

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“VERIFICACIÓN DE LA CONDICIÓN SAPRÓFITA DE LA
CEPA PRODUCTORA DE CELULASAS NEUROALCALINAS
Aspergillus fumigatus LMB-35Aa Y SUS MUTANTES
MEJORADOS MEDIANTE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN
DIFERENCIAL DE GENES DE CELULASAS Y GENES DE
PATOGENICIDAD”**

Presentada por:

TERESA DAMARIS REBAZA CARDENAS

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“VERIFICACIÓN DE LA CONDICIÓN SAPRÓFITA DE LA
CEPA PRODUCTORA DE CELULASAS NEUROALCALINAS**

Aspergillus fumigatus LMB-35Aa Y SUS MUTANTES

**MEJORADOS MEDIANTE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN
DIFERENCIAL DE GENES DE CELULASAS Y GENES DE
PATOGENICIDAD”**

Presentada por:

TERESA DAMARIS REBAZA CARDENAS

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada ante el siguiente Jurado:

.....
Dra. Doris Zúñiga Dávila

PRESIDENTE

.....
Dr. Víctor Meza Contreras

MIEMBRO

.....
Blgo. Roberto Ramos Chaupin

MIEMBRO

.....
Ph. D. Gretty Villena Chavez

ASESORA

La presente tesis ha sido financiada por el FONDECYT – CONCYTEC mediante
Convenio N.º 181-2015-FONDECYT

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios, por cada detalle, por cada momento.

Agradezco a la Dra. Gretty K. Villena Chávez, mi asesora, que me permitió desarrollar esta investigación en el Laboratorio de Micología y Biotecnología - "Marcel Gutiérrez-Correa". Gracias por sus enseñanzas y su guía constante en el desarrollo de este trabajo.

A la memoria del Dr. Marcel Gutiérrez Correa, un gran maestro, una gran persona, quien fundó el Laboratorio de Micología y Biotecnología que hoy lleva su nombre. Gracias por su legado.

Un agradecimiento especial a la Dra. Ilanit Samolski Klein y a la Dra(c). Yvette Ludeña Hinojosa, quienes aportaron al desarrollo de este estudio, gracias por sus conocimientos y experiencias compartidas.

A FONDECYT - CONCYTEC por permitir el desarrollo de este trabajo 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 mis padres, por su apoyo incondicional y comprensión, por respetar y valorar mi trabajo. A mis hermanos y sus divertidas ocurrencias, que hicieron mis días más amenos.

A cada uno de mis compañeros y amigos del LMB por hacer cada día de trabajo más entretenidos, en especial a Brandon Gárate, por todo el tiempo compartido en las largas jornadas hasta la culminación de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	4
2.2. APLICACIONES INDUSTRIALES DE CELULASAS	5
2.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EN LA INDUSTRIA.....	7
2.4. PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE <i>A. fumigatus</i>	8
2.4.1. Termotolerancia	11
2.4.2. Composición de la pared celular y adhesión a superficies	11
2.4.3. Metabolismo secundario	12
2.4.4. Transportadores de eflujo	12
2.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES EN <i>Aspergillus fumigatus</i> MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. MATERIALES	14
3.1.1. Material biológico	14
3.1.2. Soluciones y reactivos	14
3.1.3. Medios de cultivo	15
3.1.4. Equipos y materiales de laboratorio	15
3.2. METODOLOGÍA	17
3.2.1. Lugar de ejecución	17
3.2.2. Cinética de producción de endoglucanasas neutro-alcalinas de la cepa <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa	17
3.2.3. Identificación de genes candidatos de celulasas neutro-alcalinas de la cepa <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa	17
3.2.4. Evaluación de la expresión de genes celulasas y genes de virulencia y/o patogenicidad de las cepas mutantes de <i>Aspergillus fumigatus</i> (LMB- 35Aa-6I, LMB-35Aa-12II)	18
3.2.5. Identificación de genes indicadores de virulencia y/o patogenicidad de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa	18

3.2.6. Determinación de la influencia de la condición de cultivo en la expresión de genes de virulencia y/o patogenicidad	19
3.2.7. Determinación de la influencia la temperatura de crecimiento en la expresión de genes de virulencia y/o patogenicidad	19
3.2.8. Condiciones de cultivo	19
3.2.9. Procedimientos analíticos	20
3.2.10. Análisis Moleculares	22
3.2.11. Análisis estadístico de datos	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	25
4.1. CINÉTICA PRODUCCIÓN DE PRODUCCIÓN DE β -endoglucanasas	25
4.2. IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS A CELULASAS NEUTRO-ALCALINAS DE <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa.	28
4.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE CELULASAS ENTRE LA CEPA SILVESTRE Y MUTANTES LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II.....	32
4.4. SELECCIÓN DE GENES INDICADORES DE VIRULENCIA.....	35
4.5. INFLUENCIA DE LA CONDICIÓN DE CULTIVO (CULTIVO EN BIOPELÍCULA Y CULTIVO SUMERGIDO) EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INDICADORES DE VIRULENCIA.....	40
4.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA (28 °C y 37 °C) EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INDICADORES DE VIRULENCIA EN BIOPELÍCULAS.	45
4.7. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE PATOGENICIDAD EN LOS MUTANTES LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II.....	47
IV. CONCLUSIONES	49
V. RECOMENDACIONES	50
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
VII. ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Genes de endoglucanasas y LMPOs de <i>Aspergillus fumigatus</i> analizados en este estudio.....	29
Tabla 2: Secuencias de los cebadores para amplificación de genes de β -endoglucanasas para <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa.....	30
Tabla 3: Genes indicadores de patogenicidad identificados en el genoma <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa por comparación con la cepa clínica <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293.	36
Tabla 4: Secuencias de los cebadores para amplificación de genes indicadores de patogenicidad para <i>Aspergillus fumigatus</i> LMB-35Aa.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Hidrólisis enzimática de la celulosa.	5
Figura 2: Genes relacionados a la virulencia de <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
Figura 3: Cinética de producción de β -endoglucanasas con biopelículas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa cultivadas a 28 °C.	25
Figura 4: Cinética de producción de β -endoglucanasas con biopelículas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa cultivadas a 37 °C.	26
Figura 5: Actividad cualitativa de β -endoglucanasas de biopelículas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa a las 72 horas de crecimiento (28 °C y 37 °C) a diferente pH.	26
Figura 6: Rendimientos enzimáticos respecto a la biomasa de los cultivos de biopelículas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa a 28 °C y 37 °C.	27
Figura 7: Actividad específica de los cultivos de los cultivos de biopelículas de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa a 28 °C y 37 °C.	28
Figura 8: Análisis de expresión de 10 genes de β -endoglucanasas y LMPOs en biopelículas de <i>A. fumigatus</i>	31
Figura 9: Actividad cualitativa de endoglucanasas de la cepa silvestre LMB-35Aa y mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II) a las 72 horas en diferentes pHs.	32
Figura 10: Rendimientos enzimáticos respecto a la biomasa de los cultivos en biopelículas de la cepa silvestre LMB-35Aa y mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II).	33
Figura 11: Actividad específica de los cultivos en biopelículas de la cepa silvestre LMB-35Aa y mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II).	33
Figura 12: Expresión relativa de genes de β -endoglucanasas y LMPOs en la cepa silvestre LMB-35Aa respecto a las mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II).	34
Figura 13: Crecimiento de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa a las 72 horas en A) Cultivo sumergido B) Cultivo en biopelículas desarrolladas sobre telas de poliéster. C) Cultivo en biopelículas desarrolladas en placas de poliestireno.	41
Figura 14: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad (matriz extracelular, adhesinas y transportadores de eflujo) de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela de poliéster (BT) y en placas de poliestireno (BP) en comparación al cultivo sumergido.	42

Figura 15: Expresión relativa de los genes indicadores de patogenicidad (micotoxinas y reguladores) de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela de poliéster (BT) y en placas de poliestireno (BP) en comparación al cultivo sumergido.	44
Figura 16: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad (matriz extracelular, adhesinas y transportadores de eflujo) de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela cultivadas a 37 °C en comparación a 28 °C.	46
Figura 17: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad (micotoxinas y reguladores) de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas sobre tela cultivadas a 37 °C en comparación a 28 °C.	47
Figura 18: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad en las cepas mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II) en comparación a la cepa silvestre LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela de poliéster.	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Calidad e integridad del RNA extraído	61
Anexo 2: Eficiencia de las reacciones de amplificación	64
Anexo 3: Análisis estadístico	66

RESUMEN

En la actualidad las celulasas ocupan el tercer lugar dentro del grupo de enzimas industriales de mayor importancia en el mercado. Su aplicación se extiende a diferentes industrias, siendo el sector textil una de las industrias con mayor demanda, especialmente de celulasas que presenten actividad óptima a pH neutro-alkalino. El Laboratorio de Micología y Biotecnología aisló una cepa productora de celulasas neutro-alkalinas, *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa y obtuvo cepas mejoradas por mutagénesis al azar. En el presente trabajo se realizó un análisis de expresión diferencial de 10 genes de endoglucanasas y LMPOs entre la cepa silvestre y mutantes, mostrando una sobreexpresión de los genes *Afu7g06150* y *Afu3g03950* en el mutante *A. fumigatus* LMB-35Aa-6I, mientras que en el mutante *A. fumigatus* LMB-35Aa-12II no se observó diferencias respecto a la cepa silvestre. Asimismo, se logró identificar un gen candidato de β -endoglucanasas neutro-alkalinas, mediante el análisis de expresión de estos 10 genes bajo dos condiciones de temperatura (28 °C y 37 °C) en las cuales se evidenció, previamente, una diferencia significativa en la actividad enzimática a pH neutro-alkalino. Pese a que estas cepas mostraron características prometedoras, *Aspergillus fumigatus* se ha reportado como un patógeno oportunista capaz de causar infecciones agudas en los pulmones de mamíferos. Es así, que resulta imprescindible la verificación de la condición saprófita de esta cepa y mutantes en las condiciones de producción de celulasas neutro-alkalinas. Para este fin, se estudió la influencia de la condición de cultivo (sumergido y biopelículas) y temperatura (28 °C y 37 °C) en la expresión de 15 genes indicadores de patogenicidad. Los resultados mostraron que los genes más importantes asociados a la virulencia, como los que codifican micotoxinas (*gliZ*), moléculas extracelulares (*agd3* y *glfA*) y el regulador de metabolismo secundario (*laeA*), se encuentran reprimidos en biopelículas respecto al cultivo sumergido; mientras que el crecimiento a 37 °C no favoreció la sobreexpresión de los genes de patogenicidad evaluados. El comportamiento observado difiere ampliamente de los resultados obtenidos en estudios con una cepa clínica *Aspergillus fumigatus* Af293, reportada como virulenta. Los resultados obtenidos favorecerían el empleo de la cepa saprófita *A. fumigatus* LMB-35Aa y su mutante *A. fumigatus* LMB-35Aa-6I a nivel industrial, como cepas de uso seguro.

Palabras clave: β -endoglucanasas, biopelículas, patogenicidad, *Aspergillus fumigatus*.

ABSTRACT

At present, cellulases occupy the third place in the group of most important industrial enzymes market. Applications extends to several industries, being the textile industry the one with the highest demand among others, especially for cellulases with optimal activity at neutral-alkaline pH. The Laboratory of Mycology and Biotechnology isolated neutral-alkaline cellulase producer, *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa and obtained improved mutant strains by random mutagenesis. In the present work an analysis of differential expression of 10 endoglucanases and LMPOs genes between the wild type strain and mutants was performed. This showed an overexpression of the *Afu7g06150* and *Afu3g03950* genes in the mutant *A. fumigatus* LMB-35Aa-6I, whereas in the mutant *A. fumigatus* LMB-35Aa-12II no differences were observed in comparison with the wild strain. Likewise, it was possible to identify a candidate neutral-alkaline β -endoglucanase gene, by analyzing the expression of these 10 genes under two temperature conditions (28 °C and 37 °C) in which a significant difference in the enzymatic activity at neutral-alkaline pH was previously shown. Although these strains showed promising characteristics, *Aspergillus fumigatus* has been reported as an opportunistic pathogen capable of causing acute infections in the mammalian lung. For this reason, it was mandatory to verify the saprophytic condition of this strain and its mutants in conditions for the neutral-alkaline cellulase production. The influence of the culture condition (submerged and biofilms) and temperature (28 °C and 37 °C) on the expression of 15 pathogenicity indicator genes was studied. The results showed that the most important genes associated with virulence such as those encoding mycotoxin (*gliZ*), extracellular molecules (*agd3* and *glfA*) and secondary metabolism regulator (*laeA*), are repressed in biofilms respect to the submerged culture; whereas the fungi growth at 37 °C did not drive the overexpression of the pathogenicity genes evaluated. The observed behaviour differs widely from the results obtained in studies with the clinical *Aspergillus fumigatus* Af293 strain, reported as virulent. The results obtained suggest the use of the saprophytic strain *A. fumigatus* LMB-35Aa and its mutant *A. fumigatus* LMB-35Aa-6I at the industrial level, as safety-use strains.

Key words: β -endoglucanases, biofilms, pathogenicity, *Aspergillus fumigatus*.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la búsqueda y aplicación de nuevos procesos que contribuyan al desarrollo sostenible, se ha incrementado a nivel industrial (Chen, 2012). Es así, que la introducción de sistemas microbianos en los procesos industriales ha surgido como una alternativa promisorio, reduciendo costos y asumiendo posiciones más amigables con el ambiente (Erickson *et al.*, 2012).

Después de las amilasas y proteasas, las celulasas son las enzimas de uso industrial más importante en el mercado, debido a que poseen amplias aplicaciones en diversas industrias, incluidos el de detergentes, alimentaria, textiles, producción de papel, entre otros (Sajith *et al.*, 2016; Kuhad *et al.*, 2011). Dentro de estos sectores, destaca la industria textil por su alta demanda para el procesamiento de algodón y otras fibras a base de celulosa. No obstante, esta aplicación se ha visto limitada debido a que estos procesos se llevan a cabo a pHs neutro-alcalinos, mientras que las celulasas comerciales tienen actividad óptima a pH ácido (Araujo *et al.*, 2008; Anish *et al.*, 2007). Por lo tanto, el descubrimiento de nuevas especies microbianas o cepas mutantes productoras de celulasas que posean mayor actividad y estabilidad a condiciones neutro-alcalinas, es un área emergente de investigación con el fin de implementar sistemas microbianos económicamente competitivos en la industria (Vega *et al.*, 2012; Fujinami y Fujisawa, 2010; Miettinen-Oinonen *et al.*, 2004).

Existe un amplio grupo de microorganismos que poseen la capacidad de producir celulasas, pero sólo algunos géneros como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* se utilizan comercialmente para la producción de éstas (Sajith *et al.*, 2016). En años anteriores, el Laboratorio de Micología y Biotecnología aisló la cepa productora de celulasas alcalinas *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, a partir de una muestra de suelo provenientes de la selva de Tingo María- Perú (Paul *et al.*, 2017) y se obtuvieron cepas mejoradas por mutagénesis al azar con dietilsulfato (DES) y peróxido

de hidrógeno (H₂O₂) (Zhang, 2015). Asimismo, se ha realizado el secuenciamiento y anotación inicial del genoma de la cepa silvestre (PRJNA298653), sin embargo, aún falta información relacionada a la fisiología de la cepa nativa y sus mutantes.

Aspergillus fumigatus se caracteriza por ser un organismo saprófito que crece comúnmente en materiales vegetales en descomposición y es capaz de utilizar un amplio rango de sustratos orgánicos y adaptarse eficientemente a diversas condiciones ambientales (Tekaiia y Latgé, 2005). En los últimos años los estudios relacionados a esta especie han aumentado en gran medida debido a su capacidad, como especie oportunista, de producir diversas enfermedades, incluyendo la aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergilosis pulmonar crónica y la aspergilosis invasiva, principalmente en individuos inmunocomprometidos (McCormick *et al.*, 2010). Si bien es cierto, el oportunismo está asociado al estado inmune del paciente; estudios sugieren que ciertas características biológicas del hongo como la capacidad de crecimiento a 37 °C, la formación de biopelículas entre otros, influyen en la patogenicidad de *A. fumigatus* (Bhabhra *et al.*, 2004; Ramage *et al.*, 2011). Por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivo general verificar el carácter saprófito de la cepa productora de celulasas *A. fumigatus* LMB-35Aa y mutantes, mediante el análisis de expresión de genes celulasas y genes indicadores de patogenicidad por PCR en tiempo real.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

- Identificar genes candidatos de celulasas neutro-alcalinas de la cepa silvestre *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa.
- Identificar al menos cuatro genes indicadores de virulencia y/o patogenicidad de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa a partir de los genomas secuenciados y disponibles en la base de datos.
- Determinar, en el tiempo de mayor actividad de celulasas, la influencia de la condición de cultivo: biopelículas y cultivo sumergido en la expresión de genes de virulencia y/o patogenicidad de la cepa silvestre saprófita *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa.

- Determinar, en el tiempo de mayor actividad de celulasas, la influencia de la temperatura de crecimiento (28 °C y 37 °C) en la expresión de genes de virulencia y/o patogenicidad de la cepa silvestre saprófita *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa.
- Evaluar la expresión de genes celulasas y genes de virulencia y/o patogenicidad en biopelículas de cepas mutantes de *Aspergillus fumigatus* (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

En la naturaleza, las celulasas cumplen una función de gran importancia ya que son responsables de la degradación de la celulosa, uno de los biopolímeros más abundante en la tierra (Karmakar y Ray, 2011). Este polímero es un homopolisacárido lineal, semicristalino, compuesto de unidades de D-glucosa que están unidas entre sí por enlaces glicosídicos β - (1,4) (Klemm *et al.*, 2005).

La hidrólisis completa de la celulosa requiere la acción secuencial y sinérgica de tres tipos principales de celulasas, las cuales son agrupadas habitualmente según su actividad: endoglucanasas (EC 3.2.1.4), exoglucanasas (EC 3.2.1.91) y β -D- glucosidasas (EC 3.2.1.21). La hidrólisis inicia con **endoglucanasas** (endo- β -1,4-D-glucanohidrolasa), las cuales actúan hidrolizando las uniones β -1,4-glicosídicos de manera aleatoria en el interior de la cadena amorfa, de modo que reduce el grado de polimerización del sustrato (Figura1). Esto facilita el acceso de las **exoglucanasas** (exo- β -1,4-D glucanasa, celobiohidrolasa), que actúan sobre los extremos no reducidos de la cadena de celulosa, liberando moléculas de celobiosa. Finalmente, las **β -glucosidasas** complementan el proceso de degradación, catalizando la hidrólisis de la celobiosa y liberando β -D-glucosa, la cual es utilizada como fuente de carbono para crecimiento (Sajith *et al.*, 2016; Wood y McCrae, 1979).

