

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**“OBTENCIÓN DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS MIXTAS DE
Trichoderma reesei Y *Aspergillus* spp. Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN
GÉNICA DE CELULASAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

KATHERINE RUTH GARCIA LUQUILLAS

LIMA - PERÚ

2020

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 - Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“OBTENCIÓN DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS MIXTAS DE
Trichoderma reesei Y *Aspergillus* spp. Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN
GÉNICA DE CELULASAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA”**

Presentado por:

KATHERINE RUTH GARCIA LUQUILLAS

Tesis para Optar al Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Rosa Espejo Joya
PRESIDENTE

Ph. D. Ana Kitazono Sugahara
MIEMBRO

Ph. D. Gretty K. Villena Chávez
MIEMBRO

Ph. D. Ilanit Samolski Klein
ASESORA

“La verdadera ciencia, enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.”

Miguel de Unamuno

“Si de noche lloras por el sol, las lágrimas te impedirán ver las estrellas.”

Rabindranath Tagore

“Knowing is not enough; we must apply.
Willing is not enough; we must do”

Johann Wolfgang von Goethe

To everyone that never give up.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, un agradecimiento especial a Innóvate Perú y al proyecto “Análisis transcriptómico de biopelículas mixtas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* mediante secuenciamiento de ARN (RNA-Seq) orientado a la producción de celulasas y hemicelulasas” con contrato N° 191-FINCYT-PNIC-BRI-2015, por el financiamiento y apoyo en esta tesis.

Agradezco a todo el equipo del Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa”, en especial a Ilanit Samolski Ph. D. y Gretty Villena Ph. D., por su constante apoyo a lo largo de esta investigación. Los consejos, la experiencia y cariño permanecerán siempre en mi memoria.

A mis amigos, gracias por ser mi soporte emocional día a día, por animarme en mis momentos difíciles y compartir mis alegrías. Por no olvidarse de esta amiga “sin vida social”.

Y, por último, estoy plenamente agradecida por la infinita paciencia y confianza de mi familia, por ser mi soporte económico e invertir tanto en mí, sus valores no serán olvidados.

En memoria del profesor Marcel, por darme la oportunidad de conocerlo, crecer profesional y académicamente y creer en cada uno de sus alumnos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. SUSTRATO DE CELULASAS: LA CELULOSA.....	4
2.2. CELULASAS FÚNGICAS.....	6
2.2.1. Clasificación de celulasas.....	7
2.3. ASCOMICETOS PRODUCTORES DE CELULASAS.....	9
2.3.1. <i>Trichoderma reesei</i>	11
2.3.2. <i>Aspergillus niger</i>	15
2.3.3. <i>Aspergillus phoenicis</i>	17
2.4. PRODUCCIÓN DE CELULASAS EN CULTIVOS FÚNGICOS MIXTOS.....	18
2.4.1. Sistemas fermentativos.....	18
2.4.2. Cultivos mixtos de <i>T. reesei</i> y <i>Aspergillus</i> spp.	20
2.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CELULASAS.....	21
2.5.1. Modelo en <i>T. reesei</i>	23

2.5.2.	Modelo en <i>A. niger</i>	25
2.6.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	31
3.2.	MICROORGANISMOS: CEPAS, MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN.....	31
3.3.	MEDIOS DE CULTIVO.....	32
3.3.1.	Medio PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>).....	32
3.3.2.	Medio para producción de celulasas.....	32
3.3.3.	Medio de pre-crecimiento.....	32
3.3.3.	Medio semi-sólido de producción de celulasas.....	32
3.4.	TEST DE COMPATIBILIDAD DE CEPAS: ENSAYO DE CONFRONTACIÓN EN MEDIO SEMI-SÓLIDO.....	33
3.5.	PROCEDIMIENTOS PARA LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS.....	33
3.5.1.	Obtención del inóculo.....	33
3.5.2.	Protocolo estándar de formación de biopelículas.....	34
3.5.3.	Modificaciones al protocolo estándar.....	35
3.6.	MÉTODOS DE RECUPERACIÓN DE ENZIMAS.....	35
3.6.1.	A partir de medio de cultivo semi-sólido.....	35
3.6.2.	A partir de medio de cultivo líquido.....	35
3.7.	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	36
3.7.1.	Determinación de biomasa.....	36

3.7.2.	Métodos bioquímicos cualitativos.....	36
3.7.3.	Métodos bioquímicos cuantitativos.....	37
3.8.	CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y DE CRECIMIENTO.....	38
3.9.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CELULASAS.....	38
3.9.1.	Diseño de cebadores.....	38
3.9.2.	Extracción y purificación de ARN.....	40
3.9.3.	Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	42
3.9.4.	Análisis de expresión génica relativa de celulasas mediante qPCR.....	42
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	44
4.1.	OBTENCIÓN DE UN SISTEMA ÓPTIMO DE CULTIVO DE BIOPELÍCULAS MIXTAS.....	44
4.1.1.	Velocidad de agitación.....	44
4.1.2.	Compatibilidad entre cepas.....	46
4.1.3.	Soporte para el desarrollo de la biopelícula.....	49
4.1.4.	Etapas de cultivo de la biopelícula.....	51
4.1.5.	Porcentaje de inóculo (v/v) con respecto al volumen del medio de producción.....	53
4.1.6.	Fuente de carbono para la producción de celulasas.....	56
4.1.7.	Resumen y consideraciones finales.....	60
4.2.	ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y DE CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS MIXTAS Y SIMPLES.....	62

4.2.1. Cinética de crecimiento.....	62
4.2.2. Cinética de producción de celulasas.....	68
4.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE CELULASAS Y SUS REGULADORES MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	72
4.3.1. Diseño de cebadores especie-específicos.....	72
4.3.2. Análisis de expresión relativa de celulasas y sus reguladores.....	76
V. CONCLUSIONES.....	81
VI. RECOMENDACIONES.....	83
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	84
VIII. ANEXOS.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades físicas de algunos sustratos celulósicos.	6
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los hongos en estudio.	11
Tabla 3. Enzimas celulolíticas de <i>T. reesei</i> .	15
Tabla 4. Enzimas celulolíticas de <i>A. niger</i> .	17
Tabla 5. Cepas utilizadas en este trabajo, donadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), colección ARS (NRRL).	31
Tabla 6. Cuadro resumen del sistema óptimo de cultivo de biopelículas simples y mixtas.	61
Tabla 7. Comparación de parámetros de productividad para producción de endoglucanasas en biopelículas de <i>T. reesei</i> , mixto y <i>A. niger</i> tras 24 horas de cultivo.	71
Tabla 8. Secuencias de los cebadores de genes seleccionados para <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> .	74
Tabla 9. Temperaturas de disociación (T _m) de cebadores especie-específico con tres ADNc.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura molecular de la celulosa.	4
Figura 2. Composición de una fuente natural de celulosa vegetal.	5
Figura 3. Mecanismo de acción de las celulasas.	7
Figura 4. Árbol filogenético del análisis Bayesiano para genomas mitocondriales de <i>Ascomycota</i> .	10
Figura 5. Morfología de <i>T. reesei</i> .	12
Figura 6. Mutantes de <i>T. reesei</i> desarrollados por diferentes agentes mutágenos.	13
Figura 7. Morfología de <i>A. niger</i> .	16
Figura 8. Clasificación de los sistemas de fermentación.	19
Figura 9. Descripción general de la red de reguladores involucrados en la degradación de biomasa vegetal. Basado en el conocimiento de los sistemas modelos de <i>Aspergillus</i> , <i>Neurospora crassa</i> y <i>Trichoderma reesei</i> .	22
Figura 10. Modelo para la regulación de la expresión de celulasas en <i>T. reesei</i> .	23
Figura 11. Modelo para la regulación de la expresión de celulasas en <i>A. niger</i> .	26
Figura 12. Ejemplo de curva de eficiencia de amplificación de un par de cebadores.	30

Figura 13.	Esquema para ensayo de confrontación y zonas (en recuadro rojo) para la extracción de enzimas.	33
Figura 14.	Imagen parcial de alineamiento del gen de referencia <i>sarA</i> de <i>A. niger</i> y <i>sar1</i> de <i>T. reesei</i> en el software online <i>Clustal Omega</i> .	39
Figura 15.	Efecto de la velocidad de agitación (175 y 120 rpm) sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas simples de <i>T. reesei</i> QM6a.	45
Figura 16.	Ensayo de confrontación de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> , inoculados simultáneamente.	46
Figura 17.	Ensayos de confrontación optimizados de A) <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> ; y B) <i>T. reesei</i> y <i>A. phoenicis</i> , para la recuperación de enzimas.	47
Figura 18.	Actividad enzimática cualitativa endoglucanasa de placas duales de <i>T. reesei</i> - <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> - <i>A. phoenicis</i> .	47
Figura 19.	Efecto de la compatibilidad de cepas sobre el peso seco de biomasa de biopelículas mixtas de dos combinaciones de <i>Aspergillus</i> sp. con <i>T. reesei</i> QM6a.	48
Figura 20.	Efecto del soporte de poliéster (Tela vs. Fibra) sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas de <i>T. reesei</i> QM6a y mixtas.	50
Figura 21.	Efecto del pre-crecimiento de la biopelícula (cultivo en 1 etapa vs. 2 etapas) sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas simples de <i>T. reesei</i> QM6a y mixtas.	52
Figura 22.	Réplicas biológicas de biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> .	52
Figura 23.	Efecto de los porcentajes de inóculo total sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas simples de <i>T. reesei</i> QM6a.	54

Figura 24.	Efecto de los porcentajes de inóculo total sobre el crecimiento de biopelículas mixtas de <i>T. reesei</i> QM6a y <i>A. niger</i> .	54
Figura 25.	Biopelículas simples y mixta de <i>T. reesei</i> QM6a y <i>A. niger</i> obtenidas tras 24 horas de pre-cultivo en medio de pre-crecimiento con 1.50 por ciento de inóculo total.	56
Figura 26.	Efecto de la fuente de carbono (lactosa 1 por ciento vs. CMC 1 por ciento) del medio de producción sobre el crecimiento de biopelículas simples y mixtas de <i>T. reesei</i> QM6a y <i>A. niger</i> .	57
Figura 27.	Actividad cualitativa endoglucanasa de las enzimas secretadas por biopelículas de <i>T. reesei</i> , mixtas y <i>A. niger</i> en medio de producción de celulasas con CMC 1 por ciento y lactosa 1 por ciento tras 24 horas de cultivo.	58
Figura 28.	Biopelículas simples y mixta en medio de producción con CMC 1 por ciento.	60
Figura 29.	Cinética de crecimiento de biopelículas simples de <i>T. reesei</i> con el sistema óptimo de cultivo.	63
Figura 30.	Cinética de crecimiento de biopelículas simples de <i>A. niger</i> con el sistema óptimo de cultivo.	64
Figura 31.	Cinética de crecimiento de biopelículas mixtas de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> con el sistema óptimo de cultivo.	65
Figura 32.	Vista del reverso de una placa dual del ensayo de confrontación entre cepas de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> en medio semi-sólido de producción de celulasas optimizado para la extracción de enzimas.	66
Figura 33.	Cinética cualitativa de producción de endoglucanasas de biopelículas simples de <i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> y mixta.	69
Figura 34.	Cinética cualitativa de producción de β -glucosidasas de biopelículas simples de <i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> y mixta.	70

Figura 35. Análisis de expresión relativa de genes de celulasas y reguladores en biopelículas mixtas respecto a sus biopelículas simples del primer lote de cultivo.

