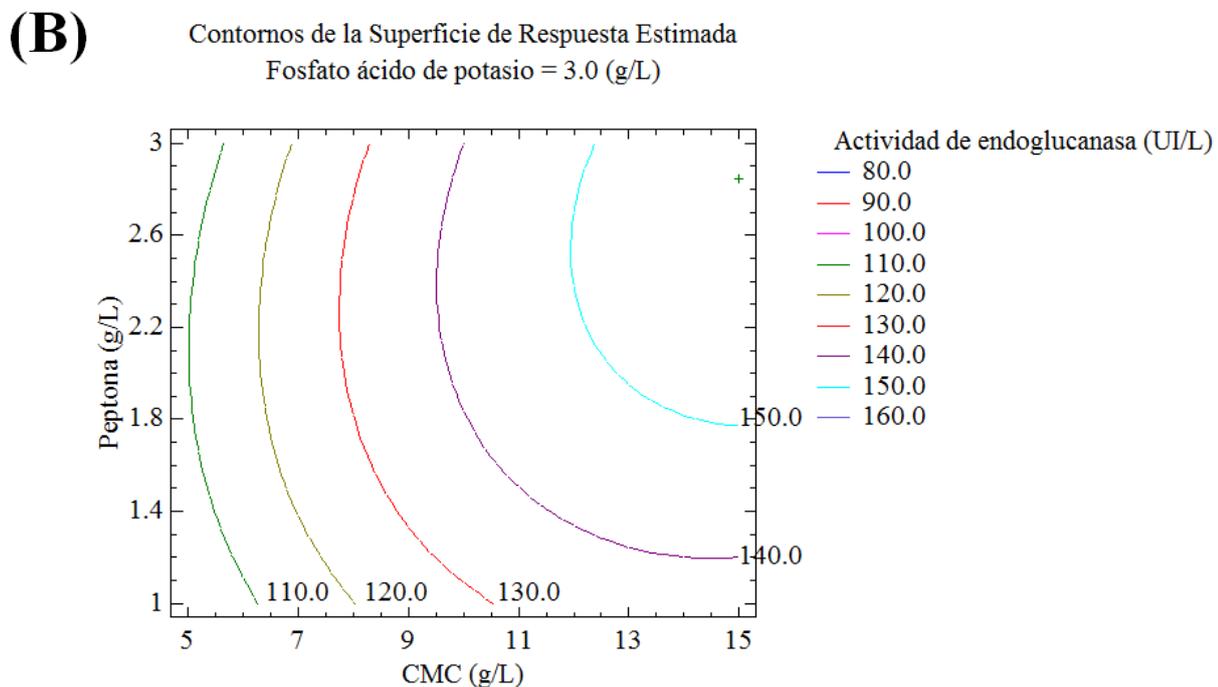
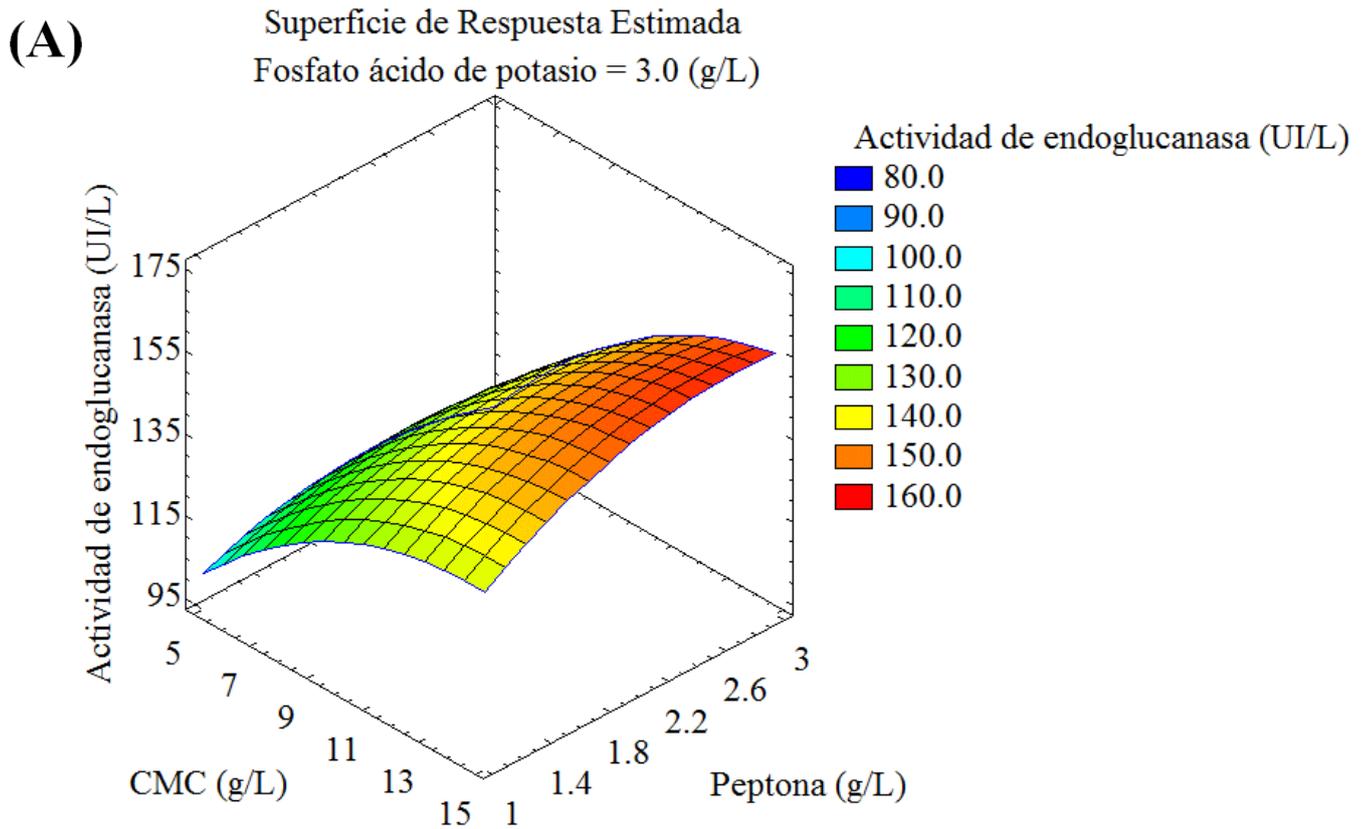
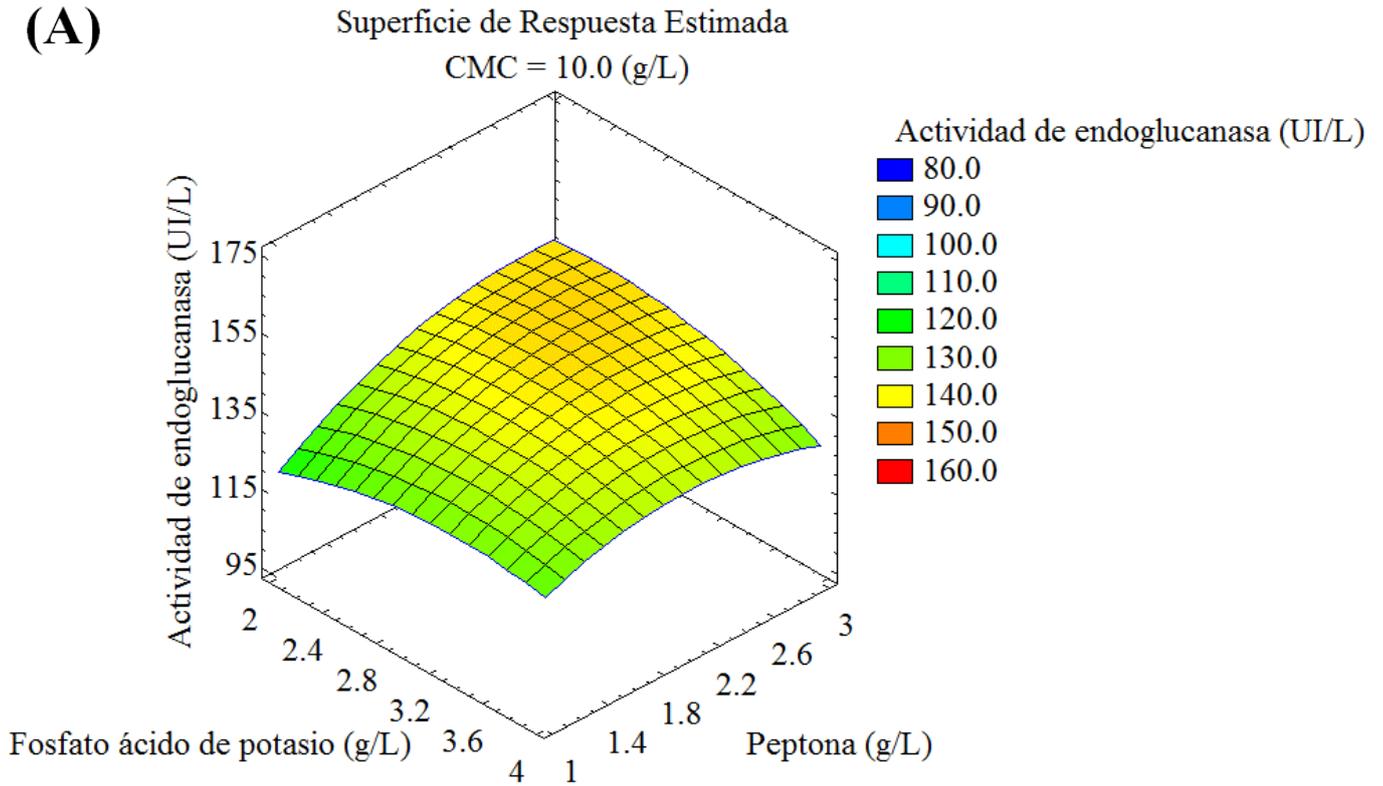