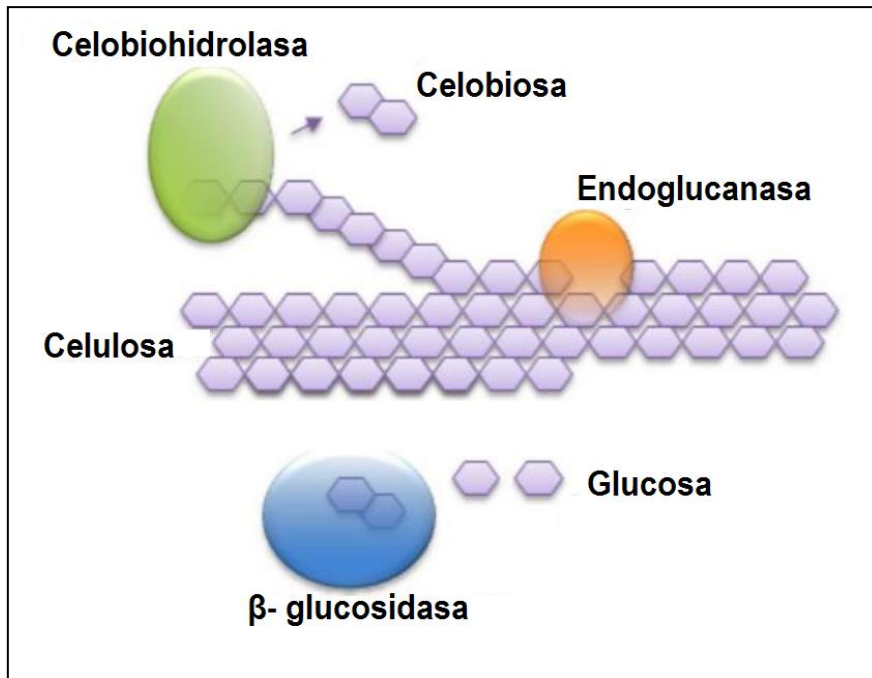


Figura 1: Hidrólisis enzimática de la celulosa.

Diagrama muestra la sinergia entre las celulasas

FUENTE: Tomado de Rani (2011).

2.2. APLICACIONES INDUSTRIALES DE CELULASAS

Las enzimas microbianas han ganado interés debido a su estabilidad, actividad catalítica, así como facilidad de producción (Singh *et al.*, 2016). Estas características hacen que su uso sea ampliamente extendido en diversas industrias. Particularmente, las celulasas ocupan el tercer lugar dentro del grupo de enzimas industriales de mayor importancia en el mercado, siendo utilizadas en industria alimentaria, textil, de detergentes, del papel, así como también en la agricultura (Kuhad *et al.*, 2011).

Por ejemplo, en la industria del papel, las celulasas son utilizadas principalmente para despulpar y remover tintes de papeles usados. Esta aplicación significó mejoras en la eficiencia del proceso y en las propiedades físicas del papel, respecto al uso de métodos químicos tradicionales; además, el uso de enzimas en esta área se presenta como una alternativa amigable con el ambiente al disminuir el uso de químicos nocivos (Viikari *et al.*, 2010).

Las celulasas también son empleadas en la industria de procesamiento de alimentos. Debido a la capacidad de hidrolizar componentes de las paredes celulares, estas enzimas son utilizadas para la extracción de jugos de frutas y vegetales, así como para la extracción de antioxidantes aumentando el rendimiento en comparación con los métodos convencionales de extracción (Ajayi *et al.*, 2015). Otra aplicación de interés, es la producción de biocombustibles a partir de recursos renovables. Dado que la celulosa puede ser usada como materia prima de azúcares fermentables para la producción de bioetanol, las celulasas han adquirido mayor importancia en estos procesos. Las celulasas de hongos filamentosos, incluidos *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* vienen siendo utilizados para estos fines (Chen y Qui, 2010).

Particularmente, la industria textil se ha convertido en uno de los principales sectores para las aplicaciones de celulasas, debido a que alrededor del 70 por ciento de las fibras procesadas por esta industria son de naturaleza celulósica (Galante y Formantici, 2003). Uno de los procesos más utilizados en esta industria es el *stonewashing* o desgaste por piedras, utilizado para la obtención del aspecto desgastado clásico de los pantalones jeans. Sin embargo, este proceso que requiere el uso de piedras pómez, tiene limitaciones como la gran cantidad de piedras requeridas, el daño causado a las máquinas y telas, y dificultad para eliminar residuos. Un método alternativo fue el uso de celulasas, ya que una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedra logrando el mismo efecto, además de conseguir tejidos más lisos y suaves debido a que estas enzimas degradan las microfibras de la superficie, lo que también se conoce como “*biofinishing*” (Agrawal, 2017; Miettinen-Oinonen y Suominen, 2002; Miettinen-Oinonen *et al.*, 2005). Otra de las aplicaciones es en el tratamiento de las telas previo a las tinciones o impresiones para obtener mayor afinidad con los pigmentos, así como también desfibrilación realizada antes y después del teñido (Araujo *et al.*, 2008; Shah, 2013).

Sin embargo, la aplicación de las celulasas en la industria textil se ha visto limitada en gran medida debido a que las enzimas comerciales presentan actividad óptima a pH ácido, mientras que los procesos en esta industria se dan a pH alcalino. Además, se ha reportado que las celulasas neutro- alcalinas son menos ofensivas y no comprometen la resistencia de la tela como las celulasas ácidas (Ben-Hmad y Gargouri, 2017). Es debido a esto, que el reto principal de la biotecnología en esta área, es la búsqueda, desarrollo y aplicación

de enzimas con altas actividades y estabilidad a condiciones alcalinas, integrando así procesos económicamente competitivos.

2.3. *Aspergillus fumigatus* Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EN LA INDUSTRIA

Dentro de las celulasas microbianas de interés comercial, destacan las de origen fúngico debido a que son extracelulares, de naturaleza adaptativa y a menudo se secretan en grandes cantidades durante el crecimiento (Behera *et al.*, 2017). Los hongos altamente celulolíticos incluyen miembros de las especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, entre otros (Sajith *et al.*, 2016).

El género *Aspergillus* alberga una diversidad de hongos filamentosos los cuales están clasificados, sobre la base de caracteres morfológicos y filogenéticos, dentro de la familia *Trichocomaceae*, del orden de los Eurotiales, perteneciente al *phylum Ascomycota* (Leite *et al.*, 2012). Las especies de este género son abundantes en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en el suelo, en donde desempeñan un papel importante en la degradación de sustratos orgánicos, particularmente materiales vegetales (Bennett, 2008). Asimismo, este género comprende un diverso grupo de especies que impactan significativamente la biotecnología, la producción de alimentos, los ambientes interiores y la salud humana (Samson *et al.*, 2014).

Una especie, dentro de este género, estudiada por su potencial biológico es *Aspergillus fumigatus*. En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios en esta especie en torno a la producción de enzimas de importancia industrial. Suresh *et al.* (2013) aislaron una cepa de *A. fumigatus* productora de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y fitasas, examinando la posibilidad de su empleo en la industria, particularmente la fitasa debido a que posee una creciente demanda para su utilización en la alimentación animal. Por otro lado, Oyeleke *et al.* (2010) mostraron que cepas de *A. fumigatus* aislados de residuos de cáscara de arroz, fueron buenos productores de proteasas, enzimas con potencial en múltiples procesos biotecnológicos.

Asimismo, la producción de celulasas empleando cepas de *A. fumigatus* ha sido reportada. Sarkar y Aikat (2014) estudiaron la producción de celulasas y xilanasas de *A. fumigatus* NITDGPKA3 en fermentación sumergida con paja de arroz, obteniendo títulos enzimáticos de 193.58 UI/ml y 6.53 UI/ml, respectivamente. Por su parte, Liu (2011) optimizaron las condiciones de cultivos para la producción de celulasas de una cepa de *A. fumigatus* Z5 en fermentación en estado sólido registrando una actividad celulolítica promedio de 144 U/g. Recientemente se ha secuenciado el genoma completo de la cepa *A. fumigatus* LMB-35Aa, aislada de suelo de la selva amazónica, que posee alta actividad de celulasas neutro-alcalinas, altamente demandado en la industria textil (Paul *et al.*, 2017).

2.4. PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE *A. fumigatus*

La patogenicidad se define como la capacidad de un organismo para infectar a un huésped y provocar una enfermedad (propiedad cualitativa); mientras que el término virulencia hace referencia a la severidad de la manifestación de la enfermedad en los individuos infectados (propiedad cualitativa) (Thomas y Elkinton, 2004).

Aproximadamente 40 de las 250 especies de *Aspergillus* han sido reportadas como patógenos, siendo *A. fumigatus* el hongo filamentoso patogénico más relevante en los seres humanos debido a que causan una variedad de enfermedades, incluyendo la aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergilosis pulmonar crónica y la aspergilosis invasiva. (McCormick *et al.*, 2010).

La capacidad de crecimiento en un amplio rango de condiciones ambientales y su diseminación eficiente en el aire hacen de *A. fumigatus* un patógeno ubicuo al que los seres humanos se exponen diariamente en la mayor parte del mundo (Kwon-Chung, y Sugui, 2013). La inhalación de conidias rara vez causa alguna enfermedad, debido a que estos son eliminados eficazmente por las defensas pulmonares en un individuo inmunocompetente. Sin embargo, la probabilidad de que las conidias germinen y causen enfermedades invasivas se incrementa significativamente en individuos inmunocomprometidos (Tekaiia y Latgé, 2005).

Pero además, la patogenicidad de este microorganismo depende tanto del estado inmune del paciente como de sus rasgos de virulencia y/o características biológicas del hongo. A diferencia de la mayoría de los patógenos, que tienen rasgos de virulencia específicos, la virulencia de *A. fumigatus* implica un conjunto de características que han evolucionado en respuesta a la competitividad del organismo en su nicho ambiental, generalmente, materia vegetal en descomposición (Kwon-Chung, y Sugui, 2013). Se cree que estas características desarrolladas también promueven el crecimiento y la supervivencia en un huésped humano. Y a pesar que muchos de los genes responsables de estas características no se ajustan a la definición clásica de un factor de virulencia, son igualmente importantes y hasta imprescindibles para la patogénesis de esta especie (Askew, 2008).

Se han descrito numerosos factores que influyen en la virulencia de este hongo, los cuales se clasifican de acuerdo con el proceso involucrado (Figura 2). Estos factores pueden estar asociados a la termotolerancia, composición de la pared celular, la capacidad de causar daños en un huésped, su capacidad de crecimiento y adaptación a condiciones de estrés entre otros (Abad *et al.*, 2010). A continuación, se abordará brevemente los factores relevantes que influyen en la virulencia de *A. fumigatus*.

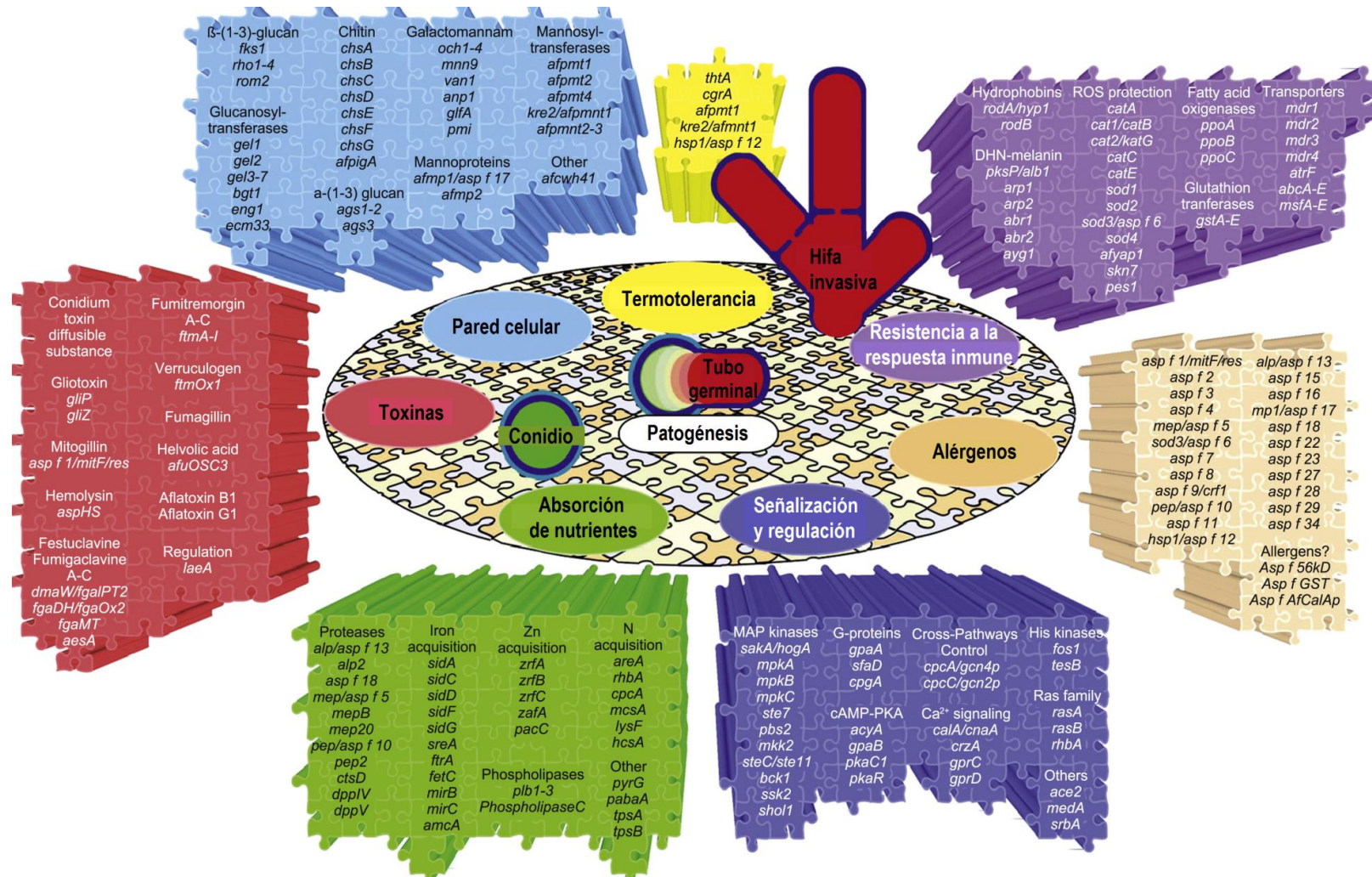


Figura 2: Genes relacionados a la virulencia de *Aspergillus fumigatus*.

FUENTE: Tomado de Abad *et al.* (2010).

2.4.1. Termotolerancia

A menudo se cita como un potencial factor de virulencia debido a que *A. fumigatus* es capaz de crecer a 55 °C y sobrevivir a más de 75 °C. Si bien es cierto esta habilidad es esencial para prosperar en la descomposición de la materia orgánica, también permite la infección de huéspedes mamíferos (Bhabhra y Aswek, 2005). Por lo tanto, los genes involucrados con la termotolerancia podrían contribuir a la virulencia. Estudios previos apoyan esta correlación a medida que la disrupción de genes que reducen la termotolerancia en los hongos también están asociados a un fenotipo de virulencia atenuada (Bhabhra *et al.*, 2004).

2.4.2. Composición de la pared celular y adhesión a superficies

La pared celular es la estructura responsable de la interacción con el huésped, por lo que algunas moléculas de la pared celular están directamente relacionadas a la virulencia de este hongo. Se han identificado diversos componentes de la pared celular, entre ellos el β -glucano uno de los patrones moleculares asociados a patógenos de la pared celular (PAMP) de mayor importancia, pues la interacción con los receptores del huésped orienta la respuesta hacia la muerte o el crecimiento fúngico que conduciría al desarrollo de la enfermedad. Otra molécula importante es el galactoaminogalactano que posee propiedades inmunosupresoras directas, además de estar involucrada en la formación de biopelículas actuando como una adhesina (Latgé *et al.*, 2017).

Es necesario resaltar que para muchos patógenos, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Candida*, la patogenicidad dependen de la adherencia celular a una superficie, por lo que las moléculas de la pared celular involucradas en la formación de biopelículas pueden ser considerados factores de virulencia pues aumentan la resistencia a los antifúngicos, favorecen la producción de enzimas extracelulares necesarias para la colonización e infección, y la resistencia a la respuesta inmune (Ramage *et al.*, 2011).

2.4.3. Metabolismo secundario

A. fumigatus secreta numerosos metabolitos secundarios en su entorno, que aparentemente son producidos para protegerse de depredadores y competidores en su nicho ecológico, pero también podrían contribuir a su patogenicidad (Abad *et al.*, 2010). Se conoce que la metiltransferasa LaeA en *A. fumigatus* es un regulador global de los clústeres de genes de metabolitos secundarios y se ha demostrado que se requiere para la virulencia de *A. fumigatus* en ratas (Perrin *et al.*, 2007). Por otro lado, la gliotoxina es una toxina que ha atraído el mayor interés en *A. fumigatus* debido a sus potentes propiedades inmunosupresoras y citotóxicas y al hecho de que puede detectarse fácilmente durante la infección experimental y en sueros de pacientes con aspergilosis (Rementería *et al.*, 2005). Otra toxina de importancia es la mitogilina la cual está relacionada con el proceso alérgico y tiene fuertes efectos tóxicos que causan muerte celular incluso a bajas concentraciones (Abad *et al.*, 2010). Asimismo, se ha reportado que la toxina hemolisina codificada por el gen *aspHs*, tiene actividad hemolítica en eritrocitos de conejo y oveja y efectos citotóxicos sobre macrófagos y células endoteliales *in vitro* y puede detectarse durante la infección *in vivo* (Rementería *et al.*, 2005).

2.4.4. Transportadores de eflujo

Las bombas de eflujo y proteínas transportadoras podrían considerarse factores de virulencia defensivos, debido a que la reducción de la susceptibilidad a los fármacos proporciona una ventaja afectando directamente la virulencia del microorganismo. En *A. fumigatus* se ha reportado que miembros de la familia MDR (transportadores de tipo ABC) se encuentran sobreexpresados en biopelículas respecto a las formas planctónicas (Kaur y Sing, 2014).

Otros factores que influyen en la virulencia están asociados con la resistencia a la respuesta inmune, captación de nutrientes en el crecimiento invasivo, respuesta a condiciones de estrés, etc. En este trabajo se abordarán los genes más representativos para la evaluación de la patogenicidad.

2.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES EN *Aspergillus fumigatus* MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR)

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) representa un desarrollo importante de la tecnología de PCR, ya que permite el seguimiento de la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción, en lugar de a punto final como ocurre con la PCR convencional (Arya *et al.*, 2005). Se ha empleado esta técnica para el estudio de la expresión de genes relacionados a la virulencia de *Aspergillus fumigatus*. Gravelat *et al.* (2008) realizaron un análisis de PCR en tiempo real en muestras de pulmón de ratones con aspergilosis pulmonar invasiva para determinar la expresión de los genes de *A. fumigatus* que se expresan en etapas específicas del desarrollo de la infección. Este estudio reveló que genes necesarios para la síntesis de micotoxinas como *aspHS*, *gliP*, *mitF* y *metAP* se expresaron en niveles significativamente más altos durante la infección invasiva *in vivo* respecto a ensayos *in vitro*.

Asimismo, Guruceaga *et al.* (2018) compararon los patrones de expresión génica de *A. fumigatus* durante diferentes estadios, temprano (24h) y avanzados (72 y 96 h) de una infección intranasal murina. El análisis de qPCR mostró una sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis de fumagilina y enzimas líticas en estadios avanzados, lo que sugiere que la producción de la micotoxina fumagilina y las enzimas líticas contribuyen al daño tisular y permite el progreso de la infección.

En otro estudio se propuso el gen *aspHS*, que codifica una hemolisina, como un nuevo objetivo para la detección específica de *A. fumigatus* mediante PCR cuantitativa. Los resultados mostraron que se pudo detectar la presencia de *A. fumigatus* con alta especificidad empleando este factor de virulencia como gen diana, debido a que se sobreexpresa *in vivo* durante la infección (Abad *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material biológico

Se emplearon la cepa productora de celulasas neutro-alcálinas *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa aislada de suelo de bosque de Tingo María - Perú (Paul *et al.*, 2017) y sus mutantes LMB- 35Aa-6I y LMB-35Aa-12II obtenidos por mutagénesis al azar con dietilsulfato (DES) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Zhang, 2015).