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Esquema del procedimiento estándar para la formación de biopelículas	100
Anexo 2. Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry.	101
Anexo 3. Curva estándar de glucosa para actividad endoglucanasa en microplaca.	101
Anexo 4. Curva estándar de glucosa para actividad de celulasas totales (FPA).	102
Anexo 5. Diseño de placa para análisis de expresión de genes mediante qPCR.	102
Anexo 6. Prueba estadística de la comparación de coeficiente específico de adherencia de dos velocidades de agitación en biopelículas de <i>T. reesei</i> tras 72 horas de cultivo.	103
Anexo 7. Pruebas estadísticas para comparación del coeficiente específico de adherencia de compatibilidad de especies entre <i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> y <i>A. phoenicis</i> tras 72 horas de cultivo.	104
Anexo 8. Comparación de peso seco de biomasa adherida de biopelículas individuales de <i>T. reesei</i> QM6a y mixtas en diferentes soportes tras 72 horas de cultivo.	105
Anexo 9. Pruebas estadísticas de la comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas individuales de <i>T. reesei</i> QM6a y mixtas en diferentes soportes tras 72 horas de cultivo.	106

Anexo 10.	Biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> en cultivo de 1 etapa tras 72 horas de cultivo en medio de producción de celulasas.	107
Anexo 11.	Comparación de peso seco de biomasa adherida de biopelículas individuales de <i>T. reesei</i> QM6a y mixtas en distintos tipos de cultivo tras 72 horas de cultivo.	107
Anexo 12.	Pruebas estadísticas de la comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas individuales de <i>T. reesei</i> QM6a y mixtas en distintos tipos de cultivo tras 72 horas de cultivo.	109
Anexo 13.	Comparación de peso seco de biomasa adherida de biopelículas individuales de <i>T. reesei</i> QM6a a diferentes porcentajes de inóculo.	110
Anexo 14.	Pruebas estadísticas de comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas individuales de <i>T. reesei</i> QM6a a diferentes porcentajes de inóculo tras 72 horas de cultivo.	111
Anexo 15.	Pruebas estadísticas de comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas mixtas a diferentes porcentajes de inóculo a 48 horas.	112
Anexo 16.	Pruebas estadísticas de comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas simples y mixtas en dos medios de producción tras 48 horas de cultivo.	113
Anexo 17.	Estadísticos descriptivos de Proteínas totales g/L.	114
Anexo 18.	Estadísticos descriptivos de Actividad endoglucanasa U/L.	114
Anexo 19.	Estadísticos descriptivos de los parámetros de productividad.	115
Anexo 20.	Pruebas estadísticas de comparación para parámetros de productividad.	116
Anexo 21.	Comprobación de actividad cualitativa endoglucanasa en cultivos para extracción de ARN.	117

Anexo 22.	Lecturas de espectrofotométricas en NanoDrop™ de ARN, obtenidas a partir de un <i>pool</i> de 3 réplicas biológicas.	118
Anexo 23.	Integridad de ARN de réplicas biológicas de biopelículas <i>T. reesei</i> , mixto y <i>A. niger</i> de dos lotes en gel de agarosa 1 por ciento.	118
Anexo 24.	Curvas de fusión de la amplificación de algunos cebadores específicos, en la parte superior específicos para <i>T. reesei</i> y en la parte inferior para <i>A. niger</i> .	119
Anexo 25.	Gel de agarosa (1.5 por ciento) de la prueba de especificidad de cebadores en qPCR para la comprobación diferencial de bandas. Amplificación para <i>cbh1</i> a 60°C y 65°C de temperatura de alineamiento.	119
Anexo 26.	Gel de agarosa (1.5 por ciento) de la prueba de especificidad de cebadores en qPCR para la comprobación diferencial de bandas. Amplificación para <i>xyl1</i> a 60°C de temperatura de alineamiento.	120
Anexo 27.	Eficiencias de cebadores halladas mediante el programa LinRegPCR.	120
Anexo 28.	Análisis de expresión génica relativa de biopelículas mixtas con respecto a biopelículas simples de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> de dos lotes de cultivo.	121

RESUMEN

Los sistemas fermentativos mediante biopelículas fúngicas son de gran interés industrial debido a su alta eficiencia en la producción de enzimas celulolíticas y lignocelulolíticas. Por otra parte, los cultivos mixtos han mostrado altos títulos de enzimas celulasas, así como la expresión de rutas biosintéticas inactivas en monocultivos. En este estudio, se compararon biopelículas mixtas de *Trichoderma reesei* QM6a y *Aspergillus niger* ATCC® 10864 con sus respectivos monocultivos a nivel de actividad enzimática celulolítica y del análisis de expresión de genes celulasas y sus reguladores. Con el propósito de obtener biopelículas óptimas para realizar el estudio, se modificaron factores determinantes como la velocidad de agitación, cepas, soporte, etapas de cultivo, porcentaje de inóculo y fuente de carbono. Tras 24 horas de cultivo en presencia de carboximetilcelulosa (CMC), las biopelículas mixtas exhibieron mayor actividad enzimática β -endoglucanasa que las respectivas biopelículas simples, mientras que la actividad β -glucosidasa en el sistema mixto fue mayor solamente con respecto al monocultivo de *T. reesei*. Asimismo, a nivel de productividad, la sinergia observada en el sistema mixto fue significativa solamente con respecto a la biopelícula simple de *T. reesei*. Para determinar qué genes eran responsables del sinergismo enzimático observado, se diseñaron cebadores específicos para cada hongo. Los resultados del análisis de expresión génica mediante qPCR indicaron que la actividad β -glucosidasa observada en las biopelículas mixtas se debe al aporte de *T. reesei* y no de *A. niger*. Se concluyó que el diálogo molecular establecido entre ambos hongos en la biopelícula mixta promueve la producción de celulasas en *T. reesei*, descartándose que el sinergismo sea consecuencia de una complementariedad de funciones enzimáticas, sino más bien de los mecanismos de regulación que tienen lugar en la interacción interespecífica.

Palabras clave: Biopelículas mixtas, *Ascomycota*, PCR cuantitativa, celulasas.

ABSTRACT

Fungal biofilm fermentative systems are of high industrial importance due to its high efficiency in the production of cellulolytic and lignocellulolytic enzymes. On the other hand, mixed cultures have exhibited high cellulase enzyme titer and the expression of biosynthetic pathways that are not active in monocultures. In this study, mixed biofilms of *Trichoderma reesei* QM6a and *Aspergillus niger* ATCC[®] 10864 were compared against their respective monocultures in respect of the cellulolytic enzyme activity and gene expression analysis of cellulase genes and its regulators. In order to obtain optimal biofilms to carry out the study, determining factors such as agitation speed, compatibility between strains, holder, cultivation phases, inoculum percentage and carbon source were modified. After 24 hours of culture with carboxymethylcellulose (CMC), these mixed biofilms exhibited higher endoglucanase enzymatic activity than the respective simple biofilms, while the β -glucosidase activity in the mixed system was higher only with respect to *T. reesei* monoculture. Likewise, at the productivity level, the synergy observed in the mixed system was significant only with respect to simple biofilm of *T. reesei*. To determine which genes were responsible for the observed enzyme synergism, specific primers were designed for each fungus. The results of gene expression analysis by qPCR indicated that the β -glucosidase activity observed in mixed biofilms is due to the contribution of *T. reesei* and not of *A. niger*. It was concluded that molecular dialogue established between both fungi in the mixed biofilm promotes the production of cellulases in *T. reesei*, ruling out that the synergism is consequence of an enzymatic functions complementarity, but rather to the regulatory mechanisms that take place in the interspecific interaction.

Key words: Mixed biofilms, *Ascomycota*, quantitative PCR, cellulases.

I. INTRODUCCIÓN

La demanda de enzimas industriales y preparaciones enzimáticas se ha incrementado en el mercado durante la última década. Para el 2018, se reporta como principal exportador a Dinamarca con un valor estimado de 1 290 000 miles de dólares (ITC, 2019) y se estima que el mercado global de las enzimas estará valorizado en 7.5 mil millones de dólares para el 2020. La distribución de este mercado se encuentra sectorizada de acuerdo a las necesidades específicas de los países; por ejemplo, en Europa y Norteamérica se precisan principalmente para biocombustibles y detergentes, mientras en América Latina y China, para alimentos (del Moral *et al.*, 2015).

Entre las enzimas mayormente cotizadas se encuentran las celulasas, que conforman un complejo enzimático capaz de degradar celulosa, el polisacárido más abundante del planeta, a glucosa. Estas enzimas son producidas por hongos, bacterias, protozoos, plantas y animales en la naturaleza (Zhang & Zhang, 2013); mientras que, su producción a nivel industrial es realizada en su mayoría por microorganismos (50 por ciento por hongos y levaduras, y 35 por ciento por bacterias) debido a importantes ventajas como rápido crecimiento, cultivo masivo en espacios reducidos y secreción de enzimas al medio de cultivo (del Moral *et al.*, 2015).

Los microorganismos comúnmente utilizados como productores a escala industrial son mesófilos tales como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*, capaces de crecer en un rango de temperatura de 30-35°C. Estos hongos filamentosos tienen una extraordinaria capacidad de secreción de celobiohidrolasas, endoglucanasas y β -glucosidasas, que actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa (Biswas *et al.*, 2014). Sin embargo, su producción enzimática celulolítica presenta altos costos operativos debido a los componentes del medio, el modo de cultivo y los procesos posteriores de purificación enzimática; además de generarse gran cantidad de biomasa microbiana que no se reutiliza a lo largo del proceso (Klein-Marcuschamer *et al.*, 2011).

En este contexto, la reducción de costos está ligada a mejorar la eficiencia del proceso productivo y el desarrollo de microorganismos con mayor potencial catalítico capaces de producir grandes cantidades de enzimas (Camassola, 2012). Para ello, diversos estudios indican que la fermentación por adhesión a superficies mediante biopelículas fúngicas puede ser una alternativa prometedora para optimizar la producción de celulasas (Villena & Gutiérrez-Correa 2006, 2007a, 2007b, 2012; Villena *et al.*, 2009a, 2009b, 2010; Gamarra *et al.*, 2010). Así también, el uso de cultivos mixtos puede superar las carencias nutricionales de un sustrato, dado que la sinergia entre las comunidades microbianas le permite complementar sus capacidades metabólicas (Castillo *et al.*, 1994; Dueñas *et al.*, 1995, Deshpande *et al.*, 2008).

Tal es el caso de los cultivos mixtos de *T. reesei-Aspergillus phoenicis* y *T. reesei-A. niger*, en los que dada la deficiencia de β -glucosidasas en el sistema de *T. reesei*, se plantean dos hipótesis que explican su sinergismo enzimático: la complementariedad funcional de enzimas β -glucosidasas por parte de *Aspergillus* (Duff *et al.*, 1985; Gutiérrez-Correa *et al.*, 1999), y la influencia de mecanismos de regulación presentes en interacciones interespecíficas (Daly *et al.*, 2017).

En este estudio, se optó por trabajar con *T. reesei* y *Aspergillus* spp. para su co-cultivo con el objeto de comprender la interacción sinérgica entre estos hongos en un sistema fermentativo óptimo para la producción de enzimas celulolíticas. Este trabajo se centró en mejorar este sistema mixto en biopelícula y estudiar el comportamiento molecular a través del análisis de expresión de celulasas y reguladores asociados a estos.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de genes de celulasas en biopelículas fúngicas mixtas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* spp. con el propósito de dilucidar aspectos de la interacción entre ambos hongos a nivel molecular.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar un sistema óptimo de cultivo para la obtención de biopelículas mixtas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* spp.
- Analizar la cinética de producción de celulasas y de crecimiento de biopelículas mixtas respecto a biopelículas individuales.
- Analizar la expresión de genes de celulasas en biopelículas mixtas con respecto a biopelículas individuales mediante PCR cuantitativa (qPCR).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SUSTRATO DE CELULASAS: LA CELULOSA

La celulosa es el componente estructural de las paredes celulares de las plantas y consiste en casi el 33 por ciento de su biomasa total. Es biodegradable, no tóxica, inodora, insípida, insoluble en agua y en la mayoría de solventes orgánicos (Wertz *et al.*, 2010, Golan, 2011). Este polímero lineal está conformado de “n” unidades de D-anhidroglucopiranosas unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos, cuya cadena consta de un extremo reductor y un extremo no reductor al cual se añaden los nuevos residuos de glucosa (Figura 1). Estas cadenas paralelas, llamadas también cristalinas, están altamente organizadas en microfibrillas unidas mediante enlaces puente de hidrógeno inter e intramoleculares y fuerzas de Van der Waals; es así que la pérdida de este ordenamiento da lugar a la celulosa paracrystalina o amorfa (Chandel & da Silva, 2013).

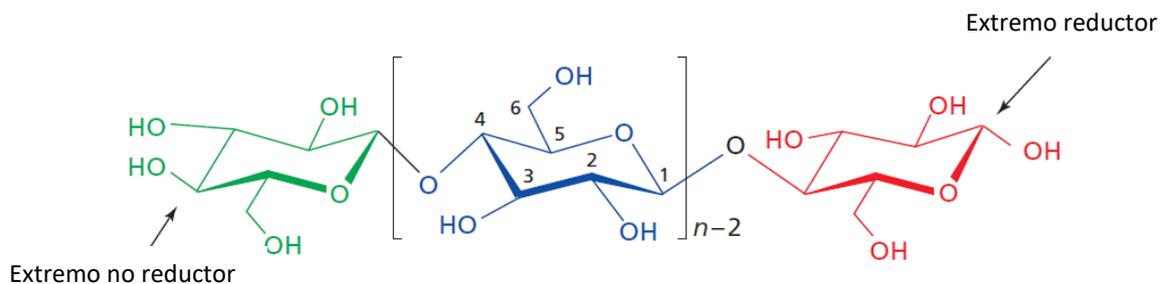


Figura 1. Estructura molecular de la celulosa.