Figura 7: (A) Gráfico de superficie de respuesta del diseño Box-Behnken y (B) Gráfico de contorno para los efectos combinados de CMC y peptona en la producción de endoglucanasas por *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa.

(A)



(B)

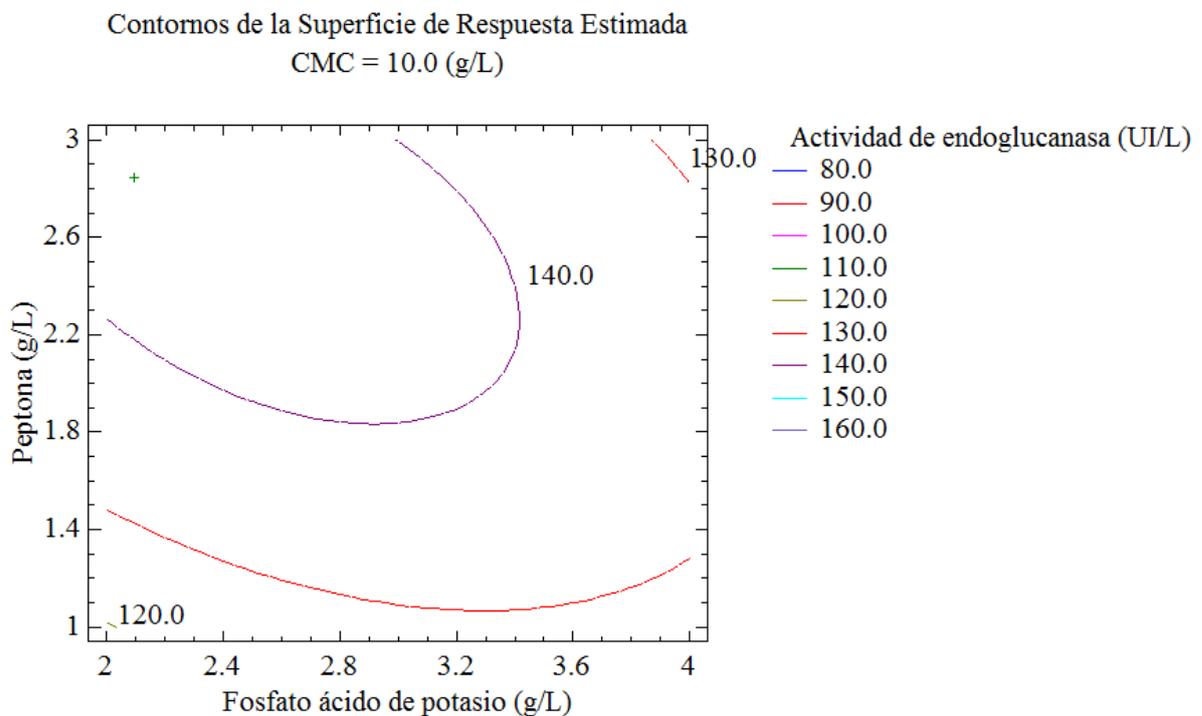


Figura 8: (A) Gráfico de superficie de respuesta del diseño Box-Behnken y (B) Gráfico para los efectos combinados de KH_2PO_4 y peptona en la producción de endoglucanasas por *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa.

Los gráficos de superficies observados, en conjunto con sus respectivos gráficos de contorno, presentaron formas elípticas, lo cual indica los efectos simultáneos o de interacción entre los factores sobre la variable respuesta (Pirzadah *et al.*, 2014). Los valores máximos de actividad de endoglucanasa, se dan en condiciones óptimas deseables con respecto a cada uno de estos factores.

Para la optimización de la producción de celulasas con *Aspergillus fumigatus*, la investigación se ha centrado en los sistemas de fermentación por estado sólido (Sherief *et al.* 2010; Soni *et al.* 2010; Dhillon *et al.* 2011; Liu *et al.* 2011; Ang *et al.* 2013; Das *et al.* 2013a; Mehboob *et al.* 2014; Cherian *et al.* 2016). Las fuentes adecuadas de carbono, fósforo y nitrógeno son factores que afectan en gran medida la producción de celulasas (Das *et al.*, 2013b). En la fermentación sumergida, el incremento de la actividad de endoglucanasa al aumentar los niveles de concentración de CMC podrían deberse al efecto de inducción que ejerce este sustrato sobre la producción de celulasas (Sukumaran *et al.*, 2005). De acuerdo a lo reportado por Das *et al.*, (2013b) en *Aspergillus fumigatus* ABK9, el CMC presentó el mayor efecto de producción de celulasas como única fuente de carbono en fermentación sumergida, siendo los valores óptimos al 1.5 por ciento (p/v). Por otra parte, se ha reportado que el KH_2PO_4 en comparación con otras fuentes de fósforo inorgánico, a una concentración de 0.2 por ciento (p/v) en el medio de cultivo, influye en la producción máxima de celulasas (Das *et al.*, 2013b), además de haber sido mencionado anteriormente que este componente cumple una función de efecto tampón cuando el medio de cultivo se acidifica (Das *et al.*, 2013b).