3.1.2. Soluciones y reactivos

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico.
- Agar.
- Agarosa.
- Agua libre de nucleasas.
- Albúmina Bovina Sérica.
- Alcohol 75 y 96%.
- Buffer Acetato 50 mM pH 4,8.
- Buffer Borax 50 mM pH 7,6.
- Buffer Glicina-NaOH 50 mM pH 8.4 y pH 9.4.
- Carboximetilcelulosa.
- Cloroformo grado biología molecular.
- Cloruro de sodio 1 M.
- Dextrosa.
- Dinucleótidos trifosfatados.
- Etanol de grado biología molecular.

- Glicerol.
- Glucosa 10 mg/ml.
- Hidróxido de sodio 0,1 N.
- Kit comercial Kapa SYBR Fast qPCR Kit Master Mix (2x).
- Nitrógeno líquido.
- Peptona.
- Reactivo de Folin.
- Rojo Congo al 0.5%.
- Tween 80.

3.1.3. Medios de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA): papa 5% p/v, dextrosa 20% p/v, Agar 1.5% p/v

Medio de Mandels y Reese modificado (Mandels y Reese, 1960). Contenido por litro de medio de cultivo: 2 g KH_2PO_4 ; 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 g úrea; 0,3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g peptona; 2 mL Tween 80; 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,4 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; y 5 g carboximetilcelulosa. Con un pH inicial de 5,5.

3.1.4. Equipos y materiales de laboratorio

- Agitador magnético.
- Asa de Kölle.
- Autoclave vertical.
- Balanza analítica digital.
- Baño María a 50 °C.
- Beakers de 150, 250, 500, 1000 ml.
- Cámara de flujo laminar horizontal.
- Cámara Neubauer.
- Congeladora -20 °C.
- Congeladora -80 °C.

- Equipo de electroforesis horizontal.
- Espectrofotómetro UV/Visible.
- Guantes de látex.
- Guantes de nitrilo.
- Horno de secado.
- Horno microondas.
- Incubadora de 28 °C y 37 °C.
- Matraces erlenmeyer de 250 ml y 125 ml.
- Matraces Kitazato de 1000 ml.
- Mechero de alcohol.
- Microcentrífuga.
- Micropipetas de 0.5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl.
- Microplacas de cultivo celular de 12 pocillos.
- Microplacas de PCR de 96 pocillos.
- Microscopio óptico.
- Microtubos de 1.5 ml y 2 ml.
- Mortero y pilón.
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).
- Papel aluminio.
- Papel filtro de paso rápido.
- Parafilm.
- Pinza larga.
- Pipetas graduadas de 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml.
- Placas ELISA.
- Placas Petri 90 mm.
- Potenciómetro.
- Probetas de 1000 ml, 100 ml y 50 ml.
- Puntas de micropipetas de 0.5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl.
- Shaker temperado.
- Tela poliéster.
- Termociclador de Tiempo Real CFX96 (BioRad).
- Termociclador S1000TM–BioRad.

- Transiluminador.
- Tubos Corning de 50 ml.
- Vaso de precipitado de 50 ml, 100 ml.
- Vórtex.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Lugar de ejecución

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez-Correa” perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2.2. Cinética de producción de endoglucanasas neutro-alcalinas de la cepa *A. fumigatus* LMB-35Aa

La determinación del tiempo de mayor actividad de celulasas se obtuvo mediante el análisis de la cinética de producción de β -endoglucanasas. Para ello, se realizaron cultivos de biopelículas a 28 °C y 37 °C utilizando el procedimiento descrito en la sección 3.2.8. La fermentación se llevó a cabo por triplicado y la obtención del extracto enzimático se realizó a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas). Posteriormente se cuantificó la actividad β -endoglucanasa a pH 4.8, 7.6, 8.4 y 9.4 (Ver sección 3.2.9).

3.2.3. Identificación de genes candidatos de celulasas neutro-alcalinas de la cepa *A. fumigatus* LMB-35Aa

Para la identificación de genes candidatos de celulasas neutro-alcalinas, se realizaron cultivos en biopelículas a dos temperaturas (28 °C y 37 °C) durante 72 horas y se correlacionaron los datos de producción enzimática con la expresión diferencial de 10 genes de endoglucanasas y LMPOs en dichas condiciones.

Luego de 72 horas de incubación, se utilizó el procedimiento descrito en la sección 3.2.9

para la determinación de actividad específica y rendimiento enzimático respecto a biomasa. Asimismo, para los análisis moleculares, transcurrido el tiempo de incubación se recuperó la biomasa y se procedió a la extracción de RNA, síntesis de DNA copia y desarrollo de PCR en tiempo real, según las indicaciones de la sección 3.2.10.

3.2.4. Evaluación de la expresión de genes celulasas y genes de virulencia y/o patogenicidad de las cepas mutantes de *Aspergillus fumigatus* (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II)

Para el análisis de expresión diferencial de los genes de celulasas y patogenicidad entre la cepa silvestre y mutantes, se realizaron cultivos en biopelículas de las 3 cepas a 37°C durante 72 horas. Posteriormente se llevaron a cabo las extracciones de RNA, síntesis de DNA copia y las reacciones de PCR en tiempo real.

Asimismo, se cuantifico actividad enzimática, actividad específica y rendimiento respecto a biomasa (Ver sección 3.2.9) de los cultivos de la cepa nativa y sus mutantes, lo cual será correlacionado con los resultados de expresión de los genes de celulasas.

3.2.5. Identificación de genes indicadores de virulencia y/o patogenicidad de *A. fumigatus* LMB-35Aa

La selección de los genes indicadores de virulencia y/o patogenicidad se realizó a partir de genes reportados como involucrados en la patogenicidad de la cepa clínica *A. fumigatus* Af293. Posteriormente, se identificaron los genes seleccionados en el genoma de la cepa silvestre *A. fumigatus* LMB-35Aa (PRJNA298653), mediante el alineamiento de las secuencias disponibles en la base de datos utilizando el BLASTnt (*Basic Local Alignment and Search Tool*, NCBI).

3.2.6. Determinación de la influencia de la condición de cultivo en la expresión de genes de virulencia y/o patogenicidad

La evaluación de la influencia del sistema de cultivo en la expresión de genes de patogenicidad, se realizó mediante el análisis de expresión diferencial de estos genes entre un cultivo sumergido y un cultivo en biopelículas. Para ello se llevaron a cabo las fermentaciones en ambos sistemas e incluyendo un cultivo de biopelículas en microplacas tal como se describe en la sección 3.2.8. Transcurrido el tiempo de incubación de 72 horas, se recuperó la biomasa y se procedió a la extracción de RNA, síntesis de DNA copia y PCR en tiempo real, según las indicaciones detalladas en la sección 3.2.10.

3.2.7. Determinación de la influencia la temperatura de crecimiento en la expresión de genes de virulencia y/o patogenicidad

Para la determinación de la influencia de la temperatura en la expresión de genes de patogenicidad, se realizó cultivos en biopelículas a 28 °C y 37 °C durante 72 horas. Recuperada la biomasa se utilizó el procedimiento descrito anteriormente para el PCR en tiempo real.

3.2.8. Condiciones de cultivo

Las cepas se mantuvieron en matraces de 125 ml con agar papa dextrosa (PDA) por tres días hasta su esporulación. En condiciones estériles, se utilizó una solución de Tween 80 al 0.1 por ciento para obtener suspensiones de 10^6 esporas/ml, la cual se utilizó como inóculo para todas las condiciones de cultivo evaluadas.

a. Cultivo biopelículas

Para el crecimiento en biopelículas, se utilizaron telas de poliéster de 3.1 x 3.1 cm, previamente lavadas con agua destilada y secadas a 80°C, fueron usadas como soporte. En condiciones de esterilidad, se inocularon 2,1 ml de suspensión de esporas en matraces de 250 ml conteniendo la tela de poliéster y 70 ml de agua destilada. Luego se incubó por 15 min en baño agitado a 175 rpm, para permitir

la adhesión de esporas al soporte. Transcurrido este periodo, los soportes se lavaron dos veces con agua destilada en baño agitado bajo las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el soporte se transfirió a matraces conteniendo 70 ml de medio de Reese y Mandels modificado y se incubó en agitación a 175 rpm (Villena y Gutiérrez-Correa, 2006).

Además, se realizó cultivo de biopelículas en microplacas, sistema utilizado en el estudio de factores de virulencia implicados en la formación de biopelículas de cepas clínicas como *Candida albicans* (Silva-Dias *et al.*, 2015). Para esto, se emplearon microplacas de poliestireno de 12 pocillos y se inocularon 90 µl de suspensión de esporas en cada pocillo conteniendo 3 ml de medio de Reese y Mandels modificado. Las placas fueron incubadas a 37 °C.

b. Cultivo sumergido

Se inocularon 2,1 ml de suspensión de esporas en matraces de 250 ml conteniendo 70 ml de medio de Reese y Mandels modificado. Los matraces fueron incubados en agitación a 175 rpm a 37 °C.

3.2.9. Procedimientos analíticos

Luego del periodo de incubación, los cultivos se filtraron al vacío sobre papel filtro de paso medio previamente pesado. Los filtrados fueron colectados y preservados a -20 °C para su posterior uso en los ensayos de actividad enzimática y determinación de proteína soluble.

a. Determinación de Biomasa

La biomasa retenida sobre el papel filtro previamente pesado, se colocó a 80 °C por 24 horas. Se determinó la biomasa por diferencia de peso, respecto al papel filtro y al soporte utilizado (tela poliéster). Los resultados fueron expresados en gramos y se utilizaron para calcular el rendimiento respecto a biomasa de cada cultivo.

b. Determinación de Proteína Soluble

El contenido de proteína soluble de las muestras se determinó usando el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) empleando albúmina de suero de bovino (BSA) para la elaboración de la curva estándar. Los resultados fueron expresados en mg/ml y se utilizaron para calcular la actividad enzimática específica de cada filtrado.

c. Determinación de Actividad de B-endoglucanasas

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron de acuerdo a lo descrito por Ghose (1987) adaptado para microplacas según Xiao *et al.* (2005). Para este propósito, se empleó microplacas de PCR de 96 pocillos, donde en cada pocillo se colocó 30 μ l de enzima y 60 μ l de CMC al 1 por ciento y se incubó durante 30 minutos a 50 °C. Además, se consideró un blanco muestra, un blanco sustrato y un blanco reactivo. Para la cuantificación de los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis, se añadió 90 μ l de DNS y se incubó a 95°C por 5 minutos, seguido por un enfriamiento. Finalmente, 100ul de la mezcla fue transferida a una microplaca de microtitulación transparente y fondo plano y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro para microplaca. Se define como unidad enzimática (U) a la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de glucosa por minuto.

La solución de glucosa de 1mg/ml para la elaboración de la curva estándar y el CMC al 1 por ciento, fueron preparados en el buffer respectivo según el pH a evaluar (Buffer Acetato 50 mM pH 4.8, Buffer Borax 50 mM pH 7.6, Buffer Glicina 50 mM pH 8.4 y pH 9.4). Todas las muestras y estándares se evaluaron por triplicado.

Para los ensayos de actividad enzimática cualitativa, 100 μ l de muestra fueron incorporados en orificios de 6 mm de diámetro, distribuidos de manera equidistante en placas con agar al 1.5 por ciento y CMC al 0.3 por ciento. Las placas fueron incubadas a 50 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó una solución de Rojo Congo al 0.5 por ciento durante 15 minutos para finalmente lavar el gel con NaCl 1M. El proceso de tinción y lavado se realizó usando un agitador orbital a 50 rpm.

3.2.10. Análisis Moleculares

a. Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando el kit Direct-zoil RNA Miniprep (Zymo Research) a partir de 50 mg de biomasa previamente pulverizada con nitrógeno líquido, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración e integridad de las muestras de RNA se determinó por espectrometría utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific) y electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento, respectivamente. Las muestras obtenidas de RNA se conservaron a -80 °C.

b. Síntesis de DNA copia (cDNA)

A partir del RNA extraído se realizó la síntesis de DNA copia (cDNA) mediante transcripción reversa (RT-PCR) por acción de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) (Promega). En un volumen final de reacción de 25 µl, se empleó 200 U/µl de la enzima, 2 µg de ARN, 25 U de inhibidor RNAsa, 0.5 mM de dNTP mix, 1X de buffer y 0.5 µg/µl de Oligo(dT)₁₅ como cebador. La reacción de RT-PCR se realizó en un Termociclador S1000TM-BIORAD a 42 °C por 60 minutos. Los productos fueron conservados a -20 °C.

c. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores se empleó el *software* Primer QuestSM de “Integrated DNA Technologies”, Inc (www.idtdna.com) y las secuencias de nucleótidos de los diferentes genes de celulasas y de patogenicidad de *A. fumigatus* se obtuvieron de la base de datos depositadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information -www.ncbi.nlm.nih.gov). El diseño se llevó a cabo teniendo en cuenta los parámetros recomendados para PCR en tiempo real, los mismos que incluyen: el contenido de GC el cual debe ser de 50-60 por ciento, el tamaño amplicón de 75-200 pb, T_m de cebadores de 57-63 °C y una diferencia no mayor a 3 °C de T_m cada pareja de cebadores, además, de evitar la formación de estructuras secundarias y dímeros.

d. PCR en tiempo real

Las reacciones de amplificación se prepararon por triplicado en microplacas de 96 pocillos utilizando el *kit* KAPA SYBR Fast (KAPA Biosystems). La reacción de PCR en tiempo real contenía 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, en un volumen final de 10µl. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador de Tiempo Real CFX96 (BioRad). Las condiciones generales de amplificación consistieron en un ciclo inicial a 95 °C durante 3 min (activación de la enzima y desnaturalización del ADN), seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 3 seg (desnaturalización) y 60°C durante 20 seg (hibridación y extensión). Tras la amplificación se incluyó un paso de disociación en el que se realiza una medida continua de la fluorescencia emitida en un rango de 60-95 °C aumentando la temperatura 0,2 °C/s. Este paso permite identificar la presencia de dímeros y verificar la especificidad de la reacción mediante el análisis de la curva de disociación del amplicón.

Eficiencia de las reacciones de amplificación

El cálculo de eficiencia de las reacciones de amplificación se llevó a cabo construyendo curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de DNA copia. Se graficó los valores de Ct en función del logaritmo de la concentración DNA copia, para cada dilución. A partir de esta gráfica se obtuvo la ecuación de la recta, la misma que permitió calcular la eficiencia del ensayo mediante la siguiente ecuación:

$$E = (10^{-1/m} - 1) * 100$$

Donde E: es la eficiencia del ensayo expresada en porcentaje, y m es la pendiente de la recta de la gráfica obtenida (Pfaffl, 2001).

Cálculo de expresión relativa

Para el cálculo de la expresión relativa se utilizó la ecuación NRQ (*Normalized*

relative quantities) (Hellemans *et al.*, 2007):

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{\sqrt{\prod_o^f E_{ref_o}^{\Delta Ct, ref_o}}}$$

Donde:

E = eficiencia de amplificación

goi = gen de interés

ref = gen de referencia o normalizador

ΔCt = diferencia del Ct de la muestra problema vs. la muestra control o calibrador (Ct control - Ct muestra

En el presente estudio se utilizó el gen de β -tubulina (*btub*) y factor de elongación (*tefl*) como genes normalizadores y como muestra control o calibradora el cultivo desarrollado a 28 °C y crecimiento en cultivo sumergido, según sea el caso.

3.2.11. Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue llevado cabo utilizando el programa InfoStat. Todos los análisis se realizaron luego de verificar el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de las varianzas y normalidad de residuales, a un nivel de confianza de 95 por ciento ($\alpha = 0.05$). Se utilizó la prueba de análisis de varianza para evaluar la existencia de diferencias significativas considerando el rendimiento enzimático o actividad específica como la variable respuesta según sea el caso.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. CINÉTICA PRODUCCIÓN DE PRODUCCIÓN DE β -endoglucanasas

Para determinar el tiempo de mayor título enzimático, se realizó la cinética de producción de β -endoglucanasas hasta las 120 horas, a dos temperaturas. Los cultivos se realizaron en un sistema de cultivo en biopelículas y la actividad enzimática de los filtrados obtenidos se cuantificó a pH 4.8, 7.6, 8.4 y 9.4. En la figura 3 y 4 se muestran los resultados de la cinética a 28 °C y 37 °C respectivamente. En ambas temperaturas, la máxima producción de β -endoglucanasas se dio a las 72 horas a todos los pHs evaluados sin mostrar diferencias significativas con los valores obtenidos a las 96 y 120 horas (Anexo 3.1 y 3.2). Estos resultados coinciden con los reportados por Das *et al.* (2013) en lo que obtienen mayor actividad β -endoglucanasa entre las 60-80 horas de fermentación.

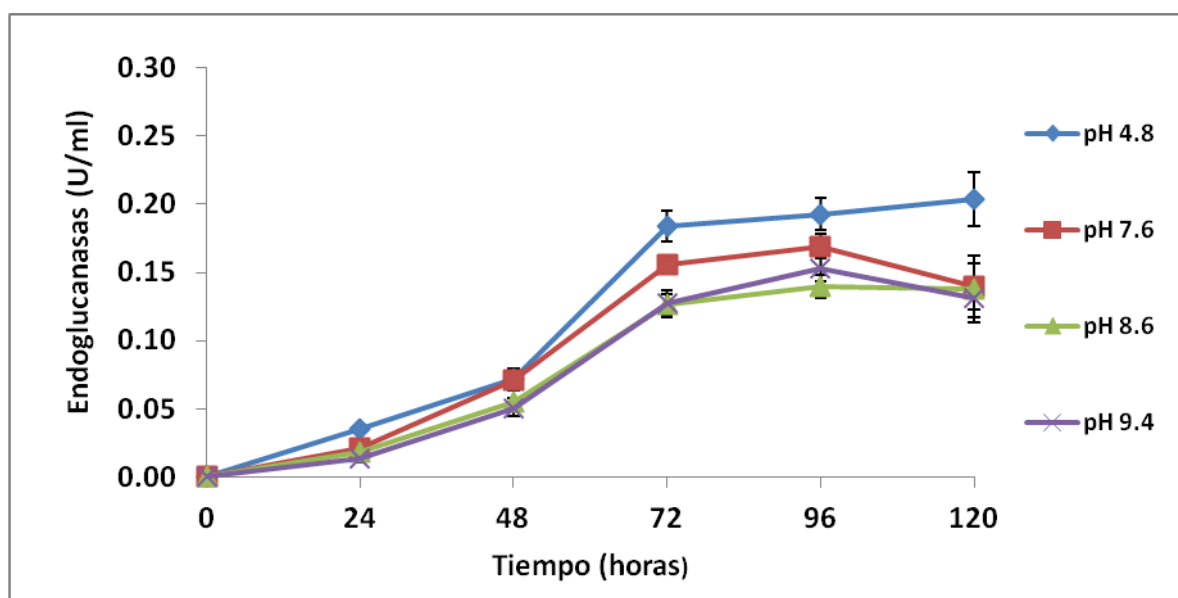


Figura 3: Cinética de producción de β -endoglucanasas con biopelículas de *A. fumigatus* LMB-35Aa cultivadas a 28 °C.