Átomos de carbono numerados, el extremo reductor con un hemiacetal (rojo), y el extremo no reductor con un hidroxilo libre en el C4 (verde).

FUENTE: Tomada de Wertz *et al.* (2010).

En la naturaleza, los compuestos de celulosa son estructuralmente heterogéneos, es decir, tienen regiones cristalinas y amorfas. Además, con frecuencia, esta biomasa celulósica se encuentra entrecruzada en una arquitectura compleja con hemicelulosa, lignina, pectinas y glicoproteínas (Figura 2), los cuales la protegen de la degradación enzimática (Chandel

& da Silva, 2013; Gupta, 2016) por lo que es necesario la acción conjunta de diferentes enzimas para su hidrólisis.

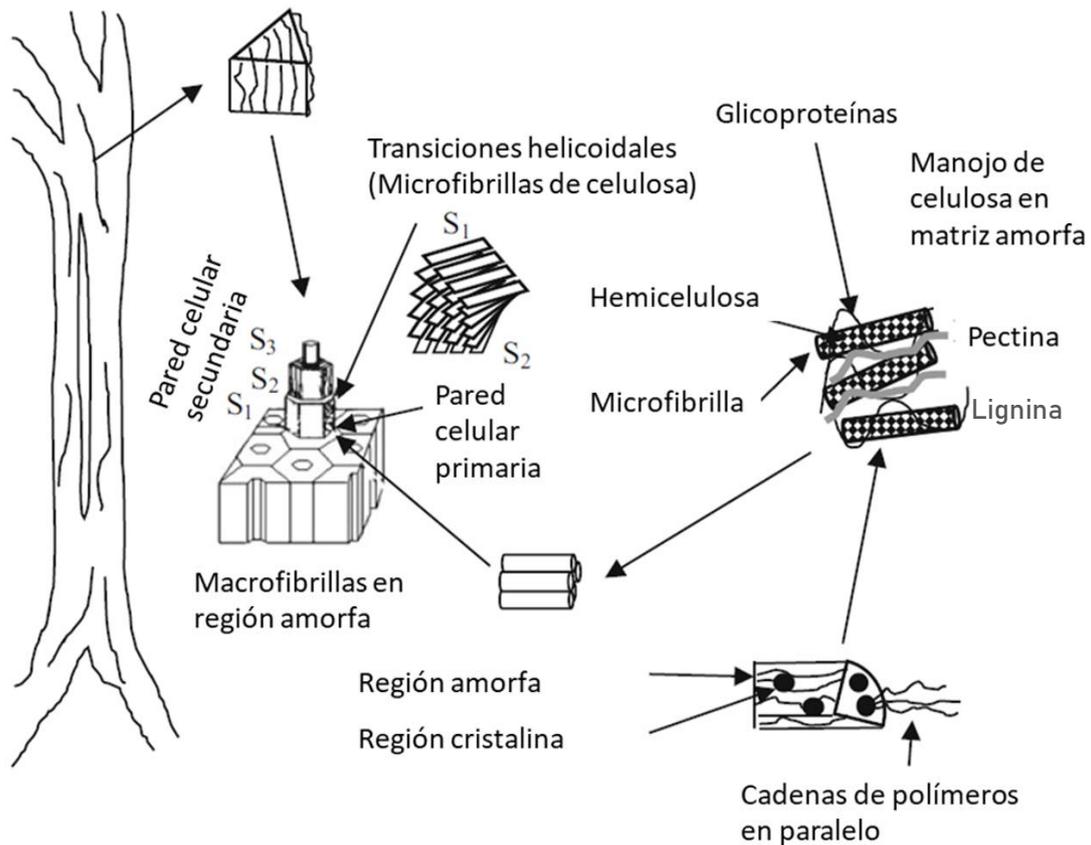


Figura 2. Composición de una fuente natural de celulosa vegetal.

FUENTE: Adaptado de Heinze *et al.* (2018).

Entre los factores que afectan la hidrólisis de la celulosa de un sustrato se encuentran: la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización (DP), el área superficial, el contenido de lignina y hemicelulosa, el tamaño de partícula y la porosidad (Biswas *et al.*, 2014). El grado de cristalinidad es importante para la determinación de digestibilidad enzimática de una muestra de celulosa, debido a que la celulosa amorfa es hidrolizada más rápido que la celulosa cristalina. El índice de cristalinidad (CI) describe la cantidad relativa de celulosa cristalina en una muestra y en la naturaleza, este índice fluctúa entre el 40 al 95 por ciento. Así también, el grado de polimerización es el número de unidades monoméricas en un polímero y define la abundancia relativa de enlaces β -glucosídicos

disponibles para digestión enzimática; por ejemplo, en la celulosa el rango va desde 500 a 15000, pero varía de acuerdo al tipo de sustrato (Chandel & da Silva, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1: Propiedades físicas de algunos sustratos celulósicos.

Sustrato	Índice de Cristalinidad	Grado de polimerización
Carboximetilcelulosa (CMC)	NA	100-2000
Avicel	0.5-0.6	300
Algodón	0.81-0.95	1000-3000
Papel filtro	0-0.45	750
Pulpa de madera	0.5-0.7	500-1500
α-celulosa	0.64	2140-2420

FUENTE: Adaptado de Chandel & da Silva (2013).

2.2. CELULASAS FÚNGICAS

Existen dos tipos de sistemas de degradación de paredes celulares de plantas realizados por microorganismos. En el primero, el organismo secreta enzimas libres que actúan sinérgicamente, de tal manera que la actividad de una mezcla de enzimas es mayor que la suma de las actividades de los componentes individuales; en el segundo, las enzimas están organizadas en un complejo enzimático localizado en la superficie celular llamado celulosoma (Wertz *et al.*, 2010).

Las celulasas de uso industrial pertenecen al primer grupo, pues consisten en un conjunto de celulasas solubles que se inducen en presencia de sustratos celulósicos. En general, estas celulasas son de origen fúngico, y contienen un dominio catalítico (CD) y un módulo de enlace a carbohidratos (CBM), conectados por una región flexible y corta llamada *linker*. El CBM está compuesto aproximadamente de 40 a 120 aminoácidos, y el *linker*, principalmente de serina y treonina (Chandel & da Silva, 2013; Barcelos *et al.*, 2015).

2.2.1. Clasificación de celulasas

Estas enzimas se encuentran clasificadas en familias de glucósido hidrolasas (GH) dentro de la base de datos de *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZy) y utilizan la catálisis ácido-base para romper los enlaces glucosídicos. Esta hidrólisis ocurre por inversión o retención de la configuración del carbono anomérico de acuerdo a la posición espacial de dos residuos catalíticos de la enzima: un ácido general (donador de protones) y un nucleófilo/base (Zhang & Zhang, 2013; Srivastava *et al.*, 2019).

Las celulasas son un complejo enzimático compuesto principalmente por tres tipos de enzimas glicósido hidrolasas (GH) llamadas endoglucanasas (endo-1,4- β -D-glucanasa (EG), EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas (exo-1,4- β -D-glucanasa (CBH), EC 3.2.1.91), y β -glucosidasas (1,4- β -D-glucosidasa (BG), EC 3.2.1.21). Estos componentes enzimáticos actúan secuencialmente en un sistema sinérgico para facilitar la descomposición de la celulosa y la subsecuente conversión biológica a glucosa (Dashtban *et al.*, 2010) (Figura 3).

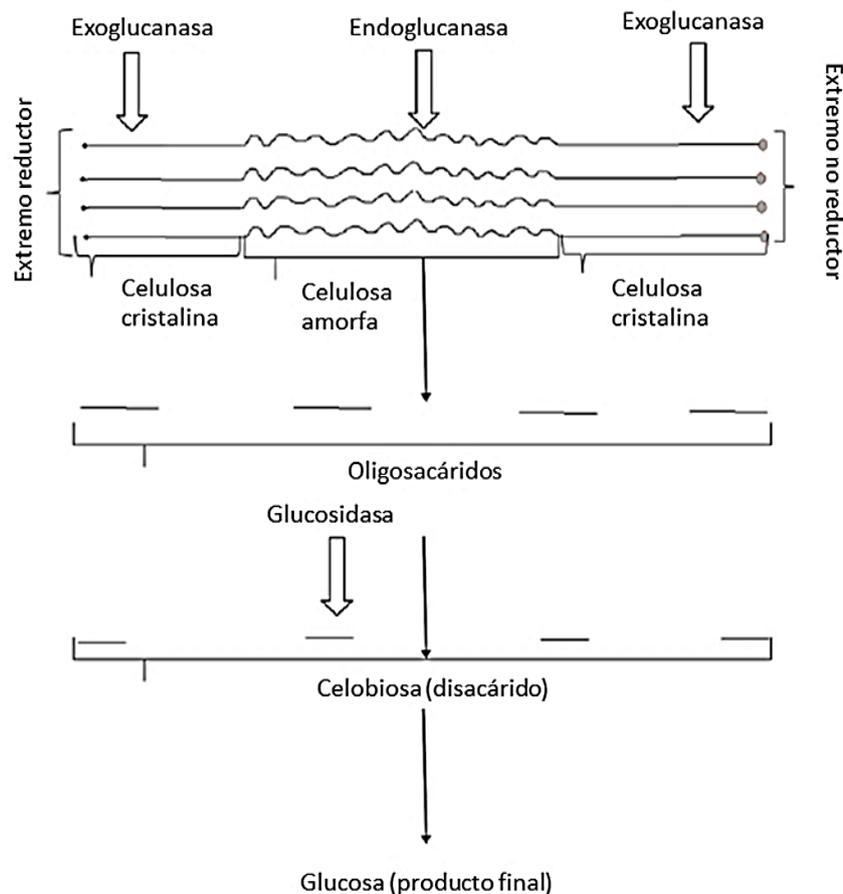


Figura 3. Mecanismo de acción de las celulasas.

FUENTE: Tomada de Srivastava *et al.* (2019).

Golan (2011) explica la clasificación enzimática de acuerdo a la funcionalidad de estas:

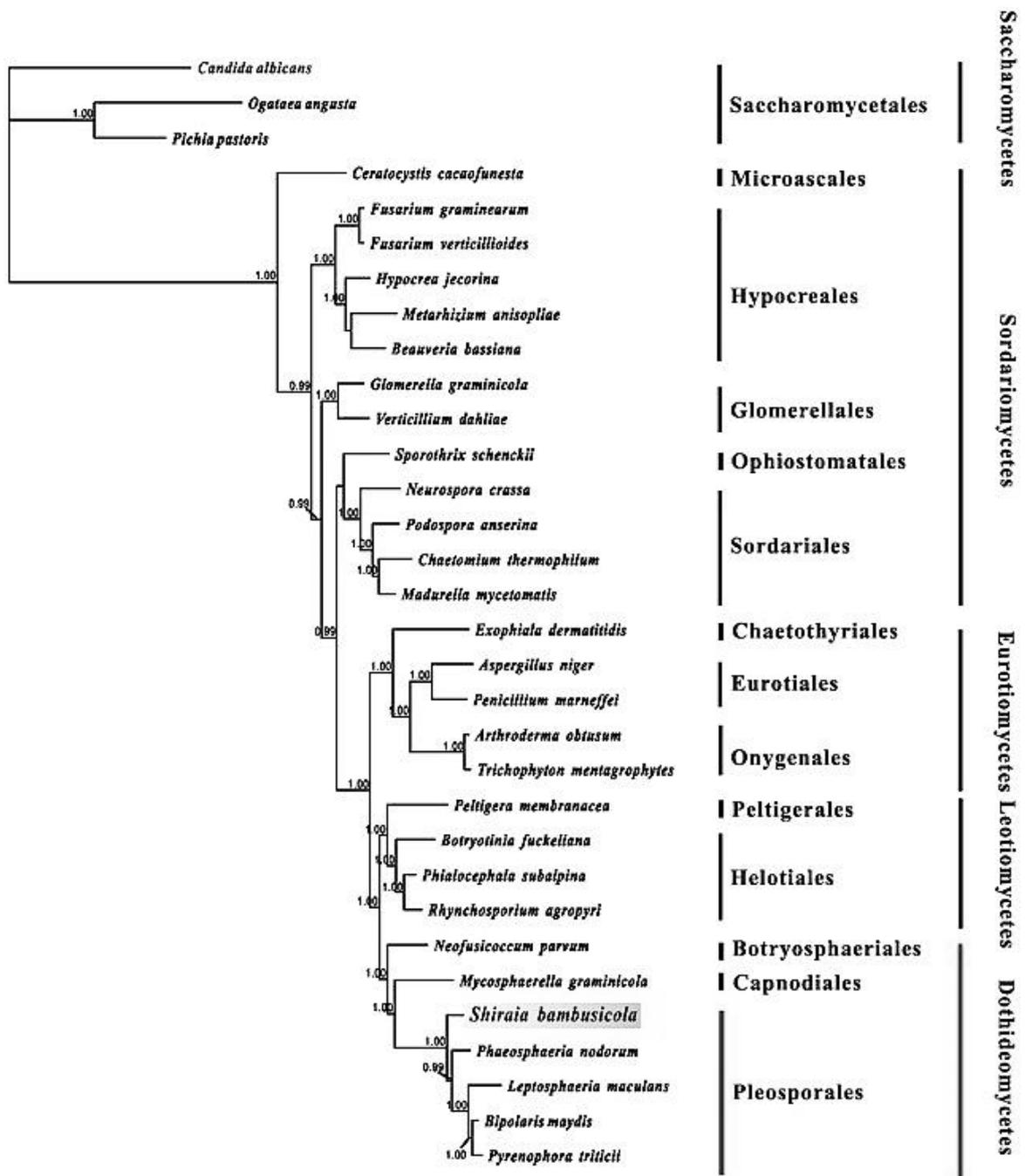
- Endoglucanasas: hidrolizan enlaces glucosídicos internos al azar en regiones cristalinas y amorfas de la celulosa, a causa de ello, generan oligosacáridos de diferentes tamaños y crean nuevos extremos susceptibles a la acción de celobiohidrolasas. De esta manera, la longitud del polímero disminuye rápidamente y la concentración de azúcares reductores incrementa de forma gradual.
- Exoglucanasas: comprenden a las glucanohidrolasas (GH) y celobiohidrolasas (CBH). Existen dos tipos de celobiohidrolasas e hidrolizan los extremos de las cadenas de celulosa, removiendo progresivamente celobiosas o glucosas desde el extremo no reductor (CBH II) y reductor (CBH I). Esta acción resulta en una rápida liberación de azúcares reductores; sin embargo, se producen pocos cambios en la longitud del polímero. Se inhiben por su producto de hidrólisis (celobiosa).
- β -Glucosidasas: hidrolizan la celobiosa y liberan dos unidades de glucosa, lo cual proporciona una fuente de carbono de fácil metabolismo y elimina la inhibición por celobiosa de las endoglucanasas y exoglucanasas. Sin embargo, esta enzima también se inhibe por las grandes cantidades de su producto (glucosa).