El mismo comportamiento ha sido observado en otras especies de *Aspergillus*. Para *Aspergillus nidulans*, se determinó el efecto interactivo de CMC junto al KH_2PO_4 en la producción de celulasas en fermentación sumergida, determinando como óptimas las concentraciones de 1.2 g/L y de 1 mg/L respectivamente, para la maximización de su variable respuesta (Jabasingh y Nachiyar, 2010). También, el CMC al 0.5 por ciento indujo la producción de endoglucanasas en una cepa de *Aspergillus terreus* MS105 (Sohail *et al.*, 2016) y al 1 por ciento incrementó la producción de celulasas en *Aspergillus niger* VTCC-F021 (Pham *et al.*, 2010). Sin embargo, concentraciones mayores al 2 por ciento (p/v) de este componente, podrían causar una disminución en la actividad endoglucanasa (de Oliveira *et al.* 2016).

En *Trichoderma* spp., las superficies de respuesta obtenidas en la optimización de la producción de celulasas en cultivo sumergido con medio Mandels, mostró a nivel de las interacciones entre CMC - KH_2PO_4 , CMC - peptona y KH_2PO_4 - peptona, comportamientos similares a los obtenidos en este estudio, con valores máximos para la actividad enzimática de 12 g/L, 2.5 g/L, 2.5 g/L para CMC, KH_2PO_4 y peptona respectivamente, con gráficos de contorno con curvaturas elípticas notables debido a las interacciones de los componentes (Pirzadah *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que la presencia de substratos celulósicos y altas concentraciones de fuentes de nitrógeno orgánicas estimulan la producción de celulasas. El rol de estos componentes en la regulación de la síntesis enzimática no solo depende de la fisiología del hongo con el que se trabaje, sino también de la composición del medio, debido a las posibles interacciones entre estos (Kapich *et al.*, 2004).

4.4. VALIDACIÓN DEL MODELO PREDICTIVO

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa, fue posible optimizar los constituyentes del medio de cultivo. Para validar la predicción del modelo, fueron requeridos experimentos adicionales por triplicado que se realizaron con el medio optimizado para la comparación frente al medio basal, cuya composición fue detallada en la sección de materiales y métodos. Estos experimentos determinaron una actividad de endoglucanasa de 164.53 UI/L. Lo observado entre los resultados predichos y experimentales verificó la validez del modelo y la existencia de los puntos óptimos.

La optimización de la actividad de endoglucanasa permitió encontrar las condiciones que generaran el máximo valor de esta variable respuesta. Los valores óptimos generados por el *software*, fueron de 15 g/L, 2.09 g/L y 2.84 g/L para CMC, KH_2PO_4 y peptona respectivamente, los cuales generarían una respuesta estimada de 164.288 (UI/L), como se observa en la Tabla 9.

Se obtuvo la mediana de la actividad de endoglucanasa de tres repeticiones, siendo el valor obtenido de 164.53 (UI/L), lo cual indicaría un incremento estadísticamente

significativo del 57.08 por ciento respecto al medio basal. Los valores experimentales obtenidos para la variable respuesta demostraron ser muy cercanos al predicho por el modelo, lo cual indicaría que la optimización alcanzada en el presente estudio es confiable, junto a los modelos obtenidos en la fase de cribado y metodología de superficies de respuesta en las regiones de análisis respectivas. Debido a la ausencia de normalidad e igualdad de varianzas entre la condición óptima y basal, no pudo realizarse una prueba paramétrica, por lo que se utilizaron medianas para realizar la prueba Mann-Whitney, que es análoga a la prueba t (Gómez-Gómez *et al.*, 2003).

Tabla 9: Condiciones óptimas recomendadas por la ecuación de segundo orden, respuesta óptima estimada y respuesta óptima experimental para la producción de endoglucanasas de *A. fumigatus* LMB-35Aa

Factores	Valores óptimos (g/L)	Respuesta basal (U/L)	Respuesta óptima experimental (U/L)	Respuesta óptima estimada (U/L)
CMC	15	104.74 ± 18.14	164.53 ± 4.88	164.29
KH ₂ PO ₄	2.09			
Peptona	2.84			

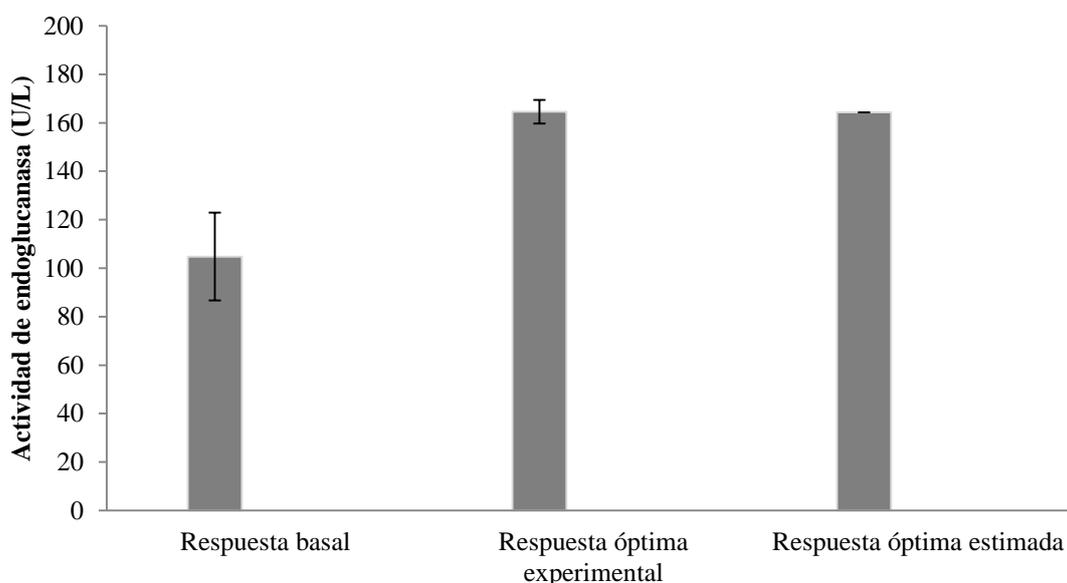


Figura 9: Comparación de medianas entre la condición óptima y la condición basal del medio de producción de celulasas para *A. fumigatus* LMB-35Aa.

Así como en el presente estudio, este diseño experimental ha sido empleado para optimizar y desarrollar medios de cultivo alternativos empleando *Aspergillus fumigatus*, para la producción de biomasa (Moreno-Galván *et al.*, 2012), mejorar la producción de melaninas mediante la optimización de factores (Raman *et al.*, 2015) y la optimización de la producción de celulasas empleando diferentes fuentes de carbono y sistemas de fermentación (Soni *et al.*, 2010; Radhika *et al.*, 2014), por lo que este diseño está ampliamente distribuido en los sectores industriales (Myers *et al.*, 2009).

Existe muy poca información en la literatura respecto a la producción de celulasas por cultivo sumergido en *Aspergillus fumigatus*, incluyéndose las asociadas a condiciones de pH neutroalcalinos (Grigorevski-Lima *et al.*, 2009). Dentro de la literatura revisada, los diferentes valores de actividad enzimática observados, pueden atribuirse a la heterogeneidad de los substratos celulósicos empleados, la respuesta del microorganismo a metabolizar estos substratos, así como también las diferentes condiciones de cultivo como la fermentación sumergida o la fermentación en substrato sólido.

La optimización de medios de cultivo, basados en diseños estadísticos, son un aspecto importante a ser considerado en el desarrollo de las tecnologías de fermentación y los bioprocesos, siendo herramientas muy aplicadas en los sectores industriales y biotecnológicos (Gilna y Khaleel, 2011; Myers *et al.*, 2009).