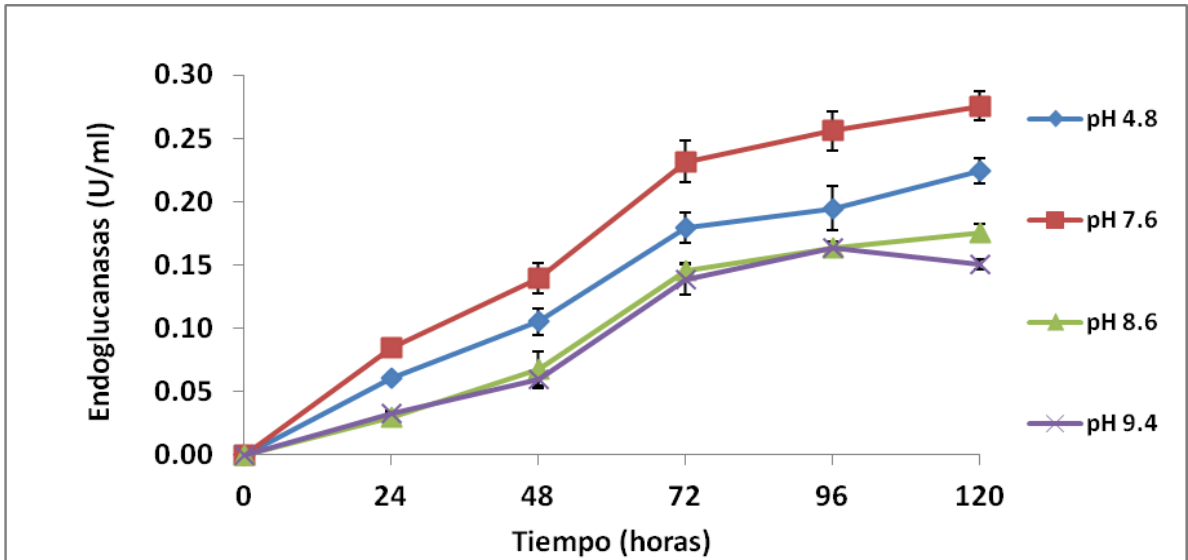


Figura 4: Cinética de producción de β -endoglucanasas con biopelículas de *A. fumigatus* LMB-35Aa cultivadas a 37 °C.

Habiendo seleccionado las 72 horas como el tiempo de mayor producción de celulasas, se procedió a verificar la actividad en dicho tiempo mediante la evaluación cualitativa de los halos de hidrólisis utilizando Rojo Congo (Figura 5). En los 4 pHs evaluados, se observó halos de hidrólisis de mayor diámetro a 37 °C.

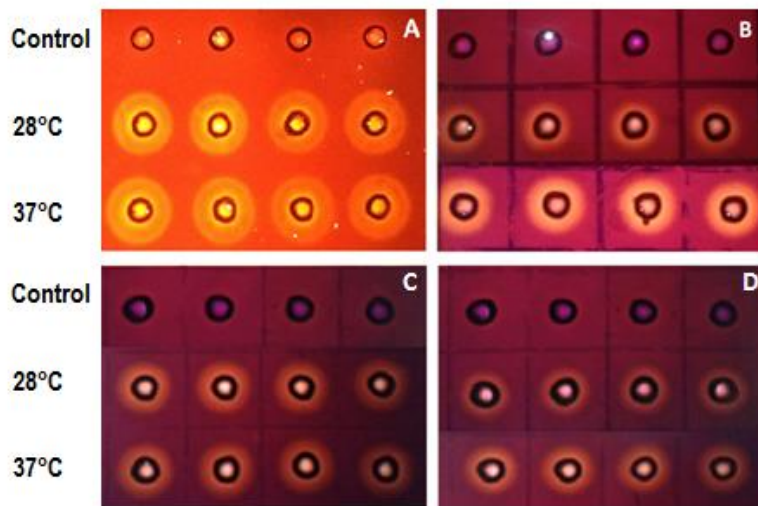


Figura 5: Actividad cualitativa de β -endoglucanasas de biopelículas de *A. fumigatus* LMB-35Aa a las 72 horas de crecimiento (28 °C y 37 °C) a diferente pH. A) pH 4.8 B) pH 7.6 C) pH 8,6 D) pH 9.4.

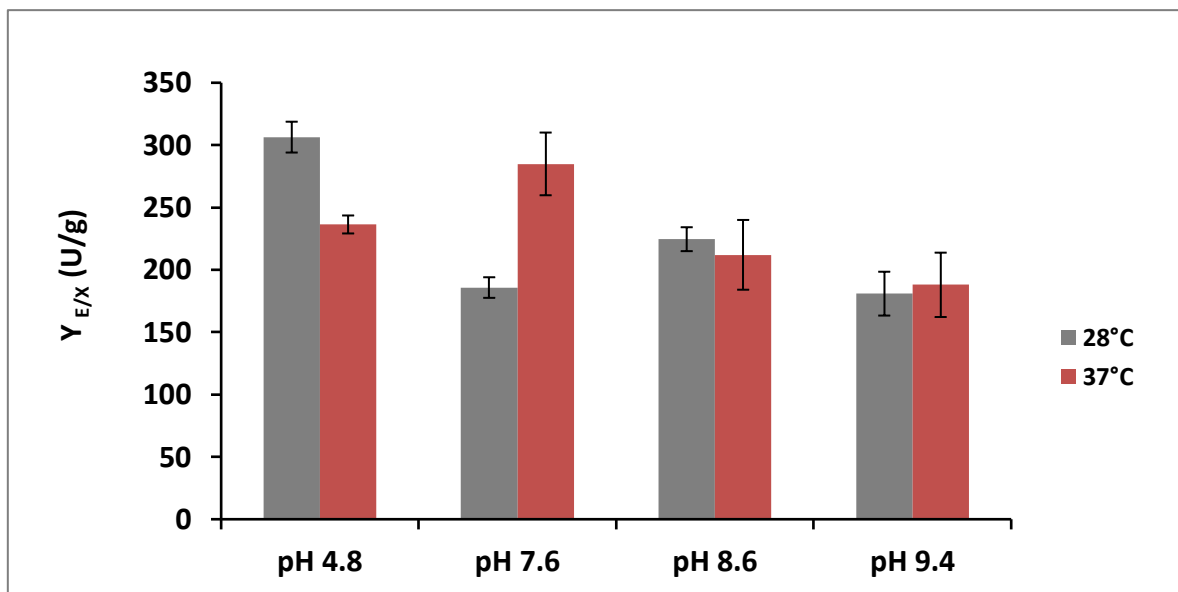


Figura 6: Rendimientos enzimáticos respecto a la biomasa de los cultivos de biopelículas de *A. fumigatus* LMB-35Aa a 28 °C y 37 °C. $Y_{E/X}$ (U/g) = Actividad β -endoglucanasa (U/l) / biomasa formada (g/l).

Pese a que se obtuvieron mayores títulos enzimáticos a 37 °C, también se observó mayor producción de biomasa a esta temperatura. Debido a esto y para la elección de la temperatura óptima de producción de celulasas neutro-alcalinas, se comparó los parámetros de rendimientos enzimáticos respecto a biomasa y actividad específica a las 72 horas, en ambas temperaturas. Los resultados mostraron mayores parámetros de productividad a 28 °C a pH 4.8 (Figura 6 y 7), sin mostrar diferencias significativas a pH 8.4 y 9.4 (Anexo 3.3 y 3.4). Sin embargo, los cultivos a 37 °C mostraron mayores valores en los parámetros evaluados a pH 7,6. Esta observación favorece la elección de 37 °C como la temperatura óptima para la producción de celulasas neutro-alcalinas.

Cabe resaltar que los valores obtenidos en el rendimiento enzimático respecto a biomasa a 28 °C y pH 4.8 fue de 280 U/g, valores que se asemejan a los obtenidos por Das *et al.* (2013) los cuales obtuvieron 250 U/g luego de la optimización del medio en fermentación en estado sólido.

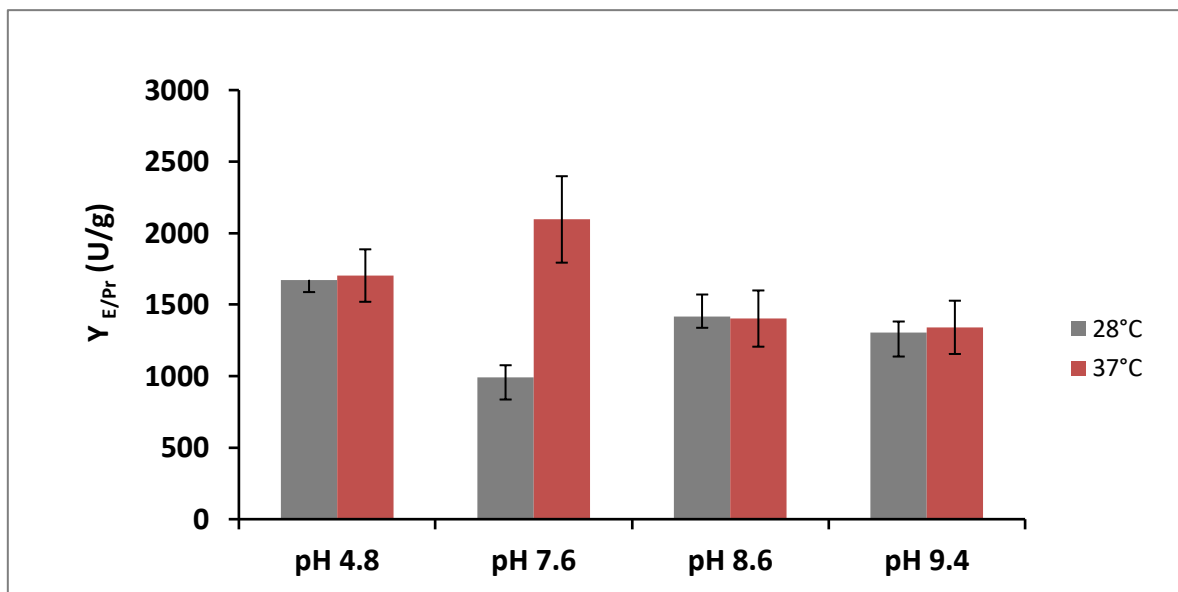


Figura 7: Actividad específica de los cultivos de los cultivos de biopelículas de *A. fumigatus* LMB-35Aa a 28 °C y 37 °C. $Y_{E/Pr}$ = Actividad β -endoglucanasa (U/l)/proteína secretada (g/l).

4.2. IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS A CELULASAS NEUTRO-ALCALINAS DE *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa

Diez genes de endoglucanasas y LMPOs previamente reportados en el genoma de la cepa de referencia, *Aspergillus fumigatus* Af293, fueron seleccionados para los objetivos de este estudio. En la Tabla 1 se muestran los 10 genes seleccionados de los cuales cinco no han sido caracterizadas hasta la fecha. Posteriormente estos genes fueron identificados en el genoma de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa (PRJNA298653) mediante el alineamiento de las secuencias disponibles en la base de datos utilizando el BLASTnt (*Basic Local Alignment and Search Tool*, NCBI).

En la Tabla 2 se indica las localizaciones de los genes analizados en el genoma de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, tanto el *scaffold*, como la posición de la secuencia (número de pares de base) dentro de determinado *scaffold*.

Tabla 1: Genes de endoglucanasas y LMPOs de *Aspergillus fumigatus* analizados en este estudio

Gen ID	Descripción del gen	Referencia
<i>afu7g06150</i>	Endoglucanasa putativa / GH12	AspGD*
<i>afu6g07480</i>	Endoglucanasa putativa / GH5	AspGD*
<i>egl2</i>	Endoglucanasa / GH5	Liu D, <i>et al.</i> (2011)
<i>egl3</i>	Endoglucanasa / GH5	Liu D, <i>et al.</i> (2011)
<i>afu1g12560</i>	Endoglucanasa putativa / AA9**	AspGD*
<i>afu3g03950</i>	Endoglucanasa putativa / GH61**	AspGD*
<i>afu5g01830</i>	Endoglucanasa putativa / GH5	AspGD*
<i>Afu5g13990</i>	Endoglucanasa putativa	AspGD*
<i>afu7g01540</i>	Endoglucanasa putativa / GH7	AspGD*
<i>afu6g01800</i>	1,4- β -endoglucanasa / GH7	Bernardi, <i>et al.</i> (2018)

*AspGD: Aspergillus Genome Database.

** Recientemente reportados como Monooxigenasas Líticas de Polisacárido (LMPOs).

Los cebadores (Tabla 2) se diseñaron para amplificar una secuencia parcial de cada gen de endoglucanasa de *A. fumigatus* LMB 35Aa. Se empleó el *software* Primer QuestSM de “Integrated DNA Technologies” dónde se diseñaron oligonucleótidos de 18 a 22 pb para generar transcritos de 80-150 pb para cada gen.

Asimismo, se realizó el cálculo de eficiencia de amplificación de las reacciones en PCR en tiempo real para cada cebador diseñado. Las eficiencias obtenidas oscilaron entre 75 por ciento y 120 por ciento (Anexo 2).

Tabla 2: Secuencias de los cebadores para amplificación de genes de β -endoglucanasas para *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa

Gen ID	Ubicación del gen en el genoma de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa	Secuencias de los cebadores	Tamaño del producto (pb)
<i>afu7g06150</i>	scaffold18_size896921	F: GATCCCAACCATGTCACCTAC R: GTACCACAGCTCCCAGTTATG	132
<i>afu6g07480</i>	scaffold15_size1369881	F: TGGCAGATAACAATGGTCAGATT R: GGTCATGTTCGTGATACTCATT	131
<i>egl2</i>	scaffold15_size1369881	F: GATGCGACGTACCTGAATG R: CGAGATGATGTTCCCGTAG	114
<i>egl3</i>	scaffold4_size889530	F: GCTCTGGAAGTATCATCTCTTCT R: GTCTGGTCCATATCGTGGTATTC	127
<i>afu1g12560</i>	scaffold2_size2524342	F: GGACTGAATGGCCTGAATCT R: CTCCAGAGTAGTCTTGTCAACTG	95
<i>afu3g03950</i>	scaffold11_size437909	F: CAACAGCGATGGCTCTAACT R: GAGCCCGTTATGGTCATGTT	111
<i>afu5g01830</i>	scaffold6_size935784	F: GTCGAACATGGTTGCCTTTG R: GGAGTTGAATCCTCCAGCTTTA	127
<i>afu5g13990</i>	scaffold28_size439309	F: AATGGGTGATCCAAGGCTAAA R: TTATTTCTCTCCACAACCCTCTG	102
<i>afu7g01540</i>	scaffold41_size364592	F: CTCGGCGCAAAGGATTACTA R: GTTCCTGTCGCGGTGTTAT	104
<i>afu6g01800</i>	scaffold23_size537212	F: GAAATCCGCCGACAGTACAT R: CAGTCCTCGGTAATGGAGTTG	86

Con el propósito de identificar los genes candidatos de celulasas neutro-alcalinas, se partió de los resultados obtenidos en la sección 4.1, donde el cultivo a 37 °C mostró un aumento del 40 por ciento en la actividad específica y del 30 por ciento en los rendimientos enzimáticos a pH 7,6, con respecto al cultivo a 28 °C. Esto podría indicar un nivel más alto de expresión de genes de celulasas neutro-alcalinas a 37 °C, lo cual se verificó mediante análisis de expresión de 10 genes putativos de endoglucanasas mediante PCR en tiempo real (qPCR) comparando ambas temperaturas.

Los resultados del qPCR mostraron que 2 de los 10 genes evaluados, *Afu7g06150* y *Afu3g03950* que codifican una endoglucanasa no caracterizada y LMPO, exhibieron de 3 a 4 veces más niveles de expresión a 37 °C en relación con 28 °C, por lo que la endoglucanasa putativa *Afu7g06150* podría estar implicada en la actividad neutro-alcalina de la cepa. Por otro lado, la expresión de los genes *egl3* y *Afu6g07480* (endoglucanasa no caracterizada), que muestran niveles de expresión más bajos a 37 °C, podrían explicar el mayor rendimiento obtenido a 28 °C a pH ácido, de estos tres genes mencionados, *egl3* ha sido caracterizada como una β -endoglucanasa con actividad óptima a un pH ácido (Liu *et al.*, 2011).

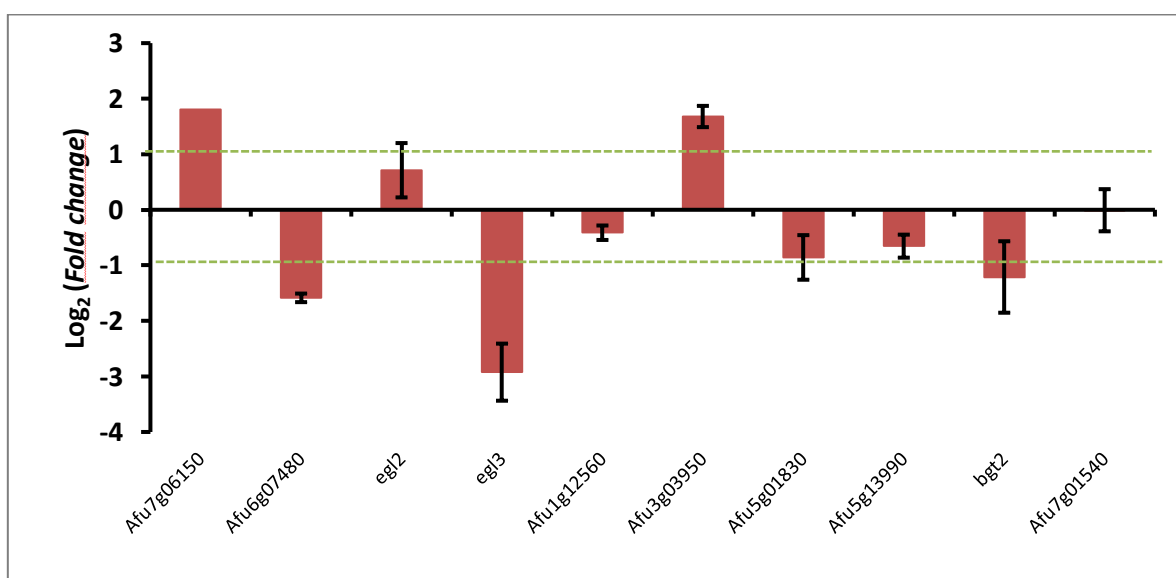


Figura 8: Análisis de expresión de 10 genes de β -endoglucanasas y LMPOs en biopelículas de *A. fumigatus*. Log₂(Fold change) representa la expresión relativa de cada gen a 37 °C respecto a 28 °C, normalizados por el gen de β -tubulina y el factor de elongación TEF-1. Cambio en la expresión: Log₂(FC) >1 o <-1.

4.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE CELULASAS ENTRE LA CEPA SILVESTRE Y MUTANTES LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II

La Figura 9 muestra la actividad cualitativa de β -endoglucanasas de la cepa *A. fumigatus* LMB-35Aa y sus mutantes LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II, luego de 72 horas en fermentación en biopelículas. En todos los niveles de pH evaluados se observa que el mutante LMB-35Aa-6I exhibe halos de hidrolisis mayores. Asimismo, se comparó los parámetros de rendimientos enzimáticos respecto a biomasa y actividad específica (Figura 18 y 19). El mutante LMB-35Aa-6I mostró mayores valores en los parámetros de producción evaluados a pH 7.6, sin embargo, el mutante LMB-35Aa-12II no mostró diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (Anexo 3.5 y 3.6).