No obstante, la degradación de material celulósico es muy lento con sólo la acción de las enzimas glucósido hidrolasas; por ello, algunos hongos producen enzimas auxiliares tales como celodextrinasa (EC 3.2.1.74), celodextrin fosforilasa (EC 2.4.1.49), celobiosa fosforilasa (EC 2.4.1.20), celobiosa epimerasa (EC 5.1.3.11) y polisacárido monooxigenasas (LPMO) (Wang *et al.*, 2020). Estas últimas son enzimas cobre dependiente cuya importancia radica en su acción despolimerizante de polisacáridos a través de un mecanismo oxidativo, aquellas encontradas en hongos comprenden las siguientes familias: AA9 (glicósido hidrolasa 61, GH61), AA11, AA13 y AA14, con actividad sobre celulosa, quitina y almidón (Žifčáková & Baldrian, 2012; Morgenstern, Powlowski & Tsang, 2014; Pierce *et al.*, 2017, Filiatrault-Chastel *et al.*, 2019).

Adicionalmente, los hongos cuentan con proteínas accesorias que favorecen la degradación de la celulosa cristalina como los *swollenins*. Estas proteínas son similares a las expansinas encontradas en plantas, y su función es facilitar la degradación enzimática a través de la disrupción de puentes de hidrógeno de las microfibrillas de celulosa, con lo cual se exponen las cadenas de celulosa (Saloheimo *et al.*, 2002; Barcelos *et al.*, 2015).

2.3. ASCOMICETOS PRODUCTORES DE CELULASAS

El *phylum Ascomycota* encierra un grupo diverso de hongos, desde filamentosos hasta unicelulares (Figura 4), que habitan ambientes terrestres y acuáticos. Este *phylum* se encuentra dentro de la subdivisión *dikarya* y se caracteriza por presentar pares de núcleos haploides no fusionados en algún momento de su ciclo de vida. Además, presenta dos estados morfológicos diferenciados por su reproducción: estado sexual (teleomorfo) y asexual (anamorfo) (Choi & Kim, 2017; Wallen & Perlin, 2018). En su reproducción sexual, se producen esporas llamadas ascosporas formadas internamente dentro de sacos llamados “*asci*” en la parte superior del cuerpo fructífero (ascocarpo); mientras que, en su reproducción asexual producen conidiosporas formadas por fragmentación de las hifas vegetativas o a partir de conidióforos, y su rol ecológico principal es la descomposición de material vegetal muerto (Madigan *et al.*, 2012).



0.1

Figura 4. Árbol filogenético del análisis Bayesiano para genomas mitocondriales de *Ascomycota*.

FUENTE: Tomada de Shen *et al.* (2015).

Los hongos filamentosos son organismos complejos formados por múltiples hifas agrupadas en una estructura filamentosa llamada micelio, y su pared celular está conformada por microfibrillas poliméricas de quitina. Estos son ampliamente utilizados en la biotecnología industrial debido a tres importantes ventajas: capacidad de secretar

grandes cantidades de enzimas, su maquinaria especial de modificaciones post-transcripcionales, y por ser en su mayoría especies inocuas (GRAS, *Generally Recognized as Safe* por la *Food and Drug Administration*) (Quintanilla *et al.*, 2015).

Las celulasas comerciales están compuestas por extractos crudos de cultivos como *T. reesei*, *A. niger* y *Humicola insolens*, ya que poseen una alta actividad específica sobre la celulosa cristalina (Golan, 2011). La Tabla 2 muestra la clasificación taxonómica de los hongos de interés de esta investigación, que fueron seleccionados por su excelencia en la producción de celulasas y los amplios estudios realizados para la optimización de sus procesos industriales.

Tabla 2: Clasificación taxonómica de los hongos en estudio.

<i>Phylum</i>	<i>Ascomycota</i>	
<i>Subphylum</i>	<i>Pezizomycotina</i>	
<i>Clase</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>
<i>Subclase</i>	<i>Hypocreomycetidae</i>	<i>Eurotiomycetidae</i>
<i>Orden</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Eurotiales</i>
<i>Familia</i>	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Aspergillaceae</i>
<i>Género</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Especie</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus phoenicis</i>

FUENTE: Elaboración propia a partir de Grigoriev *et al.* (2013).

2.3.1. *Trichoderma reesei*

Este hongo filamentoso mesofílico y saprófito (Mukherjee *et al.*, 2013) puede llegar a producir hasta 100 g/L de enzimas extracelulares bajo condiciones de inducción en procesos industriales con cepas hiperproductoras.

Su morfología distintiva (Figura 5) incluye pigmentos conidiales verde brillante, conidióforos con un eje principal ramificado que termina en una o dos fiálidas cilíndricas de 5-8 μm , conidias ovoide a elipsoide de 3.5-4.5 x 2.3-3.0 μm y pigmento amarillo que exuda al agar (Kubicek & Harman, 1998). Los parámetros físicos que influyen en su crecimiento son el pH y temperatura. Puede crecer entre 3.5 a 7.5 de pH; sin embargo, su

pH óptimo se sitúa entre 4.5 y 6.0; por otro lado, el rango de temperatura de crecimiento está entre 20°C y 40°C, pero su fisiología se ve afectada por el cambio de cada grado centígrado (Sariaslani & Gadd, 2016).

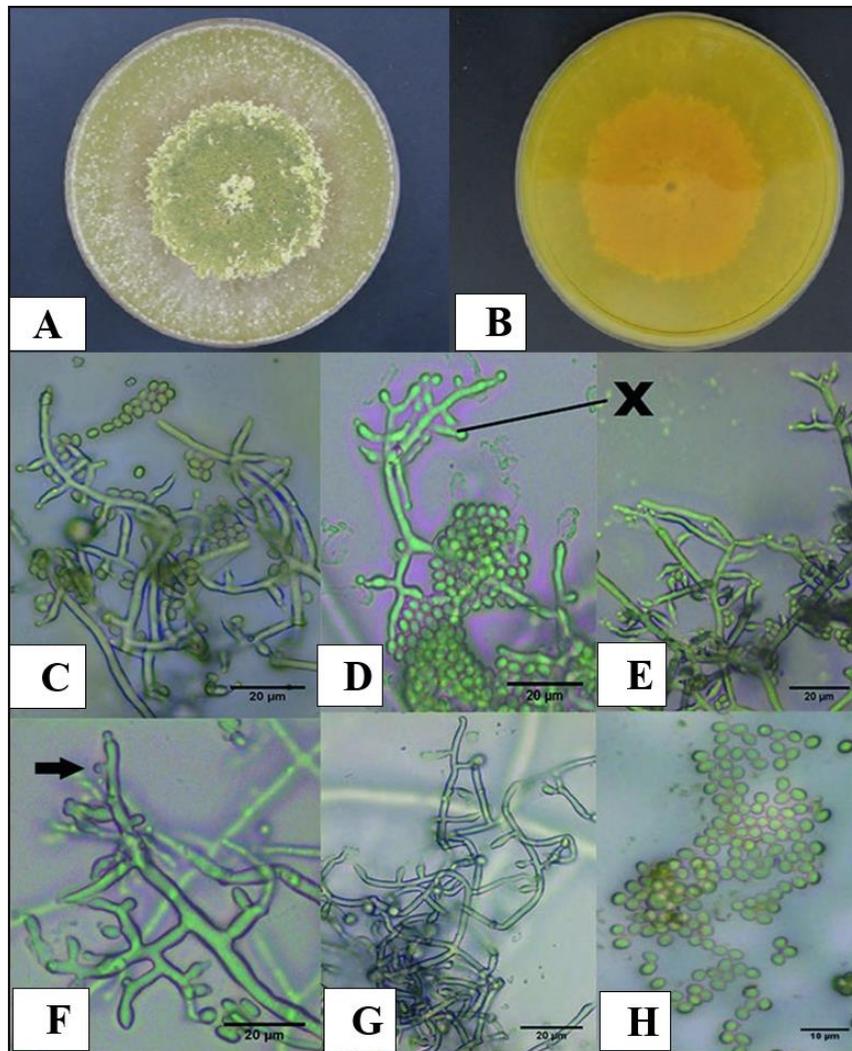


Figura 5. Morfología de *T. reesei*.

A) Cara frontal de colonia tras 5 días de crecimiento en medio PDA; B) Reverso de la colonia; C-G) conidiosporas; H) conidia; flecha: fiálidas intercaladas; X: fiálida. C-H) con 400X de magnificación.

FUENTE: Adaptado de Siddiquee (2017).

Debido su gran potencial celulolítico, esta cepa silvestre, fue extensivamente sujeta a mutagénesis al azar, generando cepas hipercelulolíticas como *T. reesei* QM9414 y *T. reesei* RUTC30, mutante catabólico desreprimido (Gupta *et al.*, 2014) (Figura 6). Estudios con microscopía inmuno-electrónica sobre la morfología distintiva de las hifas

de los mutantes muestran una capa fibrosa llamada “capa exopolisacárida” sobre su pared celular y cumple un rol importante al mantener atrapadas a las enzimas β -glucosidasas y endoglucanasas exudadas. Además, su crecimiento en celulosa cristalina mostró una relación directa entre la producción de esta capa y la producción de celulosas, por lo cual esta característica podría ser una estrategia de supervivencia al mejorar la degradación de la celulosa (Shida *et al.*, 2016).