4.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE ENDOGLUCANASAS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

La optimización del medio de cultivo fue también corroborada a nivel genómico al evaluar la expresión de genes de endoglucanasas encontradas en el genoma de la cepa de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa. *Aspergillus fumigatus* es un hongo saprófito y productor de enzimas extracelulares (Dagenais y Keller, 2009), del cual existen cepas patógenas u oportunistas aisladas como cepas clínicas, tal es el caso de *Aspergillus fumigatus* Af293 (Nierman *et al.*, 2006). La cepa *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa ha sido secuenciada (Paul *et al.*, 2017) y su genoma muestra diferencias con la cepa clínica secuenciada Af293 (Nierman *et al.*, 2006); esto indicaría que la cepa LMB-35Aa

pertenece a un agrupamiento diferente a las cepas clínicas reportadas (Zhao y Gibbons, 2018). El análisis de expresión de genes de endoglucanasas se realizó para verificar si la diferencia observada en la actividad de endoglucanasa entre el medio basal y el medio de producción optimizado guarda correspondencia con la expresión de genes correspondientes.

Fueron evaluados nueve genes reportados en bases de datos genómicas. De estos, *egl 2*, *egl 3* y *Af-egl7* han sido previamente caracterizados como endoglucanasas ácidas (Liu *et al.*, 2011, Bernardi *et al.*, 2018) y dos de ellos *Afu1g12560* y *Afu3g03950* han sido reclasificados como Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos (LPMOs) (de Gouvêa *et al.*, 2018). Los otros genes corresponden a endoglucanasas no caracterizadas, a pesar de haber sido reportados en análisis transcriptómicos. Los genes de endoglucanasas analizados para *Aspergillus fumigatus* se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Genes de endoglucanasas descritos para *Aspergillus fumigatus*

<i>Gen ID</i>	Descripción / <i>CaZy family</i>	Referencias	Cebadores (5' - 3')
<i>Afu7g06150</i>	Endoglucanasa putativa /GH12	Adav <i>et al.</i> (2013) de Gouvêa <i>et al.</i> (2018)	GATCCCAACCATGTCACCTAC
			GTACCACAGCTCCCAGTTATG
<i>Afu6g07480</i>	Endoglucanasa / GH5	Adav <i>et al.</i> (2013) de Gouvêa <i>et al.</i> (2018)	TGGCAGATACAATGGTCAGATT
			GGTCCATGTCGTGATACTCATT
<i>egl2</i>	Endoglucanasa / GH5	Liu <i>et al.</i> (2011)	GATGCGACGTACCTGAATG
			CGAGATGATGTTCCCGTAG
<i>egl3</i>	Endoglucanasa/ GH5	Liu <i>et al.</i> (2011)	GCTCTGGAAGTATCATCTCTTCT
			GTCTGGTCCATATCGTGGTATTC
<i>Afu1g12560</i>	Endo-1,4-beta-glucanasa putativa/AA9*	de Gouvêa <i>et al.</i> (2018)	GGACTGAATGGCCTGAATCT
			CTCCAGAGTAGTCTTGTCAACTG
<i>Afu3g03950</i>	Endoglucanasa putativa/ GH61**	Adav <i>et al.</i> (2013)	CAACAGCGATGGCTCTAACT
			GAGCCCGTTATGGTCATGTT
<i>Afu5g01830</i>	Endoglucanasa extracelular putativa /GH5	Adav <i>et al.</i> (2013) de Gouvêa <i>et al.</i> (2018)	GTCGAACATGGTTGCCTTTG
			GGAGTTGAATCCTCCAGCTTTA
<i>Afu7g01540</i>	Endo-1,4-beta-glucanasa no caracterizada/GH7	Cairns (2011)	CTCGGCGCAAAGGATTACTA
			GTTCCCTGTCGCGGTGTTAT
<i>Af-egl7</i>	Endo-1,4-β-glucanasa/GH7	Bernardi <i>et al.</i> (2018)	GAAATCCGCCGACAGTACAT
			CAGTCCTCGGTAATGGAGTTG

*Recientemente reportadas como Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos dependientes de cobre.

**Familia de Glicósido Hidrolasas 61 CAZy GH61, perteneciente al grupo de Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos dependientes de cobre (Familia AA9).

Fueron empleados dos genes de referencia o *housekeeping genes*: *tef1* y β -*tubulina*, para la normalización de los genes de endoglucanasas evaluados, ya que la expresión de estos genes se mantiene homogénea y constante a diferentes condiciones experimentales (Arya *et al.*, 2015).

En el medio de cultivo optimizado, siete genes (*Afu7g06150*, *Afu6g07480*, *egl2*, *Afu1g12560*, *Afu5g01830*, *Afu7g01540* y *Af-egl7*) mostraron un mayor nivel de expresión con respecto al medio basal (*upregulated genes*), lo cual podría explicar el incremento de la actividad endoglucanasa en esta condición. La Figura 10 muestra el análisis de expresión de genes.

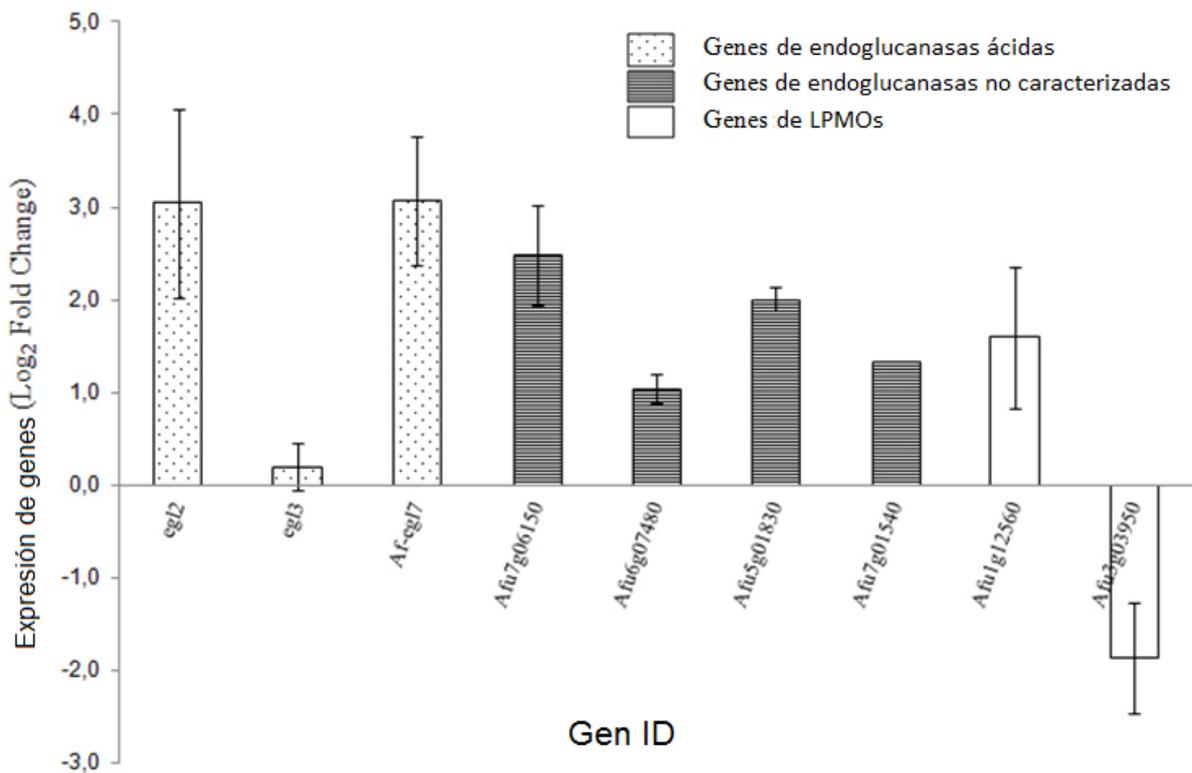


Figura 10: Análisis de expresión de genes de endoglucanasas en *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa en el medio optimizado comparado con el medio basal.