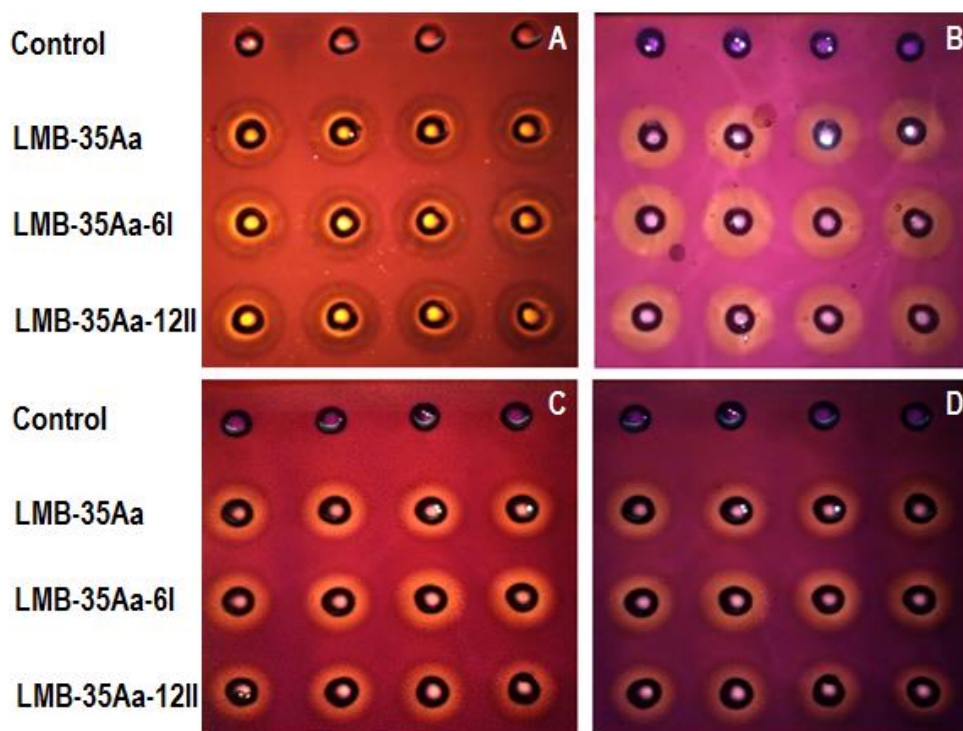


Figura 9: Actividad cualitativa de endoglucanasas de la cepa silvestre LMB-35Aa y mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II) a las 72 horas en diferentes pHs. A) pH 4.8 B) pH 7.6 C) pH 8,6 D) pH 9.4.

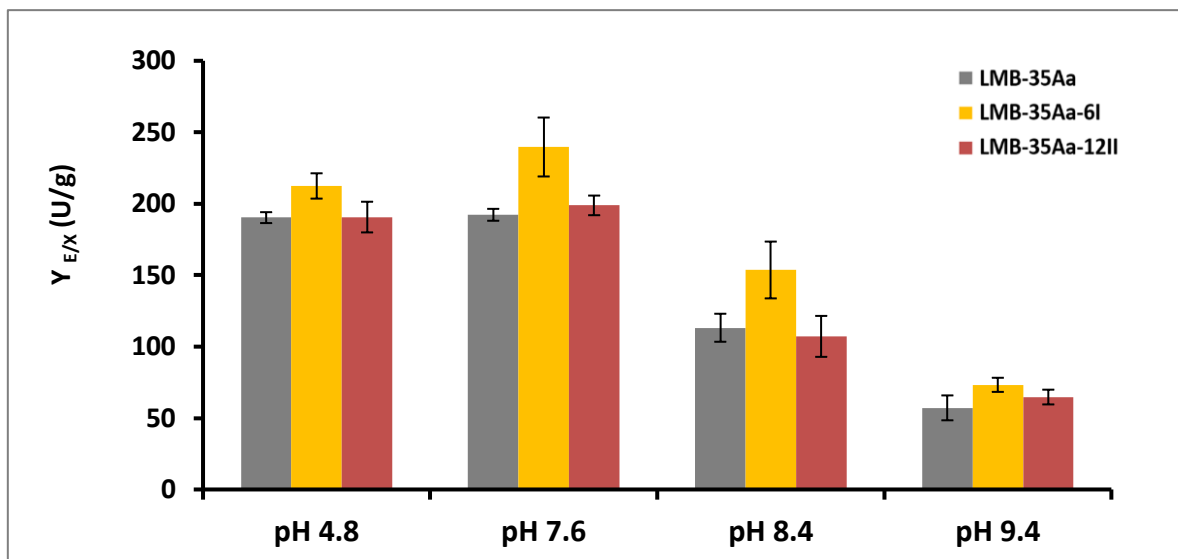


Figura 10: Rendimientos enzimáticos respecto a la biomasa de los cultivos en biopelículas de la cepa silvestre LMB-35Aa y mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II). $Y_{E/X}$ (U/g) = Actividad endoglucanasa (U/l) / biomasa formada (g/l).

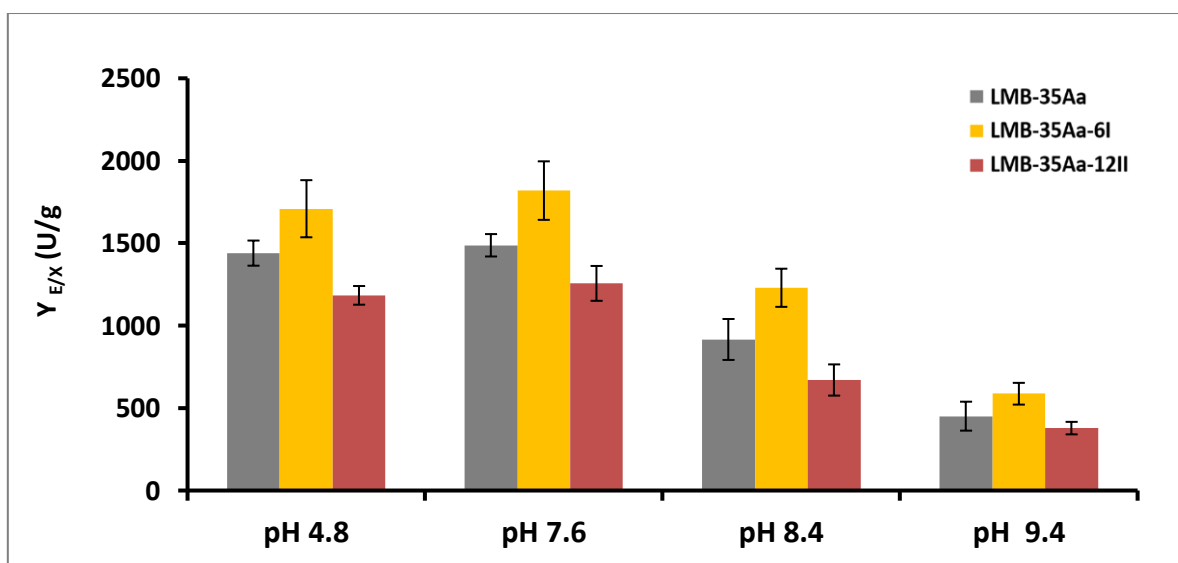


Figura 11: Actividad específica de los cultivos en biopelículas de la cepa silvestre LMB-35Aa y mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II). $Y_{E/Pr}$ = Actividad endoglucanasa (U/l) / proteína secretada (g/l).

Los resultados obtenidos señalan al mutante LMB-35Aa-6I, como la cepa que exhibe mayor actividad neutro-alkalina. Sin embargo, Zhang (2015) reportó que la cepa LMB-35Aa-12II obtuvo mayores títulos enzimáticos a pH 9.4, luego de la segunda ronda de mutación. Este resultado podría deberse a muchos motivos, entre ellos, a la modificación

del medio de cultivo, debido a que en el estudio de Zhang (2015) se empleó el medio Mandels y Resee modificado el cual contenía 10 por ciento de lactosa, como inductor de la producción de celulasas. Posiblemente, la mutación en la cepa LMB-35Aa-12II estaría asociada a la intervención de la lactosa como inductor, por este motivo no se evidenció la mejoría en la producción de celulasas de esta cepa cuando se empleó el medio Mandels y Resee con CMC (Carboximentilcelulosa).

Por otro lado, se realizó un análisis de expresión diferencial de los 10 genes de endoglucanasas entre la cepa silvestre y mutantes. Los resultados mostraron que la cepa mutante LMB 35Aa-6I posee mayores niveles de expresión de los genes *afu7g06150*, *afu3g03950*, respecto a la cepa silvestre. La sobreexpresión de estos 2 genes podría explicar la mayor actividad enzimática reportada. Sin embargo, el mutante LMB-35Aa-12II no mostró mejorías respecto a la silvestre (Figura 12).

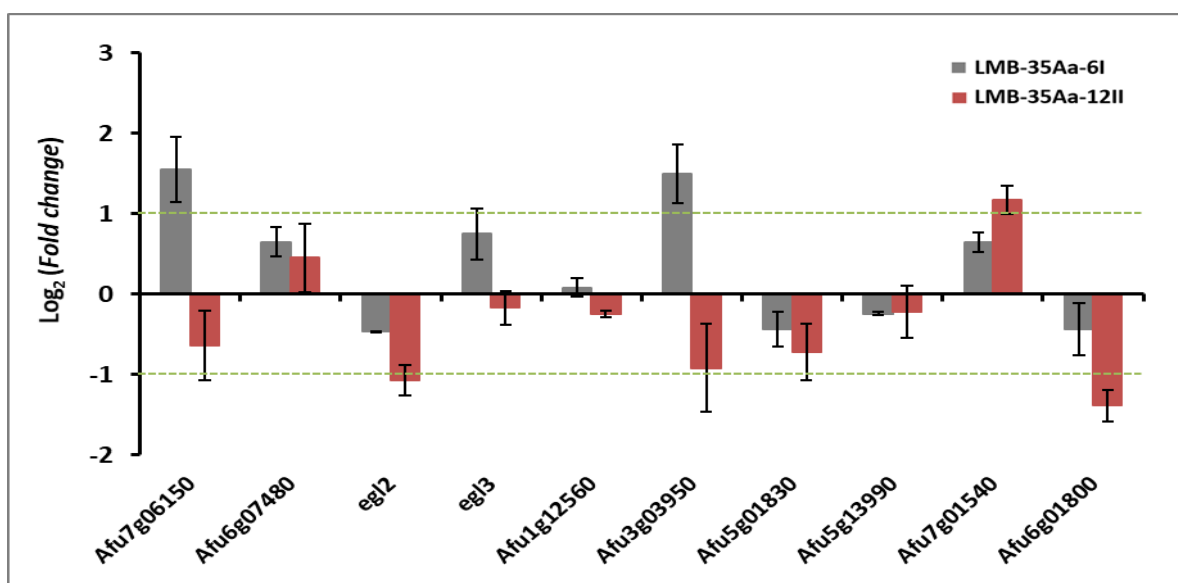


Figura 12: Expresión relativa de genes de β -endoglucanasas y LMPOs en la cepa silvestre LMB-35Aa respecto a las mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II). $\text{Log}_2(\text{Fold change})$ representa la expresión relativa de cada gen en la cepa silvestre respecto a las mutantes, normalizados por el gen de β -tubulina y el factor de elongación TEF-1. Cambio en la expresión: $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1$ o < -1 .

4.4. SELECCIÓN DE GENES INDICADORES DE VIRULENCIA

Diversos estudios han demostrado que la patogenicidad de *A. fumigatus* es multifactorial y que puede estar asociada a su estructura, adaptación a las condiciones de estrés, la capacidad de evasión del sistema inmune, entre otros (Tekaiia y Latgé, 2005). Para este estudio se seleccionaron algunos de los genes que codifican factores de virulencia característicos de la cepa clínica *Aspergillus fumigatus* Af293. En la Tabla 3 se muestran 15 genes indicadores de virulencia que fueron identificados para la cepa nativa *A. fumigatus* LMB-35Aa, entre ellos se incluyeron genes que codifican para adhesinas, hidrofobinas, transportadores de eflujo, micotoxinas y reguladores.

La pared celular de los hongos es la estructura responsable de la interacción directa con el huésped, por lo que los cambios en su composición para adaptarse al entorno del huésped podrían estar involucrados en la patogenicidad (Abad *et al.*, 2010). En *A. fumigatus* la pared celular está compuesta principalmente por polisacáridos por lo que en este estudio se seleccionaron 4 genes *rho1*, *ags1*, *agd3* y *glfA*, los cuales están involucrados en la biosíntesis de β -glucanos, α -glucanos, galactoaminogalactanos y galactomananos, respectivamente. La matriz de polisacárido compuesta principalmente por β -glucanos y galactomananos favorecerían la formación de biopelículas, los cuales pueden tener un impacto sobre la virulencia, aumentando la resistencia a antifúngicos y concentrando las enzimas extracelulares producidas durante el crecimiento y que son necesarias para la colonización e infección de tejidos (Latgé *et al.*, 2017).

Otros genes seleccionados para este estudio fueron *rodB*, *mdr4* y *atrF*. Pese a que no son factores de virulencia clásicos, podrían ser considerados “factores de virulencia defensivos” según Abad *et al.* (2010), debido al rol que cumplen en la patogenicidad del microorganismo. Por ejemplo, *rodB* codifica un péptido hidrofóbico en la superficie de sus conidios e hifas ayudan a la dispersión conidial, adherencia conidial al epitelio respiratorio y está relacionada con la protección contra el estrés oxidativo producido por los macrófagos alveolares. Asimismo, los transportadores Mdr4 y AtrF favorecen la virulencia del hongo, brindando resistencia a antifúngicos (Kaur y Sing, 2014).

Tabla 3: Genes indicadores de patogenicidad identificados en el genoma *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa por comparación con la cepa clínica *Aspergillus fumigatus* Af293.

Gen	Función del gen	Relación con la patogenicidad
<i>rho1</i>	Síntesis de β -(1,3) glucano	Inmunomodulador, reconocimiento y adhesión celular
<i>ags1</i>	Síntesis de α -(1-3) glucano	Adhesión y agregación de hifas en biopelículas
<i>agd3</i>	Síntesis de galactoaminogalactano (GAG).	Factor de virulencia requerido para la formación de biopelículas
<i>glfA</i>	Síntesis de galactomanano	Principal antígeno extracelular liberado en la infección. Adhesión.
<i>rodB</i>	Hidrofobina	Protección estrés oxidativo y adhesión
<i>calA</i>	Adhesina	Unión a laminina y células pulmonares. Fijación a superficies
<i>mdr4</i>	Transportador ABC	Expulsión de moléculas tóxicas
<i>atrF</i>	Transportador ABC	Resistencia antifúngica
<i>gliZ</i>	Biosíntesis de gliotoxina	Inmunosupresor
<i>aspF1</i>	Biosíntesis mitogilina	Ribotoxina, Citotoxina/ apoptosis
<i>aspHs</i>	Biosíntesis hemolisina	Actividad hemolítica y citotóxica
<i>ftmA</i>	Biosíntesis fumitremorgin	Neurotóxico
<i>laeA</i>	Regulador del metabolismo secundario	Regulación del metabolismo secundario
<i>rtfA</i>	Regulador de metabolismo secundario	Adhesión y Regulación de metabolitos secundarios
<i>medA</i>	Regulador de la formación de biopelículas	Interacción con el huésped (adherencia a las células epiteliales pulmonares, células endoteliales)

Las micotoxinas son aparentemente producidas por el hongo para protegerse de depredadores y competidores en su nicho ecológico, pero también podrían contribuir a la patogénesis de *A. fumigatus* y puede atacar directamente al huésped. Para el presente trabajo se seleccionaron 4 genes (*gliZ*, *aspF1*, *aspHs*, *ftmA*) involucrados en la biosíntesis de las micotoxinas más representativas (Rementería *et al.*, 2005). Por otro lado, MedA es una proteína que rige la adherencia, las interacciones con el huésped y la virulencia. Mutantes en este gen mostraron una alteración en la formación de biopelículas, así como

se afectó la adherencia a células epiteliales pulmonares y endoteliales *in vitro* (Gravelat *et al.*, 2010).

Habiendo seleccionado un total de 15 genes relacionados a la patogenicidad reportados en el genoma de la cepa de clínica, éstos fueron identificados en el genoma de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa (PRJNA298653) mediante el alineamiento de las secuencias disponibles en la base de datos utilizando el BLASTnt (*Basic Local Alignment and Search Tool*, NCBI). En la Tabla 4 se indica las localizaciones de los genes analizados en el genoma de *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, tanto el *scaffold*, como la posición de la secuencia (número de pares de base) dentro de determinado *scaffold*. A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron cebadores (Tabla 4) y se calculó la eficiencia de amplificación de las reacciones, las cuales oscilaron entre 75 por ciento y 120 por ciento (Anexo 2).

El nivel de expresión de los genes seleccionados fue analizado en las distintas condiciones de cultivo y temperatura propuestas. La calidad e integridad del RNA extraído de cada condición fue verificada (Anexo 1).

Tabla 4: Secuencias de los cebadores para amplificación de genes indicadores de patogenicidad para *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa.

Gen ID	Ubicación del gen en el genoma de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa	Secuencias de los cebadores	Tamaño del producto (pb)
<i>rho1</i>	scaffold15_size1369881	F: GATCTCCGAGGTTCTTCACTTC R: GCAGCTCCTCAATGGTCTT	98
<i>ags1</i>	scaffold5_size439689	F: CCAACACCTGGAAGATGACC R: AACACCGACCGATAGAAGGA	139
<i>agd3</i>	scaffold2_size2524342	F: CGAGCAACACCAAGGAGAT R: GGTGGCAAAGCCAATGAAG	125
<i>glfA</i>	scaffold30_size544622	F: GCTTCGGTGAGAAGGGTAAG R: GCTTCTTGTAGCCGATGGT	90
<i>rodB</i>	scaffold22_size414029	F: CCAGAACAAGTGCGGTGA R: TCAGGAGGCCGTAGTTGA	92
<i>calA</i>	scaffold24_size814358	F: TCCGGTGACACCATCTACT R: GACGGTGAAGCCGA ACTT	81
<i>mdr4</i>	scaffold2_size2524342	F: CGTTCGGCAGAGGATGAA R: CTCTGGGCGATGTGGATAAG	111
<i>atrF</i>	scaffold26_size551250	F: CAGCCCTCGTCGATGTTAAT R: GCCAACTGGACCGAAATAGA	87
<i>gliZ</i>	scaffold15_size1369881	F: AGCCTAACCGCTCGAGATA R: CAGTGGGAACAGTGGTAGAAG	98

Gen ID	Ubicación del gen en el genoma de <i>A. fumigatus</i> LMB-35Aa	Secuencias de los cebadores	Tamaño del producto (pb)
<i>aspF1</i>	scaffold6_size935784	F: TACCCGCACTGGTTCCTAA R: GACGGTCACAGTCGGCTT	94
<i>aspHs</i>	scaffold31_size151726	F: AGTCCACTGGGACTGTCCAT R: GCACCACCATACTTGTTCCTA	108
<i>ftmA</i>	scaffold42_size84196	F: CCACGATGGCCCTATGTTT R: GGATGTGCCGTAGAGGAATG	131
<i>laeA</i>	scaffold53_size69050	F: GTCTCGGACGGACTGATCTA R: CGACGAAGGCTTCTGGATAC	118
<i>rtfA</i>	scaffold13_size1331972	F: CTGAGGCCATTGAGGCATAC R: CTTACCAGCAGCCATATCC	87
<i>medA</i>	scaffold3_size965284	F: CGAAACATTGAAAAGGATGTG R: CTGAGGGAAATCTGAAGGAAG	107

4.5. INFLUENCIA DE LA CONDICIÓN DE CULTIVO (CULTIVO EN BIOPELÍCULA Y CULTIVO SUMERGIDO) EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INDICADORES DE VIRULENCIA

Se ha estimado que aproximadamente el 80 por ciento de las infecciones microbianas no agudas en humanos están asociadas con la formación de biopelículas (Davies, 2003). Particularmente, la formación de biopelículas de *A. fumigatus* podría ser considerado uno de los factores de virulencia más importantes en el desarrollo de la aspergilosis pulmonar invasiva y de aspergilomas, ya que esta forma de crecimiento es indispensable para que la infección prospere (Abad *et al.*, 2010). Además, las biopelículas exhiben características patológicas y fisiológicas distintas a los observados en los cultivos clásicos como el crecimiento planctónico o cultivo sumergido, que clásicamente se utilizaron para comprender la patología de este hongo (Abad *et al.*, 2010). Es así, que un crecimiento en biopelículas se ha convertido en el sistema *in vitro* modelo para el estudio de la patogenicidad de *A. fumigatus* y se ha sugerido que en esta condición de cultivo ocurren cambios metabólicos importantes que estarían implicados en su virulencia (Kaur y Sing, 2014).