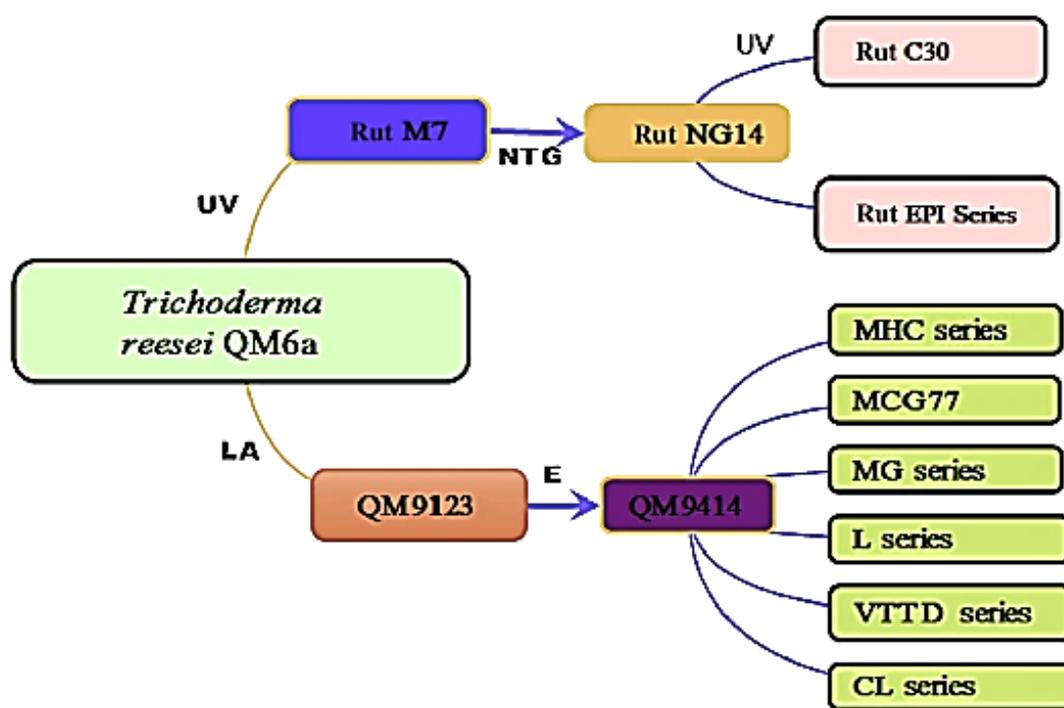


Figura 6. Mutantes de *T. reesei* desarrollados por diferentes agentes mutágenos.

UV: Rayos ultravioleta, LA: Acelerador de partículas lineal, NTG: N-nitrosoguanidina, E: Alto voltaje de electrones.

FUENTE: Gupta *et al.* (2014).

El genoma haploide de *T. reesei* QM6a tiene un tamaño estimado de 32.68 Mb y contiene alrededor de 9 129 genes (Martínez *et al.*, 2008), organizados en siete cromosomas con un tamaño promedio entre 2.8 y 6.9 Mb (Sariaslani & Gadd, 2016). Entre ellos, se han identificado 201 genes de la familia glucósido hidrolasas (GH), 22 de carbohidrato esterasas (CE) y 5 polisacárido liasas (PL), de los cuales 10 corresponden propiamente a celulosas y 16 a hemicelulasas (Gupta *et al.*, 2014), ambas implicadas en la degradación de material recalcitrante como los residuos lignocelulósicos.

El sistema celulolítico de *T. reesei* (Tabla 3) está constituido por endoglucanasas (EGI/CEL7B, EGII/CEL5A, EGIII/CEL12A, EGIV/CEL61A, EGV/CEL45), celobiohidrolasas (CBHI/CEL7A, CBHII/CEL6A), y β -glucosidasas (BGLI/CEL3A, BGLII/CEL1A) (Gupta *et al.*, 2014). Este sistema tiene baja actividad β -glucosidasa debido a que la principal β -glucosidasa extracelular (CEL1B) se mantiene retenida en las paredes del hongo y sólo se libera al medio durante la autólisis (Druzhinina & Kubicek, 2017).

Por otro lado, EGIV/CEL61A pertenece a la familia glucósido hidrolasa GH61 y ha sido reclasificada e incluida dentro de las enzimas líticas polisacárido monooxigenasas (LPMO); puesto que su hidrólisis consta de un mecanismo de acción distinto, a través de la oxidación dependiente de un ion metal y la presencia de celobiosa deshidrogenasa (Gupta *et al.*, 2014). Asimismo, las LPMOs identificadas para este hongo solo constan de tres enzimas pertenecientes a la familia AA9 (GH61), siendo uno de las cantidades más pequeñas encontradas en hongos saprófitos (Filiatrault-Chastel *et al.*, 2019).

Además, se han descrito proteínas llamadas enzimas accesorias con actividad no hidrolítica que prepara a la biomasa para su hidrólisis por celulasas, tales como *cellulose-induced protein 1* (CIP1), CIP2 y *swollenin* (SWO1) (Seidl & Seiboth, 2010; Gupta *et al.*, 2016).

Tabla 3: Enzimas celulolíticas de *T. reesei*.

Función	Familia GH	Proteína	Gen	Nombre	Protein ID*
Celobiohidrolasas	GH7	CEL7A	<i>cbh1/cel7a</i>	Celobiohidrolasa I	Trire2:123989
	GH6	CEL6A	<i>cbh2/cel6a</i>	Celobiohidrolasa II	Trire2:72567
Endo-β-1,4-glucanasas	GH7	CEL7B	<i>egl1/cel7b</i>	Endoglucanasa I	Trire2:122081
	GH5	CEL5A	<i>egl2/cel5a</i>	Endoglucanasa II	Trire2:120312
	GH12	CEL12A	<i>egl3/cel12a</i>	Endoglucanasa III	Trire2:123232
	GH61**	CEL61A	<i>egl4/cel61a</i>	Endoglucanasa IV	
	GH45	CEL45A	<i>egl5/cel45a</i>	Endoglucanasa V	Trire2:49976
	GH74	CEL74A	<i>cel74a</i>	NN	Trire2:49081
	GH61**	CEL61B	<i>cel61b</i>	NN	
	GH5	CEL5B	<i>cel5b</i>	NN	Trire2: 82616
	GH5	NN	NN	NN	Trire2:53731
	GH5	NN	NN	NN	Trire2: 64375
	GH12	NN	NN	NN	Trire2:77284
β-glucosidasas	GH3	CEL3A	<i>bgl1/cel3a</i>	β -glucosidasa I	Trire2:76672
	GH1	CEL1A	<i>bgl2/cel1a</i>	β -glucosidasa II	Trire2120749
	GH1	CEL1B	<i>cel1b</i>	NN	Trire2:22197
	GH3	CEL3B	<i>cel3b</i>	NN	Trire2:121735
	GH3	CEL3C	<i>cel3c</i>	NN	Trire2:82227
	GH3	CEL3E	<i>cel3e</i>	NN	Trire2:76227
	GH3	CEL3F	<i>cel3f</i>	NN	Trire2:104797
	GH3	CEL3H	<i>cel3h</i>	NN	Trire2:108671
	GH3	CEL3J	<i>cel3j</i>	NN	Trire2:66832

NN: sin nombre específico.

*De la base de datos *T. reesei* (Grigoriev *et al.*, 2013).

**Reclasificado como familia AA9-Polisacárido monooxigenasas.

FUENTE: Adaptado de Kubicek *et al.* (2009) y Druzhinina & Kubicek (2017).

2.3.2. *Aspergillus niger*

Este hongo filamentoso cosmopolita prospera sobre el suelo y material vegetal en descomposición (Dijksterhuis & Wösten, 2013). Es ampliamente utilizado en el ámbito biotecnológico para la producción de ingredientes alimenticios, productos farmacéuticos y enzimas industriales tales como ácido cítrico (Upton *et al.*, 2017), L-asparaginasa (anticancerígeno) (Nadumade *et al.*, 2016) y celulasas (Gamarra *et al.*, 2010).

La morfología de sus colonias (Figura 7) incluye una masa de esporas color negro. Sus conidióforos hialinos o marrón pálido son erectos de 740 μm x 10-14 μm , y se inflan en el ápice formando una vesícula globosa con cabezas de conidios divididas en más de 4 columnas conidiales sueltas compuestos de conidios catenulares (más de 15 conidios/cadena) portados en fiáldas uniseriadas o biseriadas. Sus conidias miden entre 3.7 a 4.5 μm de diámetro (Watanabe, 2010). Los parámetros físicos en los que se desarrolla incluyen un rango de temperatura entre 6°C a 47°C, siendo el óptimo a los 35°C hasta 37°C; así también, puede crecer en un rango de 1.5 a 9.8 de pH, con un pH óptimo de 6.0 (Dijksterhuis & Wösten, 2013).

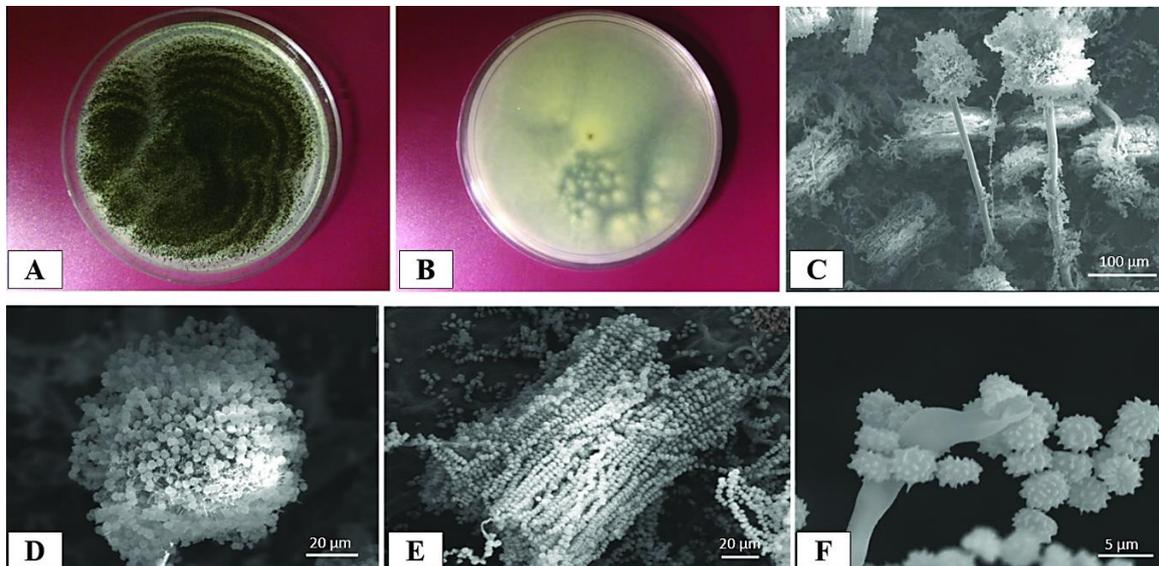


Figura 7. Morfología de *A. niger*.

A) Cara frontal de colonia en medio PDA; B) Reverso de la colonia; (C-F) hongos vistos por SEM; C) Conidióforos, escala= 100 μm ; D) Vesícula, escala= 20 μm ; E) Cadena de conidios, escala= 20 μm ; F) Conidios, escala= 5 μm .

FUENTE: Tomada de Romero-Cortes *et al.* (2019).

El genoma haploide de *A. niger* CBS 513.88 tiene un tamaño estimado de 33.9 Mb y contiene un estimado de 14 165 genes, los cuales están distribuidos en ocho cromosomas (Pel *et al.*, 2007). Se han identificado 246 genes de la familia glucósido hidrolasas (GH), 25 de carbohidrato esterasas (CE) y 8 polisacárido liasas (PL) (Delmas *et al.*, 2012), de los cuales 35 corresponden a celulasas (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015).

Tabla 4: Enzimas celulolíticas de *A. niger*.

Función	Familia GH	Proteína	Gen	Nombre	Protein ID*
Celobiohidrolasas	GH7	CbhA	<i>cbhA</i>	Celobiohidrolasa A	Aspni_DSM_1:161153
	GH7	CbhB	<i>cbhB</i>	Celobiohidrolasa B	Aspni_DSM_1:156194
Endo-β-1,4-glucanasas	GH12	EglA	<i>eglA</i>	Endoglucanasa A	Aspni_DSM_1:166061
	GH5	EglB	<i>eglB</i>	Endoglucanasa B	Aspni_DSM_1:167967
	GH5	EglC	<i>eglC</i>	Endoglucanasa C	Aspni_DSM_1:161114
	GH5	NN	NN	NN	Aspni_DSM_1:158118
	GH5	EglA**	<i>eglA</i>	Endoglucanasa A	Aspni_DSM_1:156195
	GH74	EglC**	<i>eglC</i>	Endoglucanasa C	Aspni_DSM_1:155242
β-glucosidasas	GH	BglA	<i>bglA</i>	β -glucosidasa A	Aspni_DSM_1:168801
	GH	BgtB	<i>bgtB</i>	β -glucosidasa B	Aspni_DSM_1:158521
	GH3	Bgl2**	NN	NN	Aspni_DSM_1:163842
	GH3	BglM	<i>bglM</i>	β -glucosidasa M	Aspni_DSM_1:165962
	GH3	BglG	<i>bglG</i>	β -glucosidasa G	Aspni_DSM_1:166998
	GH3	NN	NN	NN	Aspni_DSM_1:160983
	GH3	NN	NN	NN	Aspni_DSM_1:162083
	GH3	NN	NN	NN	Aspni_DSM_1:160170
	GH3	NN	NN	NN	Aspni_DSM_1:161195
	GH3	NN	NN	NN	Aspni_DSM_1:166712
	GH3	NN	NN	NN	Aspni_DSM_1:158525

NN: sin nombre específico.