Los genes *egl2* y *egl3* codifican endoglucanasas extracelulares correspondientes a la familia de glicósido hidrolasas 5 (GH5) (Liu *et al.*, 2011). Si bien ambas pertenecen a la misma familia de glicósido hidrolasas, presentan características fisicoquímicas diferentes a nivel proteico, como por ejemplo su estabilidad a pH ácidos, termotolerancia y la

inhibición de *egl2* por metales como Cu^{+2} o Fe^{+3} a nivel de su actividad enzimática (Liu *et al.*, 2011). Estudios demuestran que el CMC actúa como un inductor del gen *egl2* y que a su vez, su expresión es reprimida por la glucosa en *Macrophomina phaseolina* (Wang y Jones, 1995); lo cual sugiere que este mecanismo de inducción y regulación podría estar presente en el gen *egl2* de *A. fumigatus*.

Del mismo modo *Af-egl7* cuya expresión junto a la *egl2* fue la mayor respecto a los demás genes, no son endoglucanasas neutras o alcalinas, pero podrían contribuir con una actividad residual sobre la variable respuesta, ya que pueden retener cierta actividad a pH neutro (Liu *et al.*, 2011). Bernardi *et al.*, (2018) sobre expresaron el gen *Af-egl7* en una cepa Rosetta de *E.coli*, e hicieron la caracterización respectiva de esta enzima, la cual presenta un módulo de unión - carbohidrato (CMB: *Carbohydrate-binding module*). Además, Bernardi *et al.*, (2018), también sugieren que el CMC cumple una función de inducción sobre *Af-egl7*, mostrando un incremento de la expresión en 6400 *folds*, después de las seis horas de cultivo; a su vez, el uso de otros sustratos como bagazo de caña indicaría que *A. fumigatus* podría responder con los mismos mecanismos de inducción, frente a fuentes de carbono complejas sobre la expresión de genes de endoglucanasas. Esto podría sugerir la mayor expresión de *Af-egl7* en el presente estudio, al haberse empleado una concentración de CMC tres veces mayor en el medio optimizado 1.5 por ciento (p/v) frente a la condición basal 0.5 por ciento (p/v).

La enzima LPMO *AfuIgl2560* (previamente anotada como endo-1,4- β -glucanasa putativa, Gautam *et al.*, 2011) tuvo una ligera mayor expresión en el medio de cultivo optimizado frente a la condición basal. La misma enzima ha sido encontrada en el secretoma de *Aspergillus fumigatus* Af293, cultivado con bagazo de caña como sustrato (*Steam Exploded Baggage: SEB*) (de Gouvêa *et al.*, 2018). Otras enzimas LMPO (gi|66846336, gi|66849674) han sido reportadas en *Aspergillus fumigatus* Z5 al ser cultivado en diferentes fuentes de carbono (Liu *et al.*, 2013; de Gouvêa *et al.*, 2018). Las enzimas LPMO pertenecen a la familia AA9, tal como *AfuIgl2560*, y actúan sobre la celulosa, hidrolizando enlaces glicosídicos a través de la oxidación, contribuyendo a la actividad de otras celulasas al darles un mayor acceso hacia el sustrato (Ezeilo *et al.*, 2017).

Por otra parte, el gen *Afu3g03950* también codifica una enzima LPMO dependiente de cobre (de Gouvêa *et al.*, 2018; Hemsworth *et al.*, 2013), ya que la presencia de algunos residuos de aminoácidos cargados negativamente dentro de la estructura de la enzima, permitiría su unión a este metal mediante interacciones electrostáticas y de coordinación, favoreciendo así su actividad enzimática (Khademi *et al.*, 2002; Levasseur *et al.*, 2013). Este gen fue el que presentó un menor nivel de expresión en el medio optimizado, lo cual podría indicar la presencia de algún inhibidor o factor que afecte su regulación bajo las condiciones evaluadas.

Adicionalmente, cuatro genes de enzimas no caracterizadas presentaron un mayor nivel de expresión ($\text{Log}_2 \text{Fold Change} > 1$) en el medio de cultivo optimizado: *Afu7g06150*, *Afu6g07480*, *Afu5g01830* y *Afu7g01540*, ver Figura 10. A la fecha, no se han reportado los pHs óptimos para estas enzimas.

Los genes *Afu7g06150*, *Afu5g01830* presentaron un mayor nivel de expresión en un medio de cultivo que contenía bagazo de caña como sustrato (SEB), *Afu6g07480* también fue detectado en el secretoma de *Aspergillus fumigatus* Af293 (de Gouvêa *et al.*, 2018) y *Afu7g06150* en el secretoma de *Aspergillus fumigatus* Z5, el cual creció en un medio de cultivo con glucosa y residuos de cáscara de arroz (Liu *et al.*, 2013).

El cuarto gen, *Afu7g01540*, ha sido reportado por primera vez en este estudio. Su secuencia ha sido presentada previamente, como parte del genoma de *Aspergillus fumigatus* Af293 (Nierman *et al.*, 2006). Esta endo-1,4- β -glucanasa (probablemente celB) podría actuar sobre la carboximetil celulosa (CMC), hidroxietil celulosa (HEC) y β -glucanos, estando implicada en la compleja degradación de sustratos celulósicos naturales.

A pesar de que *Aspergillus fumigatus* produce principalmente celulasas ácidas, otras endoglucanasas han sido caracterizadas, mostrando buena estabilidad a pH alcalino y neutro (Meera *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2014; Rungrattanakasin *et al.*, 2018), lo cual abre posibilidades a la obtención de celulasas neutro alcalinas. En este sentido, los genes que presentaron un mayor nivel de expresión: *Afu7g06150*, *Afu5g01830*, *Afu6g07480* y

Afu7g01540, podrían proceder a ser clonados y caracterizados en posteriores estudios, para confirmar sus pH óptimos, ya que no se dispone de información relevante en la literatura, sobre ellos.

A la fecha no hay reportes de inhibidores o *enhancers* específicos sobre la expresión de todos los genes evaluados. Sin embargo, fuentes de carbono y nitrógeno como el CMC y la peptona, podrían tener un efecto inductor sobre las endoglucanasas evaluadas; además los subproductos de la degradación de este sustrato como la celobiosa, celotriosa, celotetraosa, glucosa, etc., también podrían afectar la expresión de los estos genes (Liu *et al.*, 2011).

V. CONCLUSIONES

- La cepa *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, ofrece potencial para producir endoglucanasas neutroalcalinas ya que mostró actividad enzimática a un pH de 8.6. Estas características son muy interesantes para su aplicación en procesos que requieran condiciones menos agresivas en los tratamientos textiles, por lo que la biosíntesis de enzimas celulolíticas de comportamiento neutro alcalino por *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa en presencia de un único inductor (CMC).
- El diseño experimental de Plackett-Burman permitió la optimización del medio de producción de endoglucanasas de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa identificando a los componentes CMC, KH_2PO_4 y peptona del medio de producción como los factores con mayor influencia sobre la actividad celulasa (variable respuesta asignada). Las concentraciones óptimas para los componentes seleccionados en la fase de cribado fueron: 15 g/L de CMC, 2.04 g/L de KH_2PO_4 y 2.84 g/L peptona. A estas concentraciones la actividad celulasa neutroalcalina se incrementó en 57.08 por ciento respecto al medio basal no optimizado.
- Los genes *egl2*, *egl3* y *Af-egl7* han sido previamente caracterizados, siendo endoglucanasas ácidas que aportarían un efecto residual sobre la variable respuesta evaluada. Los genes *Afu1g12560* y *Afu3g03950* codifican a enzimas Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos, siendo *Afu3g03950* el gen con menor expresión en la condición óptima, lo cual podría estar ligado a un proceso de regulación no descrito hasta la fecha. La mayor actividad de endoglucanasa detectada en los cultivos con medio de producción optimizado, se correlaciona satisfactoriamente con la mayor expresión de los genes de endoglucanasas descritos para *Aspergillus fumigatus*. Los cuatro genes restantes (*Afu7g06150*, *Afu6g07480*, *Afu5g01830* y *Afu7g01540*) corresponden a endoglucanasas no caracterizadas, que podrían codificar enzimas neutroalcalinas, siendo el gen *Afu7g01540* reportado por

primera vez en este estudio.