Diversos constituyentes fúngicos pueden estar involucrados en la formación de la biopelícula en las células huésped, entre ellos los componentes de la pared celular, las adhesinas, los transportadores de eflujo, entre otros (Kaur y Singh, 2014). Para determinar qué genes están sobreexpresados en biopelículas respecto al cultivo sumergido de *A. fumigatus* LMB-35Aa, se llevó a cabo un análisis comparativo de la expresión de los genes indicadores de patogenicidad previamente identificados. Cabe resaltar que se realizaron dos sistemas de cultivo en biopelículas, tal como se describió en la metodología, el primero en cual la biopelícula se desarrolló sobre tela de poliéster en cultivo líquido, y el segundo sistema en el que se emplearon placas de poliestireno donde se observó que la formación de la biopelícula se dio en la superficie del medio de cultivo (Figura 13).

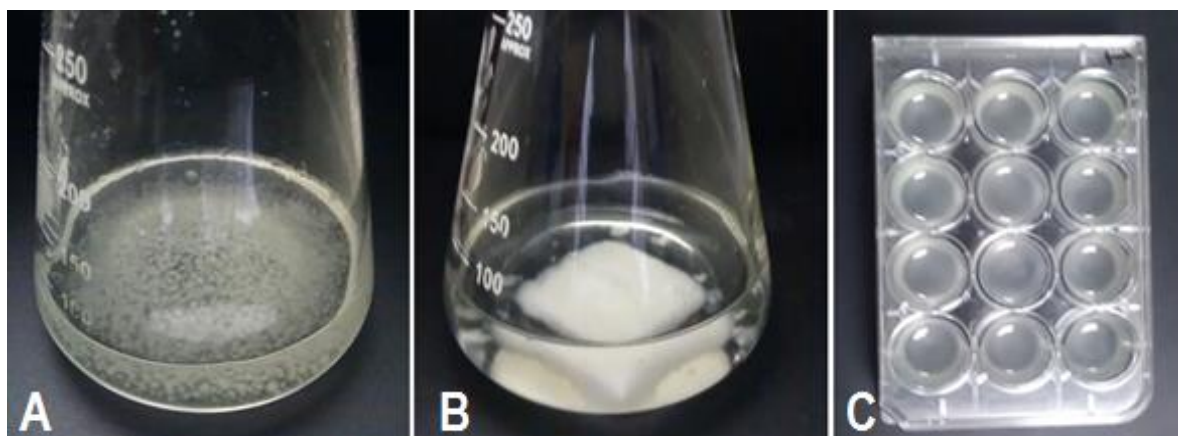


Figura 13: Crecimiento de *A. fumigatus* LMB-35Aa a las 72 horas en A) Cultivo sumergido B) Cultivo en biopelículas desarrolladas sobre telas de poliéster. C) Cultivo en biopelículas desarrolladas en placas de poliestireno.

Los patrones de expresión génica de varios grupos de genes difirieron en las tres condiciones de crecimiento luego de 72 horas de incubación, tal como se muestra en las figuras 14 y 15. En la primera figura se evaluaron 4 genes relacionados a la síntesis de matriz extracelular que codifican proteínas relacionadas a la síntesis de α -glucanos, β -glucanos, galactoaminogalactanos y galactomananos, respectivamente. Si bien es cierto los cuatro genes son importantes para la patogenicidad de *A. fumigatus*, solo *agd3* y *glfA* son determinantes de virulencia debido a que cepas mutantes en estos genes fueron hipovirulentos en comparación a la cepa silvestre (Lee *et al.*, 2016; Schmallhorst *et al.*, 2008). Particularmente el galactoaminogalactano (*agd3*) se ha identificado como un factor de virulencia, ya que está involucrado en la adhesión a células huésped, formación de biopelículas, enmascaramientos de β -glucanos del reconocimiento inmune e incluso la resistencia a actividad de los neutrófilos (Lee *et al.*, 2016). En el presente trabajo, se observó que todos los genes mencionados se muestran reprimidos para la cepa saprófita *A. fumigatus* LMB-35Aa durante el crecimiento como biopelícula en los dos sistemas probados, lo cual demostraría la inocuidad de la cepa en estas condiciones de crecimiento.

Asimismo, el gen *rodB* que pertenece a la familia de las hidrofobinas también exhibe niveles más bajos de expresión en la biopelícula desarrollada en placas, mientras que respecto a las biopelículas desarrolladas en tela no se observó cambios significativos. Este resultado contrastaría con lo obtenido por Bruns *et al.* (2010) pues señalan que la

maduración de la biopelícula de *A. fumigatus* conlleva a una sobreexpresión de hidrofobinas, aunque la detección es más temprana, al inicio de crecimiento.

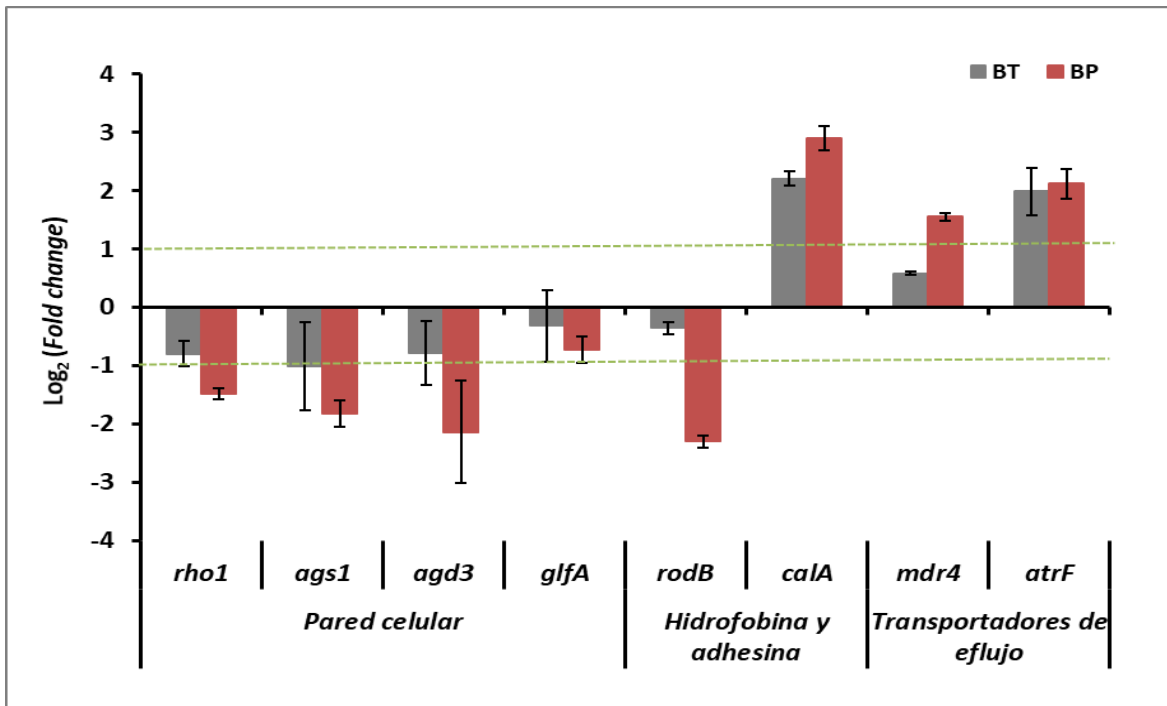


Figura 14: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad (matriz extracelular, adhesinas y transportadores de eflujo) de *A. fumigatus* LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela de poliéster (BT) y en placas de poliestireno (BP) en comparación al cultivo sumergido. $\text{Log}_2(\text{Fold change})$ representa la expresión relativa de cada gen en biopelículas respecto al cultivo sumergido, normalizados por el gen de β -tubulina y el factor de elongación TEF-1. Cambio en la expresión: $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1$ o < -1 .

Por otro lado, la adhesina *calA*, mostró mayores niveles de expresión en ambos sistemas de biopelículas, respecto al cultivo sumergido, lo que resaltaría la importancia de estas moléculas en la adhesión y compactación de la biopelícula. De igual manera, los genes *atrF* y *mdr4* que codifican para transportadores de eflujo tipo ABC, mostraron mayores niveles de expresión en biopelículas respecto al cultivo sumergido (Figura 14). Estos resultados se relacionan con el trabajo reportado por Gibbons *et al.* (2012) en el cual analizaron el transcriptoma de una cepa de *A. fumigatus* y observaron que los transportadores miembros de la familia *MDR* están significativamente sobreexpresados en biopelículas en comparación con las formas planctónicas. Asimismo, se ha

documentado la sobreexpresión de *mdr4* en biopelículas de *A. fumigatus* en un modelo murino (Rajendran *et al.*, 2011). Pese a que los transportadores de eflujo no son factores de virulencia clásicos, la sobreexpresión de estos genes en biopelículas explicaría la reducción de la susceptibilidad a los fármacos antimicóticos, lo que favorece indirectamente, pero no por sí mismos, la virulencia de la cepa (Mowat *et al.*, 2007).

En la Figura 15, se muestra la expresión de genes de síntesis de micotoxinas más representativas de *A. fumigatus*. Si bien es cierto la producción de estos metabolitos secundarios representa una ventaja adaptativa frente a especies competidoras en su nicho ecológico, también favorecen la infección de células de mamíferos ya que poseen amplios efectos virulentos que incluyen citotoxicidad, mutagenicidad entre otros. Dentro de las micotoxinas evaluadas, la expresión de los genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de hemolisina (*aspHs*) y fumitremorgina (*ftmA*) mostraron mayores niveles de expresión en las biopelículas formadas sobre la tela comparado con el cultivo sumergido. La sobreexpresión de estos dos últimos genes coincide con los resultados obtenidos por Gibbons *et al.* (2012), en los que se observó la sobreexpresión de varios genes del *supercluster* Fumitremorgin C en biopelículas. Sin embargo, cabe resaltar que la sobreexpresión de las dos micotoxinas no sería un resultado concluyente debido a que estas toxinas no son determinantes de virulencia.

La gliotoxina es una de las micotoxinas de *A. fumigatus* que ha recibido mayor atención en las últimas décadas. Esta toxina posee propiedades inmunosupresoras y proapoptóticas en células de mamíferos y es fácilmente detectable en los sueros de pacientes con aspergilosis invasiva (Sugui *et al.*, 2007). Asimismo, se reportó que más del 80 por ciento de las cepas de *A. fumigatus* aisladas de muestras respiratorias eran productoras de gliotoxinas (Lewis *et al.*, 2005), mientras que solo el 11 por ciento de aislados ambientales producían estas toxinas (Santos *et al.*, 2003). Esta observación indicaría que la gliotoxina cumple un papel importante en la patogénesis y es un posible determinante de virulencia.

Bruns *et al.* (2010) reportaron la sobreexpresión de algunos genes involucrados en la biosíntesis de la gliotoxina en cultivos de biopelículas de la cepa clínica *A. fumigatus* ATCC46645, sin embargo, en el presente trabajo se observó que el nivel de expresión del

gen *gliZ* fue menor en las biopelículas en placas respecto al cultivo sumergido, este resultado revelaría una diferencia de importancia entre la cepa estudiada y la cepa clínica. Otros estudios señalan a los neutrófilos como posibles objetivos de esta toxina, por lo que la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de la gliotoxina sería dependiente de la presencia de los neutrófilos o de alguna función de los mismos (Spikes *et al.*, 2008).

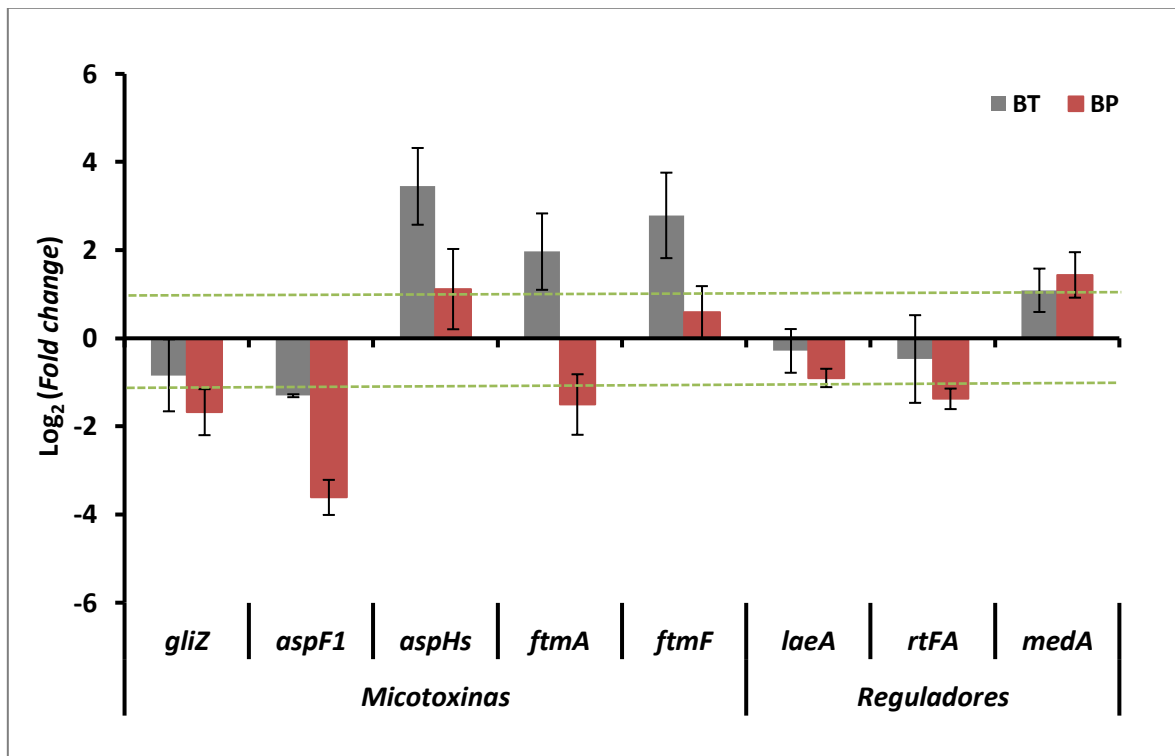


Figura 15: Expresión relativa de los genes indicadores de patogenicidad (micotoxinas y reguladores) de *A. fumigatus* LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela de poliéster (BT) y en placas de poliestireno (BP) en comparación al cultivo sumergido. $\text{Log}_2(\text{Fold change})$ representa la expresión relativa de cada gen en biopelículas respecto al cultivo sumergido, normalizados por el gen de β -tubulina y el factor de elongación TEF-1. Cambio en la expresión: $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1$ o < -1 .

Por otro lado, no se observaron cambios significativos de la expresión a nivel del factor de transcripción *laeA*, regulador global del metabolismo secundario en *A. fumigatus*. Estos resultados difieren de los reportados por Gibbons *et al.* (2012) con la cepa clínica, en los que el gen *laeA* se encuentra sobreexpresado en biopelículas en comparación al cultivo sumergido. Asimismo, en la figura 15, se observa que una mayor expresión del gen *medA*, en biopelículas, lo que concuerda con los resultados esperados, debido a que

medA está involucrado directamente en la adherencia y media la formación de biopelículas.

Cabe resaltar que un estudio reciente, Zhao y Gibbons (2018) analizaron los patrones de variación de número de copias a nivel poblacional y especie de 71 aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus*, incluyendo *A. fumigatus* LMB-35Aa. Sin embargo, al determinar la estructura y relación evolutiva de los aislados, se observó que 2 cepas de *A. fumigatus* LMB-35Aa y F15927 eran altamente divergentes al grupo de aislados clínicos.

4.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA (28 °C y 37 °C) En La Expresión De Los Genes Indicadores De Virulencia En Biopelículas

A. fumigatus reside en el compost, un ambiente dinámico que sufre amplias fluctuaciones de temperatura como consecuencia de una intensa actividad microbiana, sin embargo, esta capacidad de prosperar a 37 °C es una característica universal de los patógenos humanos (Abad *et al.*, 2010). La relación entre temperatura y patogenicidad, está más estudiada a nivel de patógenos bacterianos tales como *Shigella flexneri*, *Bordetella pertussis* etc., pues se conoce que ciertos cambios en la expresión génica están regulados por la temperatura y que contribuyen a la patogénesis (Abad *et al.*, 2010). Debido a la capacidad de *A. fumigatus* para prosperar a 37 °C es un requisito previo para la infección por lo que se especula que la termotolerancia contribuye a la virulencia, sin embargo, los factores de virulencia regulados por temperatura aún no se han identificado en *A. fumigatus*.

En la Figura 16 no se observa cambios significativos en la expresión de los genes relacionados a la matriz extracelular en ambas condiciones, a excepción del gen *glfA* que codifica para galactoaminomanano. El mismo compartimiento se observa para *rodB* y *calA*, proteínas que ayudan a organizar la estructura de la colonia y promueve la adhesión de las células a las proteínas del hospedador (Thau *et al.*, 1994), por lo que posiblemente son necesarias a 37 °C que refleja la temperatura del individuo a infectar.

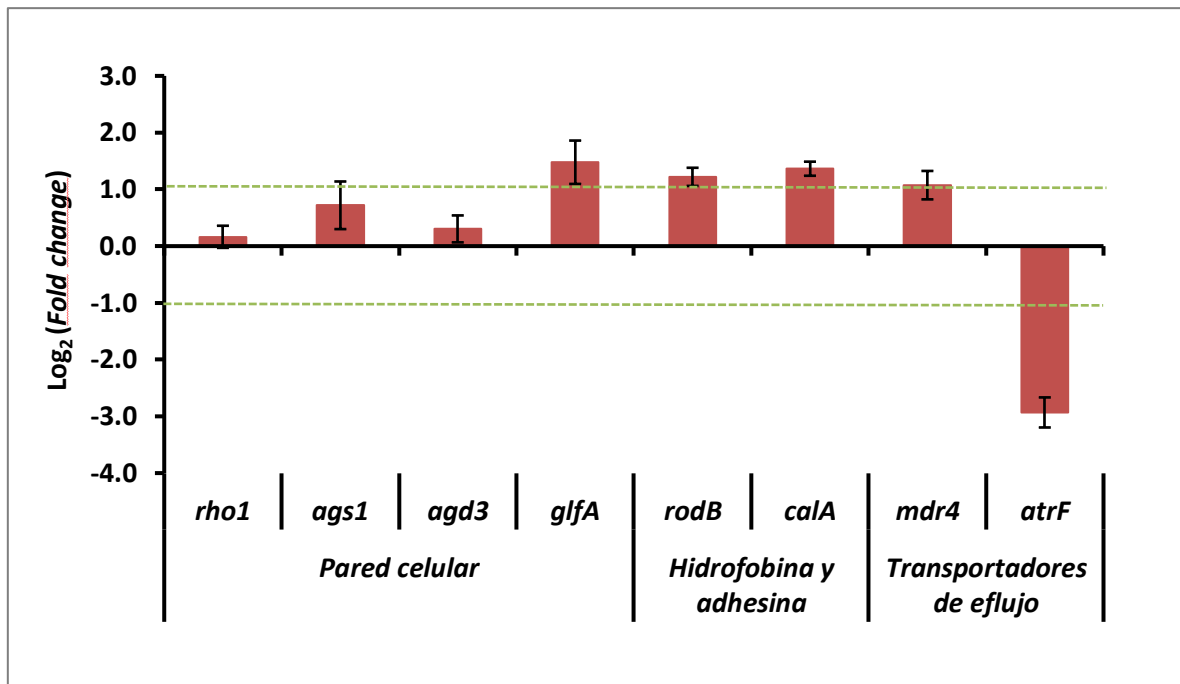


Figura 16: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad (matriz extracelular, adhesinas y transportadores de eflujo) de *A. fumigatus* LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela cultivadas a 37 °C en comparación a 28 °C. Log₂(Fold change) representa la expresión relativa de cada gen a 37 °C respecto a 28 °C, normalizados por el gen de β-tubulina y el factor de elongación TEF-1. Cambio en la expresión: Log₂(FC) >1 o <-1.

Respecto a los transportadores de membrana, el gen *atrF* exhibió menores niveles de expresión a 37 °C respecto a 28 °C, mientras que *mdr4* no mostró diferencias significativas entre ambas condiciones.

En la Figura 17, se muestra el análisis de expresión de los genes que codifican micotoxinas y reguladores, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos incubados a 28 °C y 37 °C. Estos resultados coinciden con los observados por Nierman *et al.* (2005), que estudiaron las diferencias en la expresión génica entre 30 °C y 37 °C, detectando algunos genes sobreexpresados a 37 °C, pero ninguno de ellos relacionados a la patogenicidad.

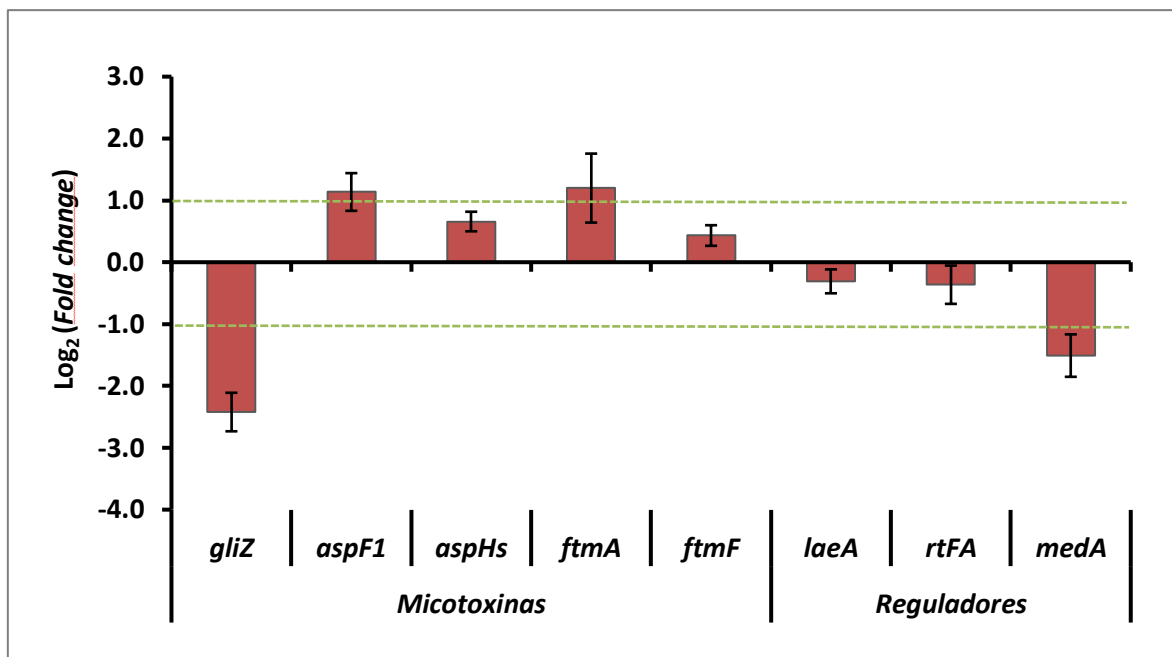


Figura 17: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad (micotoxinas y reguladores) de *A. fumigatus* LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas sobre tela cultivadas a 37 °C en comparación a 28 °C. Log₂ (Fold change) representa la expresión relativa de cada gen a 37 °C respecto a 28 °C, normalizados por el gen de β-tubulina y el factor de elongación TEF-1. Cambio en la expresión: Log₂(FC) >1 o <-1.

4.7. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE PATOGENICIDAD EN LOS MUTANTES LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II

Si bien es cierto la mutación aleatoria a la que fue sometida la cepa silvestre estaba dirigida a aumentar la actividad de endoglucanasas, las mutaciones en el genoma pudo afectar la expresión de los genes de patogenicidad, obteniendo cepas mutantes mas virulentas que la silvestre. Es por este motivo que se vió necesario el análisis de expresión de esos genes.

El análisis de expresión de los genes de patogenicidad entre la cepa silvestre y mutantes, no reveló ningun cambio significativo (Figura 18), lo que resulta favorable para el empleo de la mutante con mayor actividad LMB-35Aa-M6I, sin riesgo de que exprese mayores niveles de genes de patogenicidad.

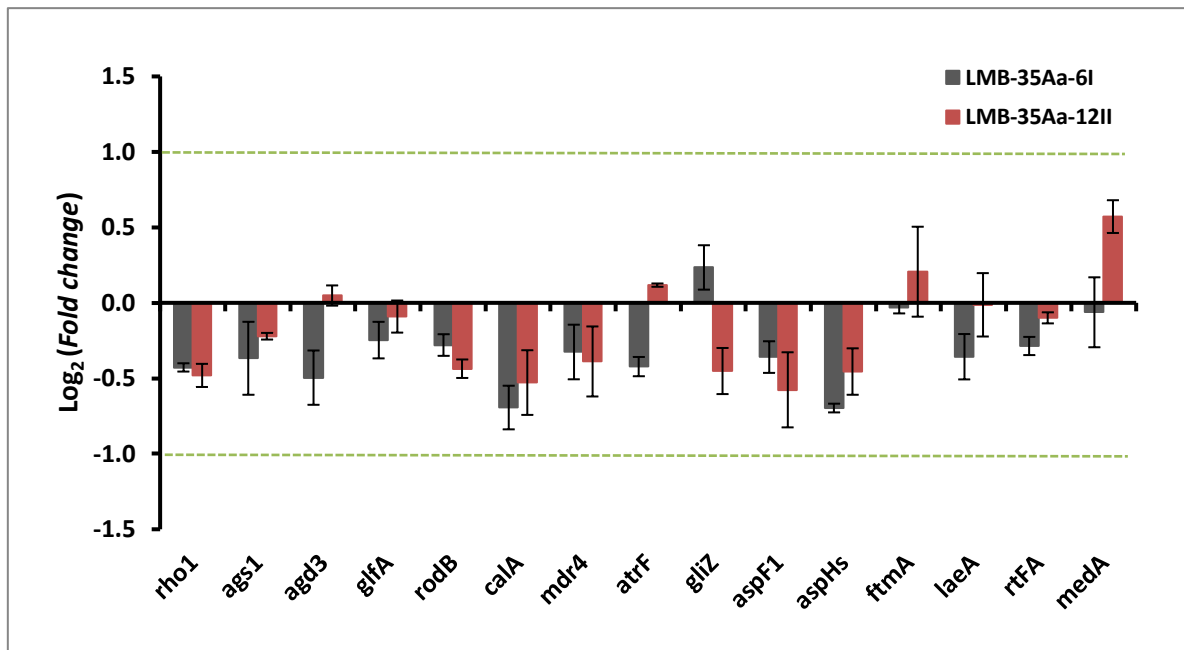


Figura 18: Expresión relativa de genes indicadores de patogenicidad en las cepas mutantes (LMB-35Aa-6I, LMB-35Aa-12II) en comparación a la cepa silvestre LMB-35Aa en biopelículas desarrolladas en tela de poliéster. $\text{Log}_2(\text{Fold change})$ representa la expresión relativa de cada gen a 37 °C respecto a 28 °C, normalizados por el gen de β -tubulina y el factor de elongación TEF-1. Cambio en la expresión: $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1$ o < -1 .

IV. CONCLUSIONES

- Se identificó el gen *Afu7g06150* como candidato de celulasas neutro-alcalinas de la cepa silvestre *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, el cual no ha sido caracterizado hasta la fecha.
- El mutante *A. fumigatus* LMB-35Aa-6I mostró mayor actividad endoglucanasa a pH 7,6 lo cual se correlacionó con la sobreexpresión del gen *Afu7g06150* (endoglucanasa putativa) en este mutante respecto a la cepa silvestre.
- En base al análisis bioinformático de búsqueda de secuencias de alta homología, se identificaron 16 genes indicadores de virulencia y/o patogenicidad en el genoma de la cepa *Aspergillus fumigatus* LMB-35Aa, los mismos que fueron evaluados en sus niveles de expresión en las condiciones de cultivo para expresión de celulasas.
- En los cultivos con biopelículas, los genes más asociados a la virulencia como los relacionados a la matriz extracelular (*agd3* y *glfA*), la gliotoxina (*gliZ*) y el regulador de metabolismo secundario (*laeA*), se encuentran reprimidos respecto al cultivo sumergido.
- El análisis de expresión de los genes indicadores de virulencia, comparando cultivos de biopelículas a 28°C y 37°C, revelan que la temperatura no influye en la sobreexpresión de los genes de virulencia.
- Los resultados obtenidos sugieren que tanto la cepa silvestre, como sus mutantes LMB35Aa-6I y LMB35Aa-12II no expresan genes de virulencia, por lo cual, pueden considerarse saprófitos e inoos para la producción industrial.

V. RECOMENDACIONES

- Caracterizar los genes candidatos de β -endoglucanasas y LMPOs neutro-alcalinas identificados, a fin de confirmar su actividad neutro-alcalina.
- Confirmar los resultados de la condición saprofito, mediante análisis transcriptómico de biopelículas *ex vivo* sobre líneas celulares.
- Considerar los genes de virulencia identificados, como marcadores genómicos, en procesos de optimización de sistemas de producción de celulasas neutro-alcalinas con biopelículas, para monitorear la inocuidad de la cepa *A. fumigatus* LMB35Aa y sus mutantes LMB35Aa-6I y LMB35Aa-12II.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, A.; Fernández, J.; Bikandi, J.; Ramírez, A.; Margareto, J.; Sendino, J.; Hernando, F.; Pontón, J.; Garaizar, J.; Rementeria, A. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología* 27(4): 155-182.
- Abad, A.; Fernández, J.; Ramírez, A.; Sendino, J.; Hernando, F.; Pemán, J.; Garaizar, J.; Rementeria, A. 2013. The *aspHS* gene as a new target for detecting *Aspergillus fumigatus* during infections by quantitative real-time PCR. *Medical Mycology* 51(5): 545–554.
- Agrawal, B.J. 2017. Bio-Stoning of Denim- An Environmental-Friendly Approach. *Current Trends in Biomedical Engineering and Biosciences* 3:3.
- Ajayi, A.; Peter-Albert, C.; Adedeji, O. 2015. Modification of cell wall degrading enzymes from soursop (*Annona muricata*) fruit deterioration for improved commercial development of clarified soursop juice. *Medicinal and Aromatic Plants* 4(4): 2167-2412.
- Anish, R.; Rahman, M.S.; Rao, M. 2007. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* in biopolishing of denims. *Biotechnology and Bioengineering* 96(1):48–56.
- Araujo, R.; Casal, M.; Cavaco-Paulo, A. 2008. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatalysis and Biotransformation* 26(5): 332–349.

- Arya, M.; Shergill, I.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5(2): 209-219.
- Askew, D. S. 2008. *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Current Opinion in Microbiology* 11(4): 331–337.
- Behera, B.; Sethi, B.; Mishra, R.; Dutta, S.; Thatoi, H. 2017. Microbial cellulases– Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15(1): 197-210.
- Ben-Hmad, I.; Gargouri, A. 2017. Neutral and alkaline cellulases: Production, engineering, and applications. *Journal of Basic Microbiology* 57(8): 653–658.
- Bennett, J.W. 2008. An overview of the genus *Aspergillus*. *Natural Product Research* 22(14): 1197–1224.
- Bernardi, A.; Fagundes, P.; Gerolamo, L.; Yonamine, D.; Lima, L.; Uyemura, S.; Magnani, T. 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.
- Bhabhra, R.; Askew, D.S. 2005. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Medical micology* 43(1): 275-82.
- Bhabhra, R.; Miley, M.D.; Mylonakis, E.; Boettner, D.; Fortwendel, J.; Panepinto, J.C.; Postow, M.; Rhodes, J.C.; Askew, D.S. 2004. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* Gene Encoding Nucleolar Protein CgrA Impairs Thermotolerant Growth and Reduces Virulence. *Infection and Immunity* 72(8): 4731–4740.
- Bruns, S.; Seidler, M.; Albrecht, D.; Salvenmoser, S.; Remme, N.; Hertweck, C.; Brakhage, A.; Kniemeyer, O.; Muller, F. 2010. Functional genomic profiling of *Aspergillus fumigatus* biofilm reveals enhanced production of the mycotoxin

gliotoxin. *Proteomics* 10: 3097-3107.

- Chen, H.; Qiu, W. 2010. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances* 28(5): 556-562.
- Chen, G.Q. 2012. New challenges and opportunities for industrial biotechnology. *Microbial Cell Factories* 11: 111.
- Das, A.; Paul, T.; Halder, S.K.; Jana, A.; Maity, C.; Mohapatra, P.; Pati, B.; Mondal, K. 2013. 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*, 128:290-6.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 114-122.
- Erickson, B.; Nelson, J.E.; Winters, P. 2012. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology Journal* 7(2): 176–185.
- Fujinami, S.; Fujisawa, M. 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes- past, present and future. *Environmental Technology* 31(8): 845–856.
- Galante, Y.M.; Formantici, C. 2003. Enzyme Application in Detergency and in Manufacturing Industries. *Current Organic Chemistry* 7(13):1399-1422.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Applied Chemistry* 59(2): 257-268.
- Gibbons, J.G.; Beauvais, A.; Beau, R.; McGary, K.L. ; Latgé, J.-P.; Rokas, A. 2012. Global Transcriptome Changes Underlying Colony Growth in the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 11(1), 68–78.

- Gravelat, F.; Doedt, T.; Chiang, L.; Liu, H.; Filler, S.; Patterson, T.; Sheppard, D. 2008. *In vivo* analysis of *Aspergillus fumigatus* developmental gene expression determined by real-time reverse transcription-PCR. *Infection and Immunity* 76(8):3632-3639.
- Gravelat, F.N.; Ejzykowicz, D.E.; Chiang, L.Y.; Chabot, J.C.; Urb, M.; Macdonald, K.D.; Bader, N.; Filler, S.; Sheppard, D.C. 2010. *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. *Cellular Microbiology* 12(4): 473–488.
- Guruceaga, X.; Ezpeleta, G.; Mayayo, E.; Sueiro, M.; Abad, A.; Aguirre, J.; Hong, L.; Wiemann, P.; Woo, J.; Filler, S.; Keller, N.; Hernando, F.; Ramírez, A.; Rementería, A. 2018. A possible role for fumagillin in cellular damage during host infection by *Aspergillus fumigatus*. *Virulence* 9(1):1548-1561.
- 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(2): R19.
- Karmakar, M.; Ray, R. 2011. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology* 6: 41-53.
- Kaur, S.; Singh, S. 2014. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* 52(1): 2–9.
- Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.; Bohn, A. 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* 44(22): 3358-3393.
- Kuhad, R.C.; Gupta, R.; Singh, A. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* 2011 (2011):10.

- Kwon-Chung, K.J.; Sugui, J.A. 2013. *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? PLoS Pathogens 9(12): 1003743.
- Latgé, J.; Beauvais, A.; Chamilos, G. 2017. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. Annual Review of Microbiology 8(71): 99-116.
- Lee, M.; Geller, A.; Bamford, N.; Liu, H.; Gravelat, F.; Snarr, B.; Mauff, F.; Chabot, J.; Ralph, B.; Ostapska, H.; Lehoux, M.; Cerone, R.; Baptista, S.; Vinogradov, E.; Stajich, J.; Filler, S.; Howell, L.; Sheppard, D. 2016. Deacetylation of Fungal Exopolysaccharide Mediates Adhesion and Biofilm Formation. mBio 7 (2): e00252-16.
- Leite, D.; Yamamoto, A.; Amadio, J.; Martins, E.; Do Santos, F.; Simões, S.; Hahn, R. 2012. *Trichocomaceae*: biodiversity of *Aspergillus spp* and *Penicillium spp* residing in libraries. Journal of Infection in developing countries 6(10):734-43.
- Lewis, R.; Wiederhold, N.; Chi, J.; Han, X.; Komanduri, K.; Kontoyiannis, D.; Prince, R. 2005. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. Infection and immunity, 73(1): 635–637.
- Lui, 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.; Zhang, R.; Yang, X.; Wu, H.; Xu, D.; Tang, Z.; Shen, Q. 2011. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. International Biodeterioration & Biodegradation 65(5):717-725.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 1936: 265-275.

- Mandels, M.; Reese, E. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology* 79(6): 816–826.
- McCormick, A.; Loeffler, J.; Ebel, F. 2010. *Aspergillus fumigatus*: Contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology* 12(11): 1535–1543.
- Miettinen-Oinonen, A.; Suominen, P. 2002. Enhanced Production of *Trichoderma reesei* Endoglucanases and Use of the New Cellulase Preparations in Producing the Stonewashed Effect on Denim Fabric. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 3956–3964.
- Miettinen-Oinonen, A.; Londesborough, J.; Joutsjoki, V.; Lantto, R.; Vehmaanperä, J. 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology* 34(4): 332–341.
- Miettinen-Oinonena, A.; Paloheimoa, M.; Lantto, R.; Suominena, P. 2005. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. *Journal of Biotechnology* 116(3): 305- 317.
- Mowat, E.; Butcher, J.; Lang, S.; Williams, C.; Ramage, G.J. 2007. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Microbiology*. 56(9):1205-1212.
- Nierman, W.; Pain, A.; Anderson, M.; Wortman, J.; Kim, H.; Arroyo, J. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438:1151- 6.
- Oyeleke, S.; Egwim, E.; Auta, S. 2010. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 2(7): 83-87.

- Paul, S.; Zhang, A.; Ludeña, Y.; Villena, G.K.; Yu, F.; Sherman, D.H.; Gutiérrez-Correa, M. 2017. Insights from the genome of a high alkaline cellulase producing *Aspergillus fumigatus* strain obtained from Peruvian Amazon rainforest. *Journal of Biotechnology* 251: 53–58.
- Perrin, R.; Fedorova, N.; Bok, J.; Cramer, R.; Wortman, J.; Kim, H. 2007. Transcriptional Regulation of Chemical Diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathogen* 3(4): e50.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): e45.
- Rajendran, R.; Mowat, E.; McCulloch, E.; Lappin, D.F.; Jones, B.; Lang, S.; Majithiya, J.; Warn, P.; Williams, C.; Ramage, G. 2011. La resistencia a azol de las biopelículas de *Aspergillus fumigatus* se asocia en parte con la actividad de la bomba de eflujo. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia* 55 (5), 2092-2097.
- Ramage, G.; Rajendran, R.; Gutierrez-Correa, M.; Jones, B.; Williams, C. 2011. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiology Letters* 324(2): 89–97.
- Rani, R. 2011. Beta-Glucosidase from *Aspergillus niger* NII 08121 – Molecular Characterization and Applications in Bioethanol production. Tesis para optar por el grado de Doctoris Philosophiae. Cochin University of Science and Technology. Kerala, India.
- Rementeria, A.; López-Molina, N.; Ludwig, A.; Vivanco, A.; Bikandi, J.; Pontón, J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología* 22(1):1–23.
- Sajith, S.; Priji, P.; Sreedevi, S.; Benjamin S. 2016. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *Journal of Nutrition and Food Science* 6:461.

- Samson, R.A.; Visagie, C.M.; Houbraken, J.; Hong, S.B.; Hubka, V.; Klaassen, C.H.; Perrone, G.; Seifert, K.; Susca, A.; Tanney, J.; Varga, J.; Kocsubé, S.; Szigeti, G.; Yaguchi, T.; Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141–173.
- Santos, V.; Dorner, J.; Carreira, F. 2002. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia* 156(2): 133-138.
- Sarkar, N.; Aikat, K. 2014. *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3 provides for increased cellulase production. *International Journal of Chemical Engineering* 2014: 9.
- Schmalhorst, P.S.; Krappmann, S.; Vervecken, W.; Rohde, M.; Müller, M.; Braus, G.H.; Contreras, R.; Braun, A.; Bakker, H.; Routier, F. 2008. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell* 7(8): 1268-77.
- Shah, S.R. 2013. Chemistry and applications of cellulase in textile wet processing. *Research Journal of Engineering Sciences* 2(7): 1-5.
- Silva-Dias, A.; Miranda, I.; Branco, J.; Monteiro-Soares, M.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A. 2015. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology* 6: 205.
- Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6(2):174.
- Spikes, S.; Xu, R.; Nguyen, K.; Chamilos, G.; Kontoyiannis, D.; Jacobson, R.; Ejzykiewicz, D.; Chiang, L.; Filler, S.; May, G. 2008. Gliotoxin Production in *Aspergillus fumigatus* Contributes to Host-Specific Differences in Virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 197(3): 479–486.

- Sugui, J.A.; Pardo, J.; Chang, Y.C.; Zarembek, K.A.; Nardone, G.; Galvez, E.M.; Mullbacher, A.; Gallin, J.; Simon, M.; Kwon-Chung, K.J. 2007. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryotic cell*, 6(9): 1562–1569.
- Suresh, N.; Das, A.; Vasanthi, N. 2013. Isolation and characterization of acid phosphatase, alkaline phosphatase and phytase from *Aspergillus fumigatus* for uses in industrial applications. *Rasayan Journal of Chemistry* 6(4): 292-299.
- Tekaiia, F.; Latgé, J.P. 2005. *Aspergillus fumigatus*: Saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology* 8(4): 385–392.
- Thau, N.; Monod, M.; Crestani, B.; Rolland, C.; Tronchin, G.; Latgé, J.P.; Paris, S. 1994. rodletless Mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, 62(10): 4380–4388.
- Thomas, S.; Elkinton, J. 2004. Pathogenicity and virulence. *Journal of invertebrate pathology*, 85(3), 146-151.
- Vega, K.; Villena, G.K.; Sarmiento, V.H.; 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(2012): 7.
- Viikari, L.; Grönqvist, S.; Kruus, K.; Pere, J.; Siika-Aho, M.; Suurnäkki, A. 2010. Industrial Biotechnology in the Paper and Pulp Sector. In *Industrial Biotechnology* 11: 385-412.
- Villena, G.K.; Gutierrez-Correa, M. 2006. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters Applied Microbiology* 43: 262–268.
- Wood, T.; McCrae, S. 1979. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Advances in Chemistry* 181: 181-209.

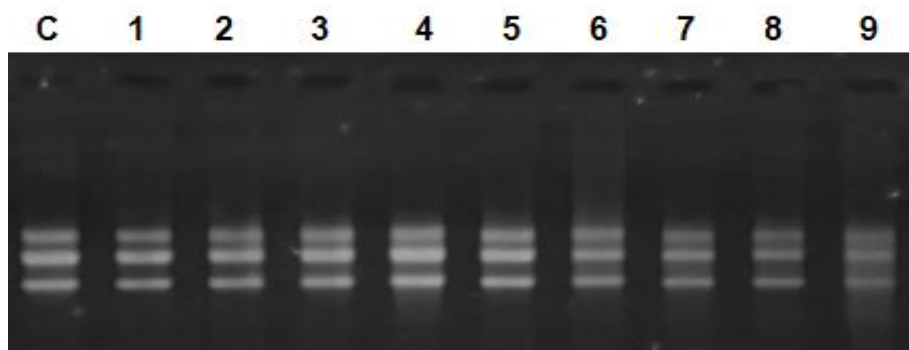
- Xiao, Z.; Storms, R.; Tsang, A. 2005. Microplate-based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. *Analytical Biochemistry* 342(1):176–178.
- Zhang, A. 2015. Selección y mejoramiento de hongos productores de celulasas alcalinas mediante mutagénesis al azar. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Zhao, S.; Gibbons, J. 2018. A population genomic characterization of copy number variation in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 13(8): e0201611.

VII. ANEXOS

Anexo 1: Calidad e integridad del RNA extraído

A partir de 50 mg de biomasa pudo obtenerse concentraciones de RNA entre 400 y 800 ng/ μ l, en todas las condiciones evaluadas. La pureza se evaluó en base a la relación A 260/280 y 260/230 que en todos los casos se mantuvo dentro del rango referenciado de 1.8 - 2.0 y mayor a 2.0, respectivamente. Asimismo, la integridad del material obtenido fue evaluada mediante la estimación visual de las bandas de RNA ribosómico en un gel de agarosa al 1 por ciento. Se verificó que la relación de RNA ribosómico 28S/18S fue de aproximadamente 2 para todas las muestras, lo que indicó la integridad de las mismas. A continuación, se mostrará la concentración, pureza e integridad del RNA extraído para cada una de las condiciones.

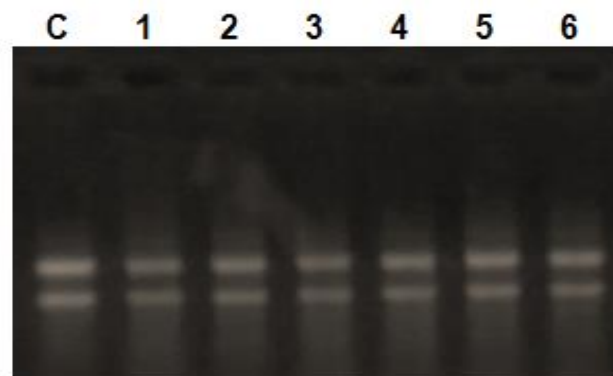
	Control	Sumergido			Biopelícula-tela			Biopelícula-placa		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
ng/ μ l	498	765	340	721	422	536	689	572	493	810
260/280	2.12	1.95	2.07	2.08	2.11	2.08	2.09	2.07	2.10	1.95
260/230	2.09	2.35	2.05	2.14	2.11	2.11	2.30	2.06	2.21	2.18



Muestras de RNA de cultivo sumergido, cultivo en biopelículas en tela y en placas.

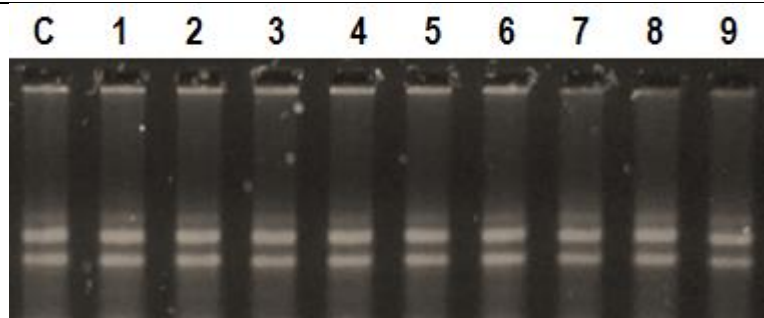
En cada carril se cargó aproximadamente 1 μ g de RNA.

	Control	28°C			37°C		
		1	2	3	4	5	6
ng/μl	498	437	716	595	609	591	764
260/280	2.12	2.05	.202	1.97	2.10	2.06	2.03
260/230	2.09	2.19	2.20	2.15	2.18	2.34	2.27



Muestras de RNA de cultivo en biopelículas a 28°C y 37°C. En cada carril se cargó aproximadamente 1μg de RNA.

	Control	LMB-35Aa			LMB-35Aa-6I			LMB-35Aa-12II		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
ng/μl	498	465	640	321	641	702	733	572	551	460
260/280	2.12	2.05	2.04	2.07	2.05	2.02	2.04	2.03	2.07	2.11
260/230	2.09	2.32	2.15	2.23	2.20	2.30	2.25	2.14	2.12	2.07



Muestras de RNA de cultivo en biopelículas de la cepa silvestre *A. fumigatus* LMB-35Aa y sus mutantes (LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II). En cada carril se cargó aproximadamente 1μg de RNA.

Habiendo verificado la cantidad, pureza e integridad del RNA extraído se procedió a preparar un *pool* de tres réplicas biológicas para cada condición. Partiendo de este *pool* y

mediante reacciones de retro transcripción, se obtuvo DNA copia que permitió la posterior cuantificación de la expresión de genes. Se realizaron diluciones de las muestras a una misma concentración (1:10) con el objetivo de amplificar una cantidad similar de templado inicial

Anexo 2: Eficiencia de las reacciones de amplificación

Eficiencias de reacción (E) expresadas en porcentaje, calculadas en función de la pendiente de la curva de estándar ($E\% = 10^{-1/\text{pendiente de la curva estándar}} \times 100$) para los cebadores diseñados para cada gen señalado.

CEBADOR	EFICIENCIA (E%)
GENES DE REFERENCIA	
<i>btub</i>	93 %
<i>tef1</i>	88 %
GENES DE CELULASAS	
<i>afu7g06150</i>	99 %
<i>afu6g07480</i>	120 %
<i>egl2</i>	84 %
<i>egl3</i>	75 %
<i>afu1g12560</i>	92 %
<i>afu3g03950</i>	95 %
<i>afu5g01830</i>	111 %
<i>afu5g13990</i>	82 %
<i>bgt2</i>	79 %
<i>afu7g01540</i>	98 %
<i>afu6g01800</i>	100 %

CEBADOR	EFICIENCIA (E%)
GENES DE PATOGENICIDAD	
<i>rho</i>	88 %
<i>ags1</i>	85 %
<i>agd3</i>	85 %
<i>glfA</i>	83 %
<i>rodB</i>	86 %
<i>calA</i>	88 %
<i>mdr4</i>	87 %

<i>atrF</i>	104 %
<i>gliZ</i>	93 %
<i>aspF1</i>	84 %
<i>aspHs</i>	81 %
<i>ftmA</i>	101 %
<i>ftmF</i>	84 %
<i>laeA</i>	86 %
<i>rtfA</i>	89 %
<i>medA</i>	123 %

Anexo 3: Análisis estadístico

3.1. Cinética de producción de endoglucanasas de la cepa LMB-35Aa a 28°C

H₀ = No existen diferencias significativas en las actividades enzimáticas a un determinado pH o tiempo de cultivo.

H₁ = Existen diferencias significativas en las actividades enzimáticas a un determinado pH o tiempo de cultivo.

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	12309.4361	<0.0001
pH	3	101.7768	<0.0001
Horas	4	2085.3854	<0.0001
pH:Horas	12	12.0556	<0.0001

Cinetica - Medias ajustadas y errores estándares para pH*Hora:

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

pH	Horas	Medias	E.E.	
4.8	120	0.2035	0.0078	A
4.8	96	0.1927	0.0040	A B
4.8	72	0.1842	0.0037	B
7.6	96	0.1692	0.0040	C
7.6	72	0.1553	0.0037	D
9.4	96	0.1525	0.0040	D E
8.4	96	0.1402	0.0040	D E F
7.6	120	0.1397	0.0078	D E F G
8.4	120	0.1382	0.0078	E F G
9.4	120	0.1312	0.0078	F G
9.4	72	0.1270	0.0037	G
8.4	72	0.1258	0.0037	G
4.8	48	0.0722	0.0023	H
7.6	48	0.0710	0.0023	H
8.4	48	0.0552	0.0023	I
9.4	48	0.0497	0.0023	I
4.8	24	0.0350	0.0014	J
7.6	24	0.0213	0.0014	K
8.4	24	0.0187	0.0014	K
9.4	24	0.0137	0.0014	L

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

A un nivel de confianza del 95 por ciento, se puede afirmar que existen diferencias significativas

(p-valor < 0.05) en la actividad enzimática en los distintos tiempos de cultivo y pH utilizados.

3.2. Cinética de producción de endoglucanasas de la cepa LMB-35Aa a 37 °C

H₀ = No existen diferencias significativas en las actividades enzimáticas a un determinado pH o tiempo de cultivo.

H₁ = Existen diferencias significativas en las actividades enzimáticas a un determinado pH o tiempo de cultivo

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R ²	0
120	-595.06	-529.93	322.53	2.5E-03	0.98	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	25212.03	<0.0001
pH	3	497.36	<0.0001
Horas	4	2995.63	<0.0001
pH:Horas	12	24.54	<0.0001

Cinetica - Medias ajustadas y errores estándares para pH*Horas

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

pH	Horas	Medias	E.E.	
7.6	120	0.2753	0.0034	A
7.6	96	0.2557	0.0049	B
7.6	72	0.2320	0.0050	C
4.8	120	0.2242	0.0034	C
4.8	96	0.1942	0.0049	D
4.8	72	0.1797	0.0050	E
8.4	120	0.1758	0.0034	E
8.4	96	0.1632	0.0049	F
9.4	96	0.1632	0.0049	F
9.4	120	0.1507	0.0034	G
8.4	72	0.1460	0.0050	G
7.6	48	0.1392	0.0045	H
9.4	72	0.1385	0.0050	H
4.8	48	0.1053	0.0045	H
7.6	24	0.0840	0.0010	I
8.4	48	0.0680	0.0045	J
4.8	24	0.0605	0.0010	K
9.4	48	0.0593	0.0045	K
9.4	24	0.0322	0.0010	K
8.4	24	0.0303	0.0010	L
				L

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

A un nivel de confianza del 95 por ciento, se puede afirmar que existen diferencias significativas

(p-valor < 0.05) en la actividad enzimática en los distintos tiempos de cultivo y pH utilizados.

3.3. Rendimiento enzimático de la cepa LMB-35Aa a 28°C y 37°C

H0 = No existen diferencias significativas en los rendimientos enzimáticos entre 28°C y 37°C a ningún pH determinado.

H1 = Existen diferencias significativas en los rendimientos enzimáticos entre 28°C y 37°C a un pH determinado

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento	48	0.87	0.85	8.16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	91954.02	7	13136.29	38.17	<0.0001
Temperatura	419.21	1	419.21	1.22	0.2763
pH	47135.50	3	15711.83	45.66	<0.0001
Temperatura*pH	44399.31	3	14799.77	43.01	<0.0001
Error	13765.20	40	344.13		
Total	105719.22	47			

Existe interacción entre Temperatura y pH (p-value<0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=21.64627

Error: 344.1300 gl: 40

Temperatura	pH	Medias	n	E.E.			
28 °C	9.40	180.89	6	7.57	A		
28 °C	7.60	185.78	6	7.57	A		
37 °C	9.40	187.96	6	7.57	A		
37 °C	8.40	212.02	6	7.57		B	
28 °C	8.40	224.56	6	7.57		B	C
37 °C	4.80	236.38	6	7.57			C
37 °C	7.60	284.92	6	7.57			D
28 °C	4.80	306.40	6	7.57			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

A un nivel de confianza del 95 por ciento, se puede afirmar que existen diferencias significativas en los rendimientos enzimáticos entre 28 °C y 37 °C, en al menos 1 pH.

3.4. Actividad específica de la cepa LMB-35Aa a 28°C y 37°C

H0 = No existen diferencias significativas en las actividades específicas entre 28°C y 37°C a ningún pH determinado.

H1 = Existen diferencias significativas en las actividades específicas entre 28°C y 37°C a un pH determinado

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento	48	0.78	0.74	12.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4589904.88	7	655700.70	19.93	<0.0001
Temperatura	1007023.85	1	1007023.85	30.61	<0.0001
pH	920349.55	3	306783.18	9.33	0.0001
Temperatura*pH	2662531.48	3	887510.49	26.98	<0.0001
Error	1315888.97	40	32897.22		
Total	5905793.85	47			

Existe interacción entre Temperatura y pH (p-value<0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=211.64178

Error: 32897.2243 gl: 40

Temperatura	pH	Medias	n	E.E.	
28 °C	7.60	990.90	6	74.05	A
28 °C	9.40	1303.41	6	74.05	B
37 °C	9.40	1341.37	6	74.05	B
37 °C	8.40	1402.58	6	74.05	B
28 °C	8.40	1416.64	6	74.05	B
28 °C	4.80	1673.23	6	74.05	C
37 °C	4.80	1703.26	6	74.05	C
37 °C	7.60	2095.72	6	74.05	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

A un nivel de confianza del 95 por ciento, se puede afirmar que existen diferencias significativas en las actividades específicas entre 28 °C y 37 °C, en al menos 1 pH.

3.5. Rendimiento enzimático de la cepa LMB-35Aa, LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II

H0 = No existen diferencias significativas en los rendimientos enzimáticos entre la cepas silvestre y mutantes, a ningún pH determinado.

H1 = Existen diferencias significativas en los rendimientos enzimáticos entre las cepas silvestre y mutantes, a un pH determinado

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento enzimático	72	0.97	0.97	7.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	266254.89	11	24204.99	190.98	<0.0001
pH	247951.90	3	82650.63	652.14	<0.0001
cepas	14916.53	2	7458.27	58.85	<0.0001
pH*cepas	3386.46	6	564.41	4.45	0.0009
Error	7604.29	60	126.74		
Total	273859.18	71			

Existe interacción entre Temperatura y pH (p-value<0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=13.00133

Error: 126.7382 gl: 60

pH	cepas	Medias	n	E.E.				
9.40	35Aa	57.12	6	4.60	A			
9.40	35Aa-12II	64.68	6	4.60	A	B		
9.40	35Aa-6I	73.23	6	4.60		B		
8.40	35Aa-12II	107.13	6	4.60			C	
8.40	35Aa	113.18	6	4.60			C	
8.40	35Aa-6I	153.61	6	4.60				D
4.80	35Aa	190.25	6	4.60				E
4.80	35Aa-12II	190.64	6	4.60				E
7.60	35Aa	192.22	6	4.60				E
7.60	35Aa-12II	198.82	6	4.60				E
4.80	35Aa-6I	212.42	6	4.60				F
7.60	35Aa-6I	239.68	6	4.60				
	G							

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

A un nivel de confianza del 95 por ciento, se puede afirmar que existen diferencias significativas en los rendimientos enzimáticos entre las cepas, en al menos 1 pH.

3.6. Actividad específica de la cepa LMB-35Aa, LMB-35Aa-6I y LMB-35Aa-12II

H0 = No existen diferencias significativas en las actividades específicas entre las cepas silvestre y mutante, a ningún pH determinado.

H1 = Existen diferencias significativas en las actividades específicas entre las cepas silvestre y mutantes a un pH determinado

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Actividad específica (U/g..		72	0.95	0.95	10.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15634747.76	11	1421340.71	115.68	<0.0001
pH	12548083.15	3	4182694.38	340.43	<0.0001
cepas	2823956.64	2	1411978.32	114.92	<0.0001
pH*cepas	262707.97	6	43784.66	3.56	0.0044
Error	737196.42	60	12286.61		
Total	16371944.19	71			

Existe interacción entre Temperatura y pH (p-value<0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=128.01177

Error: 12286.6070 gl: 60

pH	cepas	Medias	n	E.E.				
9.40	35Aa-12II	373.20	6	45.25	A			
9.40	35Aa	446.28	6	45.25	A			
9.40	35Aa-6I	607.92	6	45.25		B		
8.40	35Aa-12II	674.22	6	45.25		B		
8.40	35Aa	903.68	6	45.25			C	
4.80	35Aa-12II	1176.85	6	45.25				D
7.60	35Aa-12II	1253.59	6	45.25				D
8.40	35Aa-6I	1266.16	6	45.25				D
4.80	35Aa	1439.77	6	45.25				E
7.60	35Aa	1453.58	6	45.25				E
4.80	35Aa-6I	1711.75	6	45.25				F
7.60	35Aa-6I	1818.95	6	45.25				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

A un nivel de confianza del 95 por ciento, se puede afirmar que existen diferencias significativas en las actividades específicas entre las cepas, en al menos 1 pH.