*De la base de datos *A. niger* (Grigoriev *et al.*, 2013; Arnaud *et al.*, 2011)

** Nombrado por De Souza *et al.* (2011).

FUENTE: Adaptado de Delmas *et al.* (2012) y CAZy.

2.3.3. *Aspergillus phoenicis*

Al igual que *A. niger*, este ascomiceto es ampliamente utilizado a nivel industrial por ser un buen productor de enzima β -glucosidasa. Su genoma haploide tiene un tamaño estimado de 35.75 Mb y contiene un estimado de 1 896 genes, estos están distribuidos en ocho cromosomas. Se han identificado 250 genes de la familia glucósido hidrolasas (GH), 22 de carbohidrato esterasas (CE) y 9 polisacárido liasas (PL) (Grigoriev *et al.*, 2013). Las celulasas identificadas para esta especie están anotadas de acuerdo al genoma de *A. niger*.

2.4. PRODUCCIÓN DE CELULASAS EN CULTIVOS FÚNGICOS MIXTOS

Referirse a los cultivos mixtos y su producción enzimática implica hablar sobre las interacciones microbianas. Estas interacciones pueden ser de tipo mutualista, neutralista y competitiva; sin embargo, son capaces de cambiar de una interacción a otra por modificaciones del espacio y nutrientes limitados. Debido a ello, se activan ciertas vías biosintéticas que inducen la producción de distintos metabolitos secundarios como estrategia de supervivencia. Estos metabolitos conforman una fuente prometedora de nuevas drogas, enzimas, etc. (Bertrand *et al.*, 2014)

Existen múltiples factores que afectan a la producción de celulasas mediante microorganismos como: 1) la composición del sustrato, 2) la presencia de un inductor específico, 3) el complejo enzimático general, 4) las rutas reguladoras del organismo usado y 5) la combinación de los distintos factores químicos, físicos y biológicos. La gran variedad de fuentes carbonadas, métodos de producción, así como las variaciones de lote a lote conduce a la elección del mejor sustrato y los estudios para determinar los factores más relevantes para su producción industrial (Hassan *et al.*, 2017; Ahmed & Bibi, 2018). Además, otro factor importante a considerar en cultivos mixtos es la compatibilidad de cepas (Gutiérrez-Correa & Villena, 2012; Hu *et al.*, 2011), para determinar la capacidad de los mismos de crecer en presencia del otro y a su vez encontrar una interacción sinérgica entre cepas compatibles que puedan superar las limitaciones nutricionales del sustrato y/o mejorar su producción enzimática (Gutiérrez-Correa & Tengerdy, 1997, 1998; Gutiérrez-Correa *et al.*, 1999).

2.4.1. Sistemas fermentativos

Los sistemas fermentativos como Fermentación en Estado Sólido (SSF) y Fermentación Celular Sumergida (SCF) son los más usados en cultivos mixtos o co-cultivos para la producción enzimática (Figura 8). La diferencia principal entre estos sistemas es que el medio líquido de cultivo de la fermentación en estado sólido, contrario a la fermentación sumergida, carece de agua que fluya libremente (Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012) o, según Deshpande *et al.* (2008), tiene agua suficiente para solubilizar los nutrientes. Esta diferencia repercute en la morfología de los hongos filamentosos, pues *T. reesei* QM9414, *A. phoenicis* QM329 y *A. niger* suelen presentar morfología de *pellets* en medio líquido,

mientras que, en sustrato sólido, sus crecimientos presentan morfología de hifas extendidas o micelias.

Por otro lado, el sistema por adhesión a superficies en forma de biopelículas es un sistema prometedor que ha mostrado alta productividad enzimática y mayor eficiencia metabólica en cultivos simples y mixtos (Villena, 2002; Villena & Gutiérrez-Correa, 2006; Gamarra *et al.*, 2010; Villena & Gutiérrez-Correa, 2012), debido a la organización del micelio en canales que favorecen la transferencia de masa, la presencia de una matriz extracelular (Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012), heterogeneidad metabólica y la regulación positiva de genes asociados a las bombas de flujo de salida (Fanning & Mitchell, 2012), lo cual resulta en un mayor rendimiento entre la biomasa y proteínas extracelulares. Así también, la biopelícula es una forma de crecimiento que se desarrolla durante el estilo de vida nativo de muchos microorganismos como bacterias, levaduras, hongos filamentosos e incluso micro-animales; por lo cual, este crecimiento de vida nativa involucra el despliegue de estrategias como la producción extracelular de enzimas para la descomposición de material celulósico (Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012).

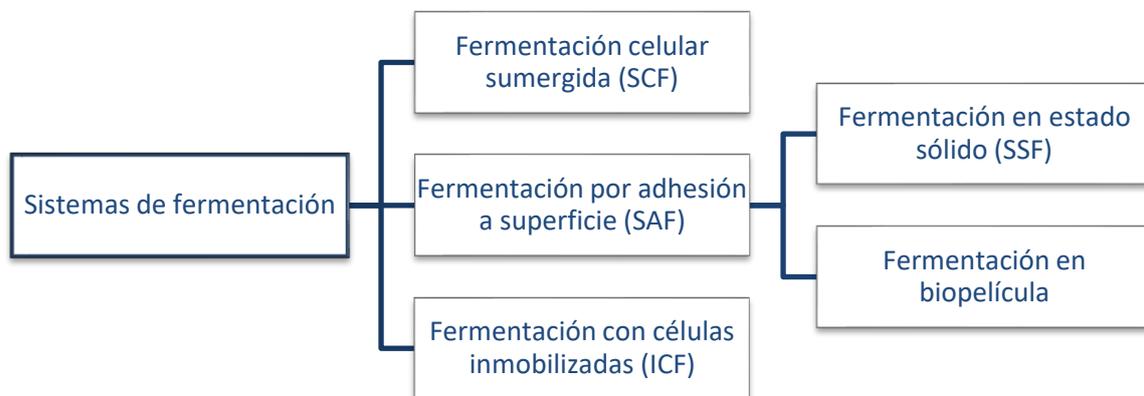


Figura 8. Clasificación de los sistemas de fermentación.

FUENTE: Gutiérrez-Correa *et al.* (2012).

El primer punto importante en la formación de una biopelícula para la fermentación es la compatibilidad de las esporas fúngicas con la superficie inerte, esto incluye complejas interacciones de procesos físicos y biológicos, tales como hidrofobicidad, carga electrostática, rugosidad de la superficie inerte y señales morfogenéticas (Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012).

Según Borin *et al.* (2017), esta adhesión es mediada a través de pequeñas proteínas llamadas hidrofobinas. Estas proteínas se evidenciaron en cultivos sólidos por su participación en la reducción de la tensión superficial del sustrato para la adhesión del hongo, pues forman una membrana anfipática en contacto con una interfase hidrofílica-hidrofóbica lo que le permite cambiar la naturaleza de la superficie. Existen ocho genes que codifican hidrofobinas para *A. niger* (Jensen *et al.*, 2010) y diez genes para *T. reesei* (Schmoll *et al.*, 2016), la presencia de estos genes favorecería la formación de biopelículas de dichos hongos.

2.4.2. Cultivos mixtos de *T. reesei* y *Aspergillus* spp.

A nivel enzimático, los cultivos mixtos de *T. reesei* y *Aspergillus* spp. estudiados han expuesto claras interacciones sinérgicas entre ellos, tales como *T. reesei* LM-UC4 - *A. phoenicis* QM329 y *T. reesei* LM-UC4 – *A. niger* ATCC® 10864 (Gutiérrez-Correa & Villena, 2012) que presentan de 2 a 3 veces más actividad enzimática de celulasas totales que sus respectivos monocultivos; *T. reesei* RutC30 – *A. saccharolyticus* AP con un 84 por ciento de eficiencia de hidrólisis de medio sólido de salvado de trigo (Kolasa *et al.*, 2014); y *T. reesei* QM9123–*A. niger* (Maheshwari *et al.*, 1994) con actividad endoglucanasa 5 veces mayor a sus monocultivos.

Por otro lado, el crecimiento puede evidenciar una interacción competitiva como el caso entre *T. reesei* y *A. niger* (Gutiérrez-Correa & Villena, 2012), lo cual coincide con el *test* de compatibilidad realizado por Kolasa *et al.* (2014) en medio con glucosa, CMC y salvado de trigo que muestra el sobrecrecimiento de *T. reesei* sobre las cepas de *Aspergillus* estudiadas.

En cuanto a los estudios proteómicos, estos revelan distintas estrategias de degradación de biomasa celulósica por parte de *Aspergillus* y *Trichoderma*, dado sus distintos secretomas (Borin *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2015; Florencio *et al.*, 2016). Sin embargo, los estudios a nivel de poblaciones mixtas e interacciones recién están siendo exploradas (Benoit-Gelber *et al.*, 2017; Daly *et al.*, 2017) debido a la prometedora fuente de metabolitos secundarios secretados.

Es por ello, que se sugiere la combinación de *T. reesei* y *Aspergillus* spp. dado su incremento en la eficiencia de sacarificación: al complementar sus actividades

enzimáticas β -glucosidasas por parte de *Aspergillus* y celulasas de *Trichoderma* (Ahamed & Vermette, 2008), y al estar sujetos a una gran cantidad de interrelaciones y comunicación interespecífica (*quorum sensing molecules*) (Padder *et al.*, 2018).

2.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CELULASAS

La expresión de genes celulolíticos en monocultivos de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* spp. ha sido ampliamente estudiada para entender los procesos biológicos implicados en la regulación de estas enzimas. A través de mutaciones, deleciones, inducciones y represión se han determinado enzimas y reguladores clave para optimizar su producción a nivel industrial; así también, los factores externos tales como la fuente de carbono adecuada (dos Santos *et al.*, 2014; Daly *et al.*, 2017), dependencia positiva a la luz (Monroy *et al.*, 2017), y el sistema de fermentación (Mahmond *et al.*, 2016), que incrementan los niveles de expresión de estos genes.

Un reducido número de reguladores enzimáticos de celulosas y hemicelulosas son conservados a lo largo del reino fungi, y no necesariamente conservan completamente su función. Por ejemplo, la represión catabólica por carbono (CCR) es un sistema universal de regulación muy conservado, pues reprime genes en presencia de glucosa u otro monosacárido de rápido metabolismo; es decir, previene el gasto energético en la producción de enzimas extracelulares para rutas metabólicas innecesarias (Benocci *et al.*, 2017).

Adicionalmente, a menudo los mecanismos moleculares reguladores de las celulasas son complejos debido a que se encuentran interrelacionados con las hemicelulasas y comparten las funciones de sus factores transcripcionales (TFs) (Amore *et al.*, 2013). Estos TFs pertenecen en su mayoría a la familia del clúster zinc, caracterizados por la presencia de “*fingers*” de zinc en su dominio de enlace y se dividen en clases de acuerdo a la cantidad de residuos de histidina y cisteína: la clase Zn_2Cys_6 (reguladores positivos en su mayoría) y la clase Cys_2His_2 (represores) (Benocci *et al.*, 2017).

Por otro lado, se debe considerar que aparte de estos factores transcripcionales, el remodelamiento de la cromatina también tiene un rol importante en la regulación de la expresión génica. Estudios muestran que la posición del nucleosoma en la región promotora y codificante para *cbh1* es diferente bajo condiciones de inducción y represión (Zhang *et al.*, 2019).

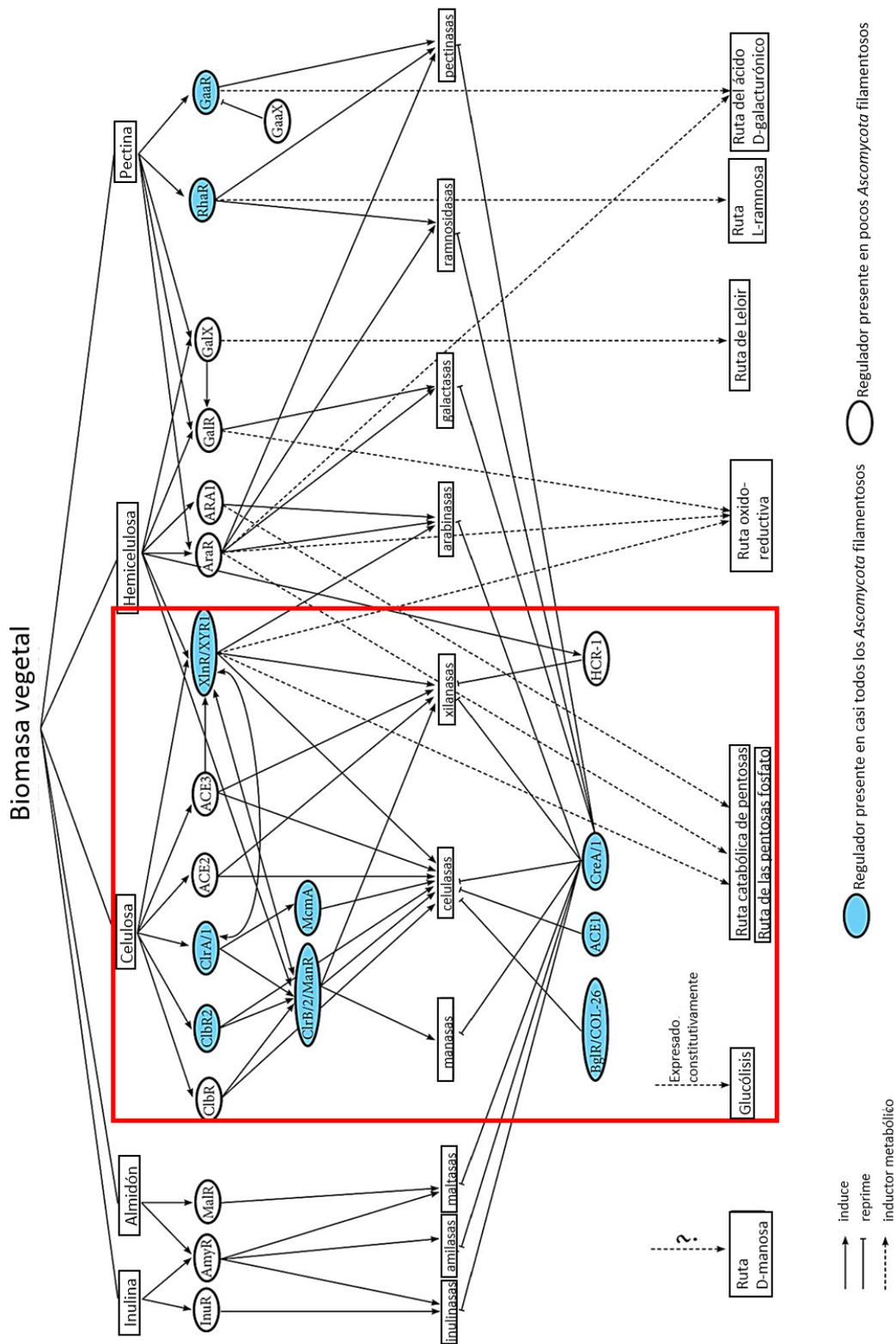


Figura 9. Descripción general de la red de reguladores involucrados en la degradación de biomasa vegetal. Basado en el conocimiento de los sistemas modelos de *Aspergillus*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesei*.

Red de reguladores implicados en la degradación de celulosa (recuadro rojo).

FUENTE: Adaptado de Benocci *et al.* (2017).

A continuación, se presentan los modelos específicos de *T. reesei* y *A. niger* para la regulación enzimática principalmente de celulasas que cuentan con reguladores y genes homólogos con funciones similares y/o iguales:

2.5.1. Modelo en *T. reesei*

La producción enzimática de celulasas y hemicelulasas es regulada a nivel transcripcional dependiendo de la fuente de carbono disponible. Se han identificado azúcares como D-xilosa, xilobiosa, sofrorosa, lactosa y galactosa, que actúan como inductores de diferentes partes del sistema celulolítico; por ejemplo, la lactosa induce celulasas mediante su transportador permeasa. Es así que, la inducción en *T. reesei* es más diversa que en otros hongos (Figura 10) (Benocci *et al.*, 2017).

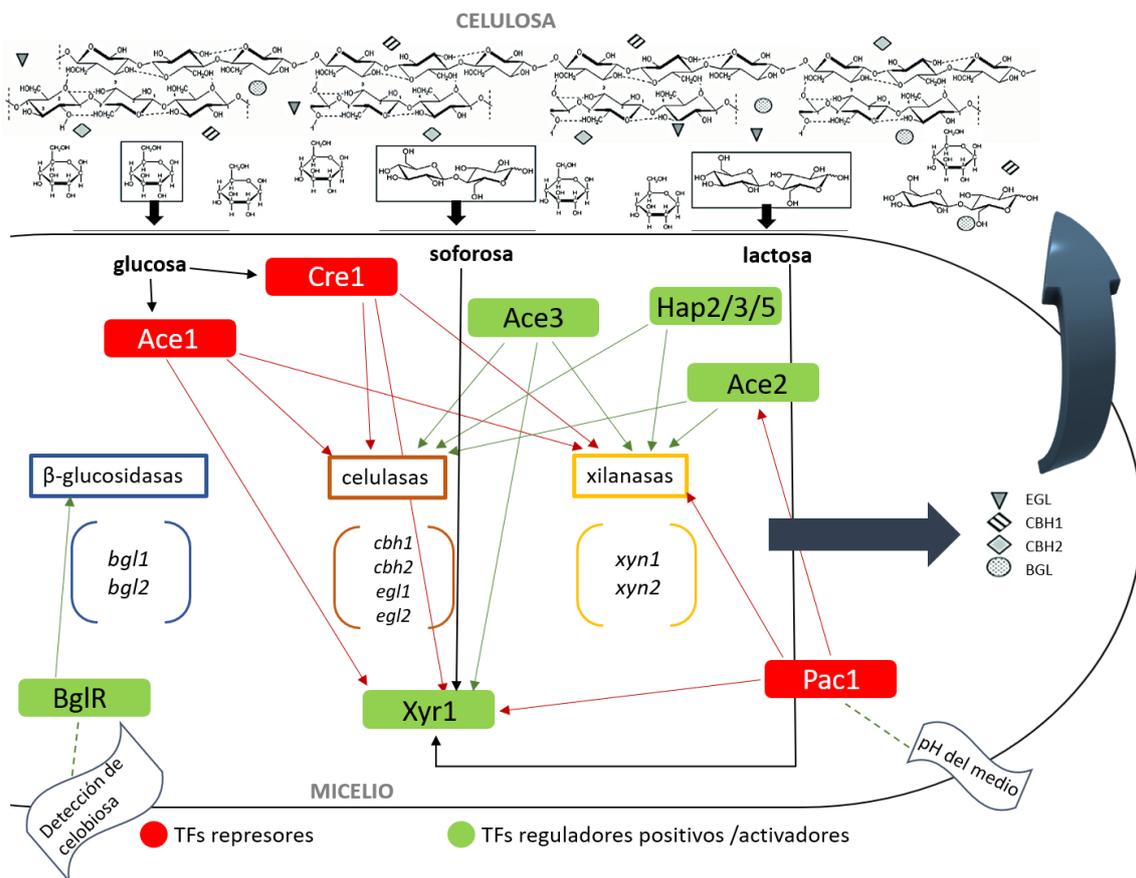


Figura 10. Modelo para la regulación de la expresión de celulasas en *T. reesei*.

FUENTE: Adaptado de Gutiérrez-Rojas *et al.* (2015) y Shida *et al.* (2016).

La regulación génica a nivel de promotor es dada por la presencia obligatoria de un inductor (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015); de esta manera, este sistema regulatorio consta principalmente de cinco reguladores positivos transcripcionales (Xyr1, Ace2, Ace3, BglR y el complejo Hap 2/3/5) y dos represores (Ace1 y Cre1) (Shida *et al.*, 2016).

En primer lugar, la CCR es mediada por el regulador Cre1 y regula alrededor de 207 genes, de los cuales 118 genes son regulados negativamente. Un alto porcentaje de estos genes regulados negativamente, codifican para permeasas de membrana; esto indica que la represión catabólica actúa preferencialmente en la entrada de los sustratos a la célula y constituye un mecanismo por el cual los hongos pueden recuperar incluso trazas de fuentes de carbono a una velocidad alta. Es así que, CRE1 controla directamente a *cbh1* y *xyn1* al unirse a sus regiones promotoras, e indirectamente a *cbh2* y *xyn2* (Gupta *et al.*, 2014; Shida *et al.*, 2016).

El mecanismo de Ace1 es independiente de Cre1. ACE1 se une a la región promotora de *cbh1* y su delección aumenta de 2 a 30 veces la transcripción de *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* y las xilanasas (*xyn1* y *xyn2*) (Shida *et al.*, 2016; Benocci *et al.*, 2017).

Por otro lado, Ace2 es un activador transcripcional específico de este hongo. ACE2 se une al promotor del gen *cbh1* y regula a los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* y *xyn2* (Wang *et al.*, 2020). La delección de este factor transcripcional disminuye la actividad de celulasas totales entre el 30 y 70 por ciento y la cantidad de ARNm de *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2* en presencia de celulosa. Sin embargo, la inducción de celulasas por soforosa y lactosa no se ve afectada por esta delección, lo que indica que la inducción por celulosa, soforosa y lactosa emplean parcialmente diferentes mecanismos moleculares (Benocci *et al.*, 2017).

Ace3 está localizada *upstream* de Xyr1 e influye directamente sobre su mecanismo de inducción de enzimas (Shida *et al.*, 2016). Xyr1 (regulador xilanasasa 1) es un factor transcripcional esencial y general que gobierna la expresión de los genes celulolíticos *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *bgl1* y participa también en la regulación de los genes xilanolíticos *xyn1* y *xyn2*. Además, regula el metabolismo de la lactosa y por tanto es capaz de inducir la producción de xilanasas (Gupta *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020).

El complejo Hap2/3/5 es otro factor transcripcional que regula a *cbh2* y *xyn2*. Su complejo proteico (HAP 2/3/5) se une a la caja CCAAT de la región promotora y se

encarga de la desestabilización de la cromatina necesaria para la activación de la transcripción (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

El activador transcripcional BglR participa en la detección de celobiosa (Wang *et al.*, 2020) y regula la transcripción temprana de genes específicos que codifican para β -glucosidasas, con excepción de la β -glucosidasa principal *bgl1*. Por último, Pac1 es un factor de transcripción sensible al pH ambiental y activa genes expresados en álcali y suprime aquellos expresados en ácido en pH básico del medio de cultivo (Druzhinina & Kubicek, 2016; Shida *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020). En adición, entre los genes de interés involucrados en la degradación de celulosa, se encuentran: *lae1* que codifica una proteína metiltransferasa y cuya delección bloquea la expresión de celulasas, factores auxiliares, β -glucosidasas y xilanasas; y *vell*, cuya delección bloquea la expresión de celulasas, xilanasas y al regulador Xyr1 (Gupta *et al.*, 2016).

Además, los genes que codifican para enzimas CAZy se encuentran en *clusters* de genes co-regulados involucrados en la producción de metabolitos secundarios (Martinez *et al.*, 2008).

2.5.2. Modelo en *A. niger*

El sistema regulatorio de este hongo consta principalmente de dos factores transcripcionales: XlnR y CreA (Figura 11).

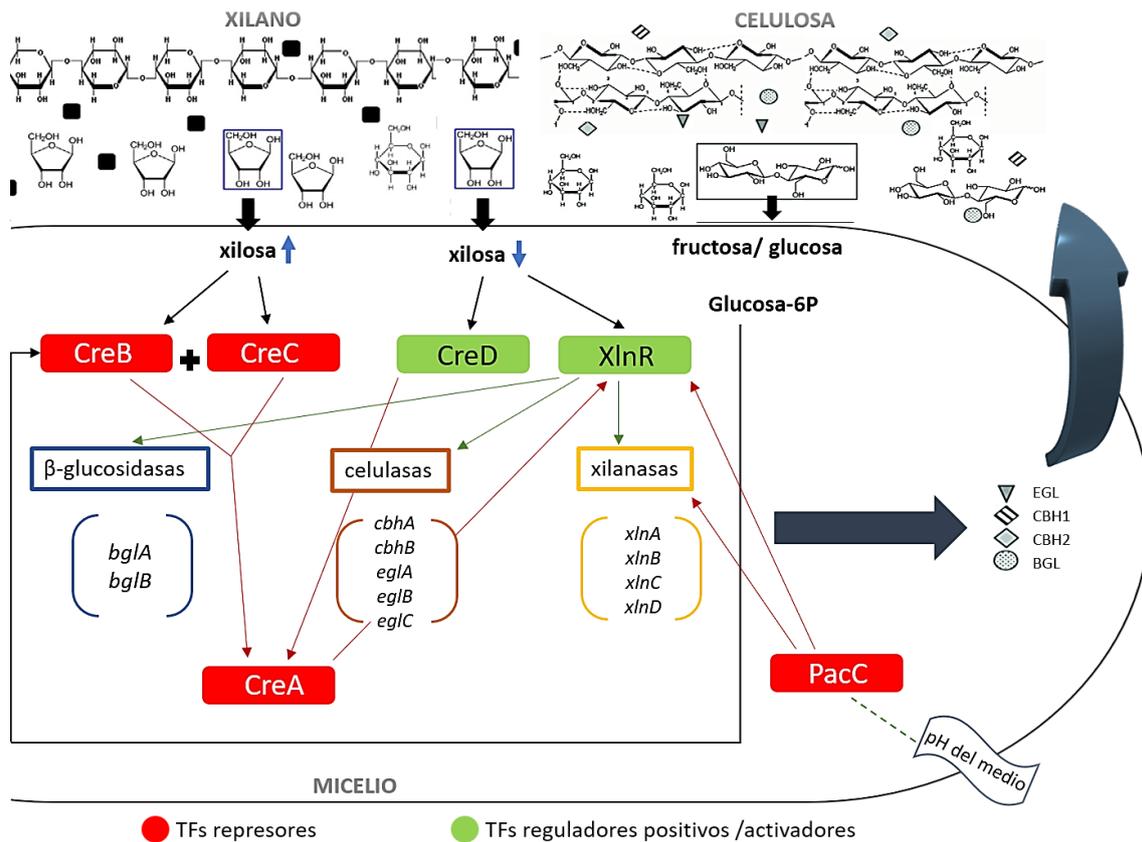


Figura 11. Modelo para la regulación de la expresión de celulasas en *A. niger*.

FUENTE: Adaptada de Gutiérrez-Rojas *et al.* (2015) y Wang *et al.* (2020).

XlnR es el activador transcripcional principal y ortólogo del gen *xyl1* de *T. reesei* (Amore *et al.*, 2013); sin embargo, su mecanismo de regulación en *A. niger* es distinto, pues la inducción es dada por D-xilosa u otro producto de la degradación de la celulosa. Este activador regula la transcripción de genes xilanólicos (*xlnA*, *xlnB*, *xlnC* y *xlnD*), así como los genes celulolíticos de endoglucanasas (*eglA* y *eglB*) y celobiohidrolasas (*cbhA* y *cbhB*). Este modelo regulatorio asume que la limitación por carbono es una desrepresión por el catabolito, y en este estado, los azúcares monoméricos o sus derivados pueden actuar como inductores (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015).

La expresión de genes xilanólicos y celulolíticos es fuertemente reprimida por glucosa, fructosa y altas cantidades de D-xilosa; y es mediada fundamentalmente por *creA*, que es el ortólogo de *cre1* en *T. reesei*. *CreA* inhibe la expresión involucrados en la utilización de xilano, celulosa y arabinano; asimismo, la expresión de estos genes depende del balance entre la inducción por *xlnR* y represión por *creA* (Wang *et al.*, 2020).

La CCR por CreA ha sido estudiada en *A. nidulans*, en el que se han encontrado tres mecanismos involucrados: 1) la activación de la expresión del gen *creA* dependiente de monosacáridos; 2) autorrepresión del gen *creA*, dependiente de la formación de glucosa-6P; y 3) regulación de la función de CREA por modificaciones traduccionales o postraduccionales (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015). Además, se han reportado los productos de los genes *creB*, *creC* y *creD* como parte del mecanismo regulador de la CCR (Amore *et al.*, 2013).

Por último, el factor transcripcional PacC es ortólogo del gen *pacI* presente en *T. reesei*, este regulador también conserva su función en *A. niger* (Wang *et al.*, 2020).

2.6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR)

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real se fundamenta en la PCR convencional, con la variante de medir la cantidad de producto amplificado después de cada ciclo. Esto es posible por la presencia de una molécula fluorescente en la mezcla de reacción y un termociclador capaz de medir el aumento de la intensidad de fluorescencia emitida a medida que se va acumulando el fragmento de ADN amplificado (Wong & Medrano, 2005). Para llevar a cabo un ensayo en qPCR es necesario contemplar las definiciones de C_T (*Cycle threshold*), línea umbral (*Threshold*), temperatura de fusión (*melting temperature*, T_m), curva de fusión (*melting curve*) y fluoróforo.

Durante los primeros ciclos de la PCR, se emite una señal fluctuante de fluorescencia y se considera como ruido de fondo (*background*). La línea umbral delimita estas señales de aquellas con incremento estadísticamente significativo, es decir señales de fluorescencia con comportamiento exponencial. El ciclo en el cual la señal de fluorescencia exponencial cruza la línea umbral es llamado valor C_T ; y es el parámetro más importante para la cuantificación de ADN inicial de la reacción y la cuantificación relativa de la expresión de genes de interés (Wong & Medrano, 2005; Dorak, 2006).

Las señales de fluorescencia se obtienen mediante el uso de fluoróforos tales como: con afinidad por el ADN (*DNA-binding dye*) y sondas específicas (*probe based*). Los primeros utilizan un agente intercalante con cualquier cadena de ADN doble hebra (ADNdh); mientras que las sondas se basan en el principio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*),

que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: donador (*reporter fluorophore*) y aceptor (*quencher*) (Bio-Rad Laboratories, 2006; Aguilera *et al.*, 2014).

El SYBR Green I es el fluoróforo intercalante más utilizado y se une a cualquier ADNdh generado durante la amplificación. De este modo, la unión de ADNdh-SYBR Green I resulta en la emisión de fluorescencia va aumentando por ciclo de amplificación; por esta razón, es importante verificar la ausencia de productos inespecíficos de la reacción de PCR o dímeros de los cebadores para evitar la malinterpretación de la *data* obtenida (Aguilera *et al.*, 2014).

El análisis de la curva de fusión de los amplicones permite discriminar la presencia de productos inespecíficos o dímeros de los cebadores de la amplificación del gen de interés. Este análisis consiste en exponer al producto de PCR a una gradiente de temperatura desde 50°C a 95°C; es así que, a medida que la temperatura aumenta, el ADNdh se desnaturaliza y la señal de fluorescencia emitida disminuye. La temperatura a la cual la señal de fluorescencia no es significativa, se denomina temperatura de fusión y depende de la longitud del amplicón y la cantidad de GC. Por esta razón, un solo pico o T_m significa un producto específico (Dorak, 2006).

La cuantificación relativa de expresión génica mide el cambio relativo en los niveles de transcritos entre diferentes muestras. Una de estas muestras es elegida como el calibrador o control y la expresión del gen de interés en las otras muestras es expresada como un incremento o disminución con respecto al calibrador (*Fold Changes*). Además, debido a la diferente cantidad y calidad del material inicial, variaciones en la preparación del ARN o en la eficiencia de la síntesis de ADNc de las diferentes muestras, se requiere “normalizar” el nivel de expresión de los genes en estudio con una referencia interna, usualmente genes cuya expresión es constitutiva (*housekeeping genes*).

Existen tres procedimientos generales para el cálculo de la proporción (*ratio*) de la expresión relativa normalizada (Dorak, 2006), basados en modelos matemáticos establecidos que dependen de los valores ΔC_T o $\Delta\Delta C_T$. Estos métodos varían de acuerdo al uso de la eficiencia corregida de la amplificación de cebadores y cantidad de genes de referencia utilizados, así también presentan ventajas y desventajas acordes a sus correspondientes asunciones:

- Método Livak sin eficiencia corregida, se asume que ambos genes *target* (muestra y calibrador) y el gen de referencia tienen una eficiencia de amplificación de 100 por ciento, es decir la cantidad de amplicón se duplica por cada ciclo de qPCR.

$$\Delta C_{T(\text{MUESTRA})} = C_{T(\text{GEN, MUESTRA})} - C_{T(\text{REF, MUESTRA})}$$

$$\Delta C_{T(\text{CALIBRADOR})} = C_{T(\text{GEN, CALIBRADOR})} - C_{T(\text{REF, CALIBRADOR})}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T(\text{MUESTRA})} - \Delta C_{T(\text{CALIBRADOR})}$$

$$2^{-\Delta \Delta C_T} = \text{Proporción de expresión normalizada}$$

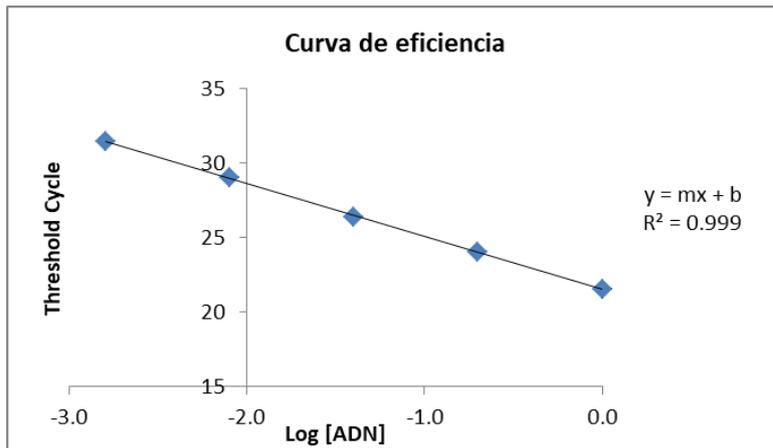
- Método Pfaffl, ΔC_T con eficiencia corregida para una o múltiples muestras con un gen de referencia.

$$\text{Proporción} = \frac{(E_{\text{GEN}})^{\Delta C_{T, \text{GEN (CALIBRADOR - MUESTRA)}}}}{(E_{\text{REF}})^{\Delta C_{T, \text{REF (CALIBRADOR - MUESTRA)}}}}$$

- Método Pfaffl, ΔC_T con eficiencia corregida con múltiples muestras y múltiples genes de referencia, estos últimos consisten como mínimo en tres genes de referencia y son llamados como REF index.

$$\text{Proporción} = \frac{(E_{\text{GEN}})^{\Delta C_{T, \text{GEN (MEDIA.CALIBRADOR - MEDIA.MUESTRA)}}}}{(E_{\text{REF INDEX}})^{\Delta C_{T, \text{REF INDEX (MEDIA.CALIBRADOR - MEDIA.MUESTRA)}}}}$$

El método más usado es el descrito por Pfaffl (2001), tanto para múltiples muestras y genes de referencia como sólo para analizar un gen de interés con su respectivo gen de referencia. Debido a las fluctuaciones en la eficiencia de amplificación se considera la eficiencia de amplificación corregida de los cebadores en los cálculos, lo cual precisa valores más exactos en la proporción del nivel de expresión. Esta eficiencia puede ser calculada a través de la pendiente de la curva estándar graficada con el C_T de las diluciones seriadas de ADNc y el logaritmo de la cantidad de ADNc de cada dilución como se muestra a continuación en la Figura 12:



A:

$$E = 10^{-1/m}$$

B:

$$\%E = (E - 1) \times 100\%$$

Figura 12. Ejemplo de curva de eficiencia de amplificación de un par de cebadores.

Gráfica Log [ADN] vs C_T . A: Fórmula para hallar la eficiencia (E) a partir de la pendiente de la curva estándar.

B: Porcentaje de eficiencia de amplificación del par de cebadores.

Sin embargo, tanto la eficiencia como las proporciones de nivel de expresión pueden también determinarse con base en algoritmos de distintos *softwares* como LinRegPCR, REST y qBase, que facilitan el análisis de los datos de fluorescencia con significancia estadística.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

Laboratorio de Micología y Biotecnología. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MICROORGANISMOS: CEPAS, MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN.

Las cepas utilizadas que se especifican en la Tabla 5 fueron mantenidas a mediano plazo en tubos con cuñas de medio PDA. Para ello, se depositó en cada tubo un fragmento de agar procedente de un cultivo anterior, y se incubó a 28°C por 5 días, para posteriormente ser conservados a 4°C por un plazo de 3 meses aproximadamente. Para su conservación a largo plazo se obtuvo una suspensión de esporas a partir de cultivos frescos (como se describe en el apartado 3.5.1.), luego se añadió glicerol estéril al 30 por ciento (v/v) en tubos de criopreservación hasta alcanzar una proporción final del 15 por ciento (v/v) de glicerol y se guardó a -80°C.

Tabla 5: Cepas utilizadas en este trabajo, donadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), colección ARS (NRRL).

ESPECIE	CEPA	DESCRIPCIÓN
<i>Trichoderma reesei</i>	QM6a (ATCC® 13631)	Cepa silvestre
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC® 10864	Cepa silvestre
<i>Aspergillus phoenicis</i>	QM329 (ATCC® 52007)	Cepa silvestre

FUENTE: Elaboración propia

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo descritos a continuación fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

3.3.1. Medio PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Agar 15 g, dextrosa 10 g, papa 200 g y agua destilada c.s.p. 1 L. Se cortó la papa en trozos pequeños, se colocó en agua destilada y se calentó en el microondas hasta cocinarla. Luego se filtró a través de una capa de algodón, se añadió el resto de los reactivos, se licuó el agar en el microondas y se completó el volumen. Este medio se utilizó como medio de mantenimiento