- Las herramientas moleculares de transcriptómica resultan muy útiles para complementar estudios de optimización de parámetros en bioprocesos, bajo el modelo de Biotecnología de Sistemas.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda validar los resultados de optimización utilizando reactores a escala de laboratorio y evaluar tanto la actividad enzimática como la expresión de genes. Esto permitirá complementar resultados e información útil para escalamiento.
- Profundizar los estudios de transcriptómica de *A. fumigatus* en el medio optimizado para evaluar todo su potencial biotecnológico.
- Realizar estudios de caracterización sobre las endoglucanasas evaluadas, para relacionar la actividad a pH neutroalcalino y su correspondencia con la expresión.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aanchal N.; Akhtar, K.; Dinesh, G.; Arun, G. 2016. Response surface methodology for optimization of microbial cellulase production. *Romanian Biotechnological Letters* 21(5):11832–11841.
- Abdel-Fattah, Y.R.; Soliman, N.A.; Yousef, S.M.; El-Helow, E.R. 2012. Application of experimental designs to optimize medium composition for production of thermostable lipase/esterase by *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 10(2):193–200.
- Adav, S.S.; Ravindran, A.; Sze, S.K. 2013. Proteomic analysis of temperature dependent extracellular proteins from *Aspergillus fumigatus* grown under solid-state culture condition. *Journal of Proteome Research* 1: 1-17.
- Ang, S.K.; Shaza, E.M.; Adibah, Y.A.; Suraini, A.A.; Madihah, M.S. 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry* 48(1): 1293 - 1302.
- Arya, M.; Shergill, I.S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5(2):209–219.
- Baker, S.E.; Bennet, J.W. 2007. An Overview of the Genus *Aspergillus*. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. 26. 3-13.

- Bernardi, A.V.; De Gouvêa, P.F.; Gerolamo, L.E.; Yonamine, D.K.; De Lourdes de Lima Balico, L.; Uyemura, S.A.; Dinamarco, T.M. 2018. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. *Protein Expression and Purification* 150:1–11.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18:355–383.
- Bono, A.; Ying, P.H.; Muei, C.L.; Sarbatly, R.; Krishnaiah, D. 2009. Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose from palm kernel cake. *Advanced National College of Applied Science* 3: 5-11.
- Box G.E.P.; Draper, N.R. 1987. *Empirical Model-Building and Response-surfaces*. New York: John Wiley & Sons.
- Box, G.E.P.; Behnken, D.W. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2: 455– 475.
- Briefs, A.M.C.T. 2013. Experimental design and optimization: Plackett-Burman designs. *Analytical Methods* 5(8):1901–1903.
- Brown, R.M.; Saxena, I.M. 2000. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:57–67.
- Cairns, T.C. 2011. Early events in *Aspergillus fumigatus* infection: A chronicle of host-pathogen interactions. Ph. D. Thesis. Imperial College London. <http://hdl.handle.net/10044/1/9628>.
- Cherian, E.; Kumar, D.M.; Baskar, G. 2016. Production and optimization of cellulase from agricultural waste and its application in bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Management of Environmental Quality: An International Journal* 27(1): 22–35.

- Choi, J.M.; Han, S.S.; Kim, H.S. 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnology Advances* 33:1443–1454.
- Cupul, W.C.; Abarca, G.H.; Carrera, D.M.; Vázquez, R.R. 2014. Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima-Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett-Burman experimental design. *Electronic Journal of Biotechnology* 17(3):1–8.
- Dagenais, T.R.; Keller, N.P. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* 22(3):447-465.
- Das, A.; Paul, T.; Halder, S.K.; Jana, A.; Maity, C.; Mohapatra, P.K.D.; Pati, B.R.; Mondal, K.C. 2013a. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresource Technology* 128(1): 290–296.
- Das, A.; Paul, T.; Halder, S.K.; Maity, C.; Mohapatra, P.K.D.; Pati, B.R.; Mondal, K.C. 2013b. Study on regulation of growth and biosynthesis of cellulolytic enzymes from newly isolated *aspergillus fumigatus* ABK9. *Polish Journal of Microbiology* 62(1): 31–43.
- Das, A.; Jana, A.; Paul, T.; Halder, S.K.; Ghosh, K.; Maity, C.; Mohapatra, P.K.; Pati, B.R.; Mondal, K.C. 2014. Thermodynamics and kinetic properties of halostable endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* ABK9. *Journal of Basic Microbiology* 53: 1-10.
- De Gouvêa, F.P.; Bernardi, A.V.; Gerolamo, L.E.; Santos, D.S.E.; Riano-Pachon, D.M.; Uyemura, S.A.; Dinamarco, T.M. 2018. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. *BMC Genomics* 19:1-18.
- De Oliveira, M.M.Q.; Ribeiro, G.A.; De Lima, A.L.G.; Do Nascimento, R.P.; Macrae, A. 2016. The influence of carboxymethylcellulose substrate on the

endoglucanase activity produced by *Trichoderma atroviride* 102C1 and *Aspergillus awamori* IOC-3913 in submerged fermentation. JSM Biotechnology & Biomedical Engineering 3(2):1053-1058.

- Dhillon, G.S.; Oberoi, H.S.; Kaur, S.; Bansal, S.; Brar, S.K. 2011. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. Industrial Crops and Products 34(1): 1160 -1167.
- El-Hadi, A.A.; El-Nour, S.A.; Hammad, A.; Kamel, Z.; Anwar, M. 2014. Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences 7(1):23–28.
- Ezeilo, U.R. ; Zakaria, I.I. ; Huyop, F. ; Wahab, R.A. 2017. Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monoxygenases. Biotechnology & Biotechnological Equipment 31: 647-662.
- Fujinami, S.; Fujisawa, M. 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes—past, present and future. Environmental Technology 31(8): 845–856.
- Gautam, P.; Upadhyay, S.K.; Hassan, W.; Madan, T.; Sirdeshmukh, R.; Sundaram, C.S.; Gade, W.N.; Basir, S.F.; Singh, Y.; Sarma, P.U. 2011. Transcriptomic and proteomic profile of *Aspergillus fumigatus* on exposure to artemisinin. Mycopathologia, 172(5):331–346.
- Garibyan, L.; Avashia, N. 2013. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). The Journal of Investigative Dermatology, 133(3), e6.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure & Applied Chemistry 59:257-268.

- Gómez-Gómez, M.; Danglot-Banck, C.; Vega-Franco, L. 2003. Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas: Cuándo usarlas. *Revista Mexicana de Pediatría* 70(2):91–99.
- Gilna, V.V.; Khaleel, K.M. 2011. Biochemistry cellulase enzyme activity of *Aspergillus fumigatus* from mangrove soil on lignocellulosic substrate. *Science And Technology* 3(1):132–134.
- Grigorevski-Lima, A.L.; Da Vinha, F.N.M.; Souza, D.T.; Bispo, A.S.R.; Bon, E.P.S.; Coelho, R.R.; Nascimento, R. 2009. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 155: 321–329.
- Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J.; Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
- Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8: R19
- Hemsworth, G.R.; Davies, G.J.; Walton, P.H. 2013. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology* 23(5):660–668.
- Jabasingh, A.S.; Nachiyar, V.C. 2010. A new combinational statistical approach for cellulase optimization in *Aspergillus nidulans*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(8):871–878.
- Jayasree, D.; Narasu, M.L.; Merugu, R. 2016. Plackett-Burman design for screening media components for alkaline protease production from *Streptomyces pulveraceus* through solid state fermentation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8(1):763–769.

- Kapich, A.N.; Prior, B.A.; Botha, A.; Galkin, S.; Lundell, T.; Hatakka, A. 2004. Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial Technology* 34:187–195.
- Karmakar, M.; Ray, R.R. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology* 6(1):41–53.
- Kaur, H.P.; Joshi, D. 2015. Optimization of cellulase produced by fungus. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 4(02):521–534.
- Khademi, S.; Zhang, D.; Swanson, S.M.; Wartenberg, A.; Witte, K.; Meyer, E.F. 2002. Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. *Biological Crystallography* 58: 660–667.
- Krull, R.; Wucherpfennig, T.; Esfandabadi, M.E.; Walisko, R.; Melzer, G.; Hempel, D.C.; Kampen, I.; Kwade, A.; Wittmann, C. 2013. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 163(2):112-123.
- Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F. 1993. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology* 15:90–99.
- Kuhad, R.C.; Gupta, R.; Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* 2011:1-10.
- Levasseur, A.; Drula, E.; Lombard, V.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels* 6(1): 41.

- Li, S.; Yang, X.; Yang, S.; Zhu, M.; Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2:1–11.
- Liu, D.; Zhang, R.; Yang, X.; Xu, Y.; Tang, Z.; Tian, W.; Shen, Q. 2011. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Expression and Purification* 79(2):176–186.
- Liu, D.; Li, J.; Zhao, S.; Zhang, R.; Wang, M.; Miao, Y.; Shen, Y.; Shen, Q. 2013. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnology for Biofuels* 6:149.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 506-577.
- Mahmood, R.T.; Asad, M.J.; Mehboob, N.; Mushtaq, M.; Gulfraz, M.; Asgher, M.; Hadri, S. H. 2013. Production, purification, and characterization of exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170(4):895–908.
- Mandels, M.; Reese, E.T. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology* 73(2):269–278.
- Mansfield, S.D.; Mooney, C.; Saddler, J.N. 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology Progress* 15(5):804-816.
- Meera, B.; Vanitha, M.C.; Ramani, G.; Manjula, A.; Gunasekaran, P. 2011. Cloning and expression of an intronless gene encoding endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* MKU1. *Indian Journal of Biotechnology* 10: 480-486.

- Mehboob, N.; Asad, M.J.; Asgher, M.; Gulfraz, M.; Mukhtar, T.; Mahmood, R.T. 2014. Exploring Thermophilic Cellulolytic Enzyme Production Potential of *Aspergillus fumigatus* by the Solid-State Fermentation of Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(1): 3646-3655.
- Miettinen-Oinonen, A.; Londesborough, J.; Joutsjoki, V.; Lantto, R.; Vehmaanpera, J. 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology* 34 (3):332–341.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31:426–428.
- Montgomery, D. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. 2 ed. 12:458-462.
- Moreno-Galván, A.; Rojas-Tapias, D.F.; Bonilla, R. 2012. Development and evaluation of an alternative culture medium for mass cultivation of *Azospirillum brasilense* C16 using sequential statistical designs. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 13(2):201–206.
- Myers, R.; Montgomery, D.; Anderson-Cook, C. 2009. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using design experiments*. Third Edition. New Jersey. Editorial Wiley 1:165-267.
- Nierman, W.C.; Pain, A.; Anderson, M.J.; Wortman, J.R.; Kim, H.S.; Arroyo, J. 2006. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438(7071):1151-1156.
- Palvannan, T.; Sathishkumar, P. 2010. Production of laccase from *Pleurotus florida* NCIM 1243 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Journal of Basic Microbiology* 50(4):325–335.
- Paul, S.; Zhang, A.; Ludeña, Y.; Villena, G.K.; Yu, F.; Sherman, D.H.; Gutierrez-Correa, M. 2017. Insights from the genome of a high alkaline cellulase producing

Aspergillus fumigatus strain obtained from Peruvian Amazon rainforest. Journal of Biotechnology 1-7.

- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29(9):2002-2007.
- Pham, T.H.; Quyen, D.T.; Nghiem, N.M. 2010. Optimization of Endoglucanase Production by *Aspergillus niger* VTCC-F021. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 4(9):4151–4157.
- Phillips, D.H. 1966. Oxygen transfer in mycelial *pellets*. Biotechnology and Bioengineering 8:456-460.
- Piña, M.C.M.R.; Rodríguez, M.A.; Benavides, E.M. 2006. Metodología robusta para superficies de respuestas. Cultura Científica y Tecnológica 12:32–45.
- Pirzadah, T.; Garg, S.; Singh, J.; Vyas, A.; Kumar, M.; Gaur, N.; Varma, A. 2014. Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. Springer Plus Open Journal 3:622-634.
- Prabakaran, M.; Themarasu, V.; Mangala, R.A.; Bharathidaran, R.; Chandrakala, N.; Mohan, N. 2009. Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. Indian Journal of Science and Technology 24:46-49.
- Radhika, K.; Addepally, U.; Chiranjeevi, T.; Kota, S.L. 2014. Improved cellulase production using sorghum biomass as carbon source by *Aspergillus* sp. Using Plackett-Burman and response surface methodology under SmF conditions. International Journal of Recent Trends in Science and Technology 13:154–162.
- Raman, N.M.; Shah, P.H.; Mohan, M.; Ramasamy, S. 2015. Improved production of melanin from *Aspergillus fumigatus* AFGRD105 by optimization of media factors. AMB Express 5(1):1–9.

- Rungrattanakasin, B.; Premjet, S.; Thanonkeo, S.; Klanrit, P.; Thanonkeo, P. 2018. Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBiNU-1 in *Kluyveromyces lactis*. Brazilian Journal of Microbiology 49: 647-655.
- Sajith, S.; Priji, P.; Sreedevi, S.; Benjamin, S. 2016. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. Journal of Nutrition and Food Sciences 6(1):1-13.
- Salihu, A.; Bala, M.; Bala, S. 2013. Application of Plackett-Burman Experimental Design for Lipase Production by *Aspergillus niger* Using Shea Butter Cake. ISRN Biotechnology 2013(1): 1-5.
- Samson, R.A.; Visagie, C.M.; Houbaken, J.; Hong, S.B.; Hubka, V.; Klaassen, C.H.W.; Perrones, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G.; Yaguchi, T.; Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology 78(1):343–371.
- Shah S. R. 2013. Chemistry and application of cellulase in textile wet processing. Research Journal of Engineering Sciences 2(7): 1-5.
- Shahriarinnour, M.; Wahab, M.N.A.; Mohamad, R.; Mustafa, S.; Ariff, A.B. 2011. Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. African Journal of Biotechnology 10(38):7459–7467.
- Sherief, A.A.; El-Tanash, A.B.; Atia, N. 2010. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. Research Journal of Microbioly 5(1): 199 – 211.
- Shobana, P.; Maheswari, N.U. 2013. Production of cellulase from *Aspergillus fumigatus* under submerged and solid state fermentation using agricultural waste. International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry 2(4):595–599.

- Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P.K. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 *Biotech* 6(2):174-180.
- Sohail, M.; Ahmad, A.; Khan, S.A. 2016. Production of cellulase from *Aspergillus terreus* MS105 on crude and commercially purified substrates. 3 *Biotech* 6(1): 103.
- Soni, R.; Asiya, N.; Chadha, B.S. 2010. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* Fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products* 31:277–283.
- Steinberg, D.M.; Bursztyn, D. 2010. Response Surface Methodology in Biotechnology. *Quality Engineering* 22(2):78–87.
- Sukumaran, R.; Singhanian, R.; Pandey, A. 2005. Microbial cellulases-Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research* 64:832-844.
- Sun, X.; Liu, Z.; Zheng, K.; Song, X.; Qu, Y. 2008. The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 42:560–567.
- Tichopad, A.; Dilger, M.; Schwarz, G.; Pfaffl, M.W. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research* 31(20):1-6.
- Vandesompele, J.; De Paepe, A.; Speleman, F. 2002. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry* 303:95-98.
- Vega, K.; Villena, G.K.; Sarmiento, V.; Ludeña, Y.; Vera, N.; Gutiérrez-Correa, M. 2012. Production of Alkaline Cellulase by Fungi Isolated from an Undisturbed Rain Forest of Peru. *Biotechnology Research International* 2012:1–7.

- Wang, H.; Jones, R. W. 1995. Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Gene* 158(1): 125–128.
- Wang, Y.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Wang, Y.; Xia, J.; Zhang, S. 2009. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. *Biotechnology Advances* 27(6):989–995.
- Witek-Krowiak, A.; Chojnacka, K.; Podstawczyk, D.; Dawiec, A.; Pokomeda, K. 2014. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology* 160(1):150–160.
- Wong, M.; Medrano, J. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39(1):75–85.
- Xiao, Z.; Storms, R.; Tsang, A. 2005. Microplate-based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. *Analytical Biochemistry* 342(1):176–178.
- Zhang, Y.; Himmel, M.; Mielenz, J. 2006. Outlook for cellulose improvement; Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24:452–48.
- Zhao S.; Gibbons J.G. 2018. A population genomic characterization of copy number variation in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 13(8):e0201611.
- Zhuang, J.; Marchant, M.A.; Nokes, S.E.; Strobel, H.J. 2007. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture* 23(5):679–687.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo basado en el método estándar descrito por Ghose (1987) y adaptado a microplacas de PCR de acuerdo a Xiao et al. (2005)

Reactivos	Blanco reactivo	Blanco CMC	Blanco Muestra	Muestra
Buffer glicina 50 mM pH 8.6	90	30	60	-
Dilución de enzima (μl)	-	-	30	30
Carboximetil celulosa 1% (μl)	-	60	-	60
Incubar la placa a 50 °C durante 30 minutos en el termociclador				
Reactivo DNS (μl)	90	90	90	90
Incubar la placa a 95 °C durante 5 minutos en el termociclador, seguido por enfriamiento a 12 °C				
Traspasar 100 μl de cada pozo de la placa a una placa ELISA				
<ul style="list-style-type: none"> • Agite la placa utilizando el agitador vórtex antes de cada incubación y lea la placa de ELISA en el espectrofotómetro (junto con la curva estándar de glucosa) a 540 nm, calibrando con el blanco reactivo. • Calcular la concentración de glucosa del Blanco CMC, Blanco Muestra y Muestra utilizando la curva estándar o la ecuación de regresión encontradas previamente. • La concentración de glucosa estará dada de la siguiente manera $Glu = M - (BM + BCCM)$ • Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 umol de glucosa por minuto. • La actividad de endoglucanasa se realiza multiplicando la concentración de glucosa *0.00617. 				

Anexo 2: Curva estándar de glucosa para ensayo de actividad de endoglucanasa en microplaca

Reactivos	Blanco reactivo	1	2	3	4	5
Solución estandar de glucosa 1 mg/ml (µl)	-	10	20	30	40	50
Buffer glicina 50 mM pH 8.6	90	80	70	60	50	40
Concentración final de glucosa (ug/ 30 µl)	-	10	20	30	40	50
Incubar la placa junto con las muestras a 50 °C durante 30 minutos en el termociclador						
Reactivo DNS (µl)	90	90	90	90	90	90
Incubar la placa junto con las muestras a 95 °C durante 5 minutos en el termociclador, seguido por enfriamiento a 12 °C						
Traspasar 100 µl de cada pozo de la placa a una placa ELISA						
<p>Agite la placa usando el agitador vórtex antes de cada incubación y lea la placa de ELISA en el espectrofotómetro (junto con la curva estándar de glucosa) a 540 nm, calibrando con el blanco reactivo.</p> <p>Los valores de absorbancia se grafican contra la concentración de glucosa. Sin embargo, resulta conveniente realizar una regresión lineal $y = a + bx$; donde y es la absorbancia, x concentración de glucosa.</p> <p>Los cálculos de concentración de azúcares en la determinación de actividad enzimática se realizan con la ecuación de regresión obtenida.</p>						

Anexo 3: Tabla de eficiencia de cebadores para la amplificación de genes de celulasas y LPMOs de *A. fumigatus*, y genes de referencia

Nombre	Gen	Cebador (5' - 3')	Tamaño (nt)	Tm	GC %	Eficiencia de amplificación	Desv. Est.	C.V %
Afu1	Afu7g06150_Fw	GATCCCAACCATGTCACCTAC	21	62	52.4	1.86	0.031	3.625
	Afu7g06150_Rv	GTACCACAGCTCCCAGTTATG	21	62	52.4			
Afu2	Afu6g07480_Fw	TGGCAGATACAATGGTCAGATT	22	62	40.9	1.86	0.022	2.527
	Afu6g07480_Rv	GGTCCATGTCGTGATACTCATT	22	62	45.5			
Afu3	egl2_Fw	GATGCGACGTACCTGAATG	19	62.3	52.6	1.89	0.019	2.150
	egl2_Rv	CGAGATGATGTTCCCGTAG	19	61.2	52.6			
Afu4	egl3_Fw	GCTCTGGAAGTATCATCTCTTCT	23	60	43.5	1.84	0.012	1.419
	egl3_Rv	GTCTGGTCCATATCGTGGTATTC	23	63.6	47.8			
Afu5	Afu1g12560_Fw	GGACTGAATGGCCTGAATCT	20	62	50	1.86	0.007	0.790
	Afu1g12560_Rv	CTCCAGAGTAGTCTTGTCAACTG	23	62	47.8			
Afu6	Afu3g03950_Fw	CAACAGCGATGGCTCTAACT	20	62	50	1.85	0.029	3.440
	Afu3g03950_Rv	GAGCCCGTTATGGTCATGTT	20	62	50			
Afu7	Afu5g01830_Fw	GTCGAACATGGTTGCCTTTG	20	62	50	1.80	0.036	4.526
	Afu5g01830_Rv	GGAGTTGAATCCTCCAGCTTTA	22	62	45.5			
Afu10	Afu7g01540_Fw	CTCGGCGCAAAGGATTACTA	20	62	50	1.86	0.021	2.508
	Afu7g01540_Rv	GTTCTGTGTCGCGGTGTTAT	19	62	52.6			
Afu11	Afu-egl7_Fw	GAAATCCGCCGACAGTACAT	20	62	50	1.86	0.016	1.824
	Afu-egl7_Rv	CAGTCCTCGGTAATGGAGTTG	21	62	52.4			
btub_Af	β -tubulina_Fw	TTCACTGCTATGTTCCGTCG	20	62	50	1.88	0.035	3.999
	β tubulina_Rv	TCGTTTCATGTTGCTCTCGG	19	62	52.6			
tef1_Af	tef1_Fw	CCATGTGTGTCGAGTCCTTC	20	62	55	1.85	0.069	8.144
	tef1_Rv	GAACGTACAGCAACAGTCTGG	21	62	52.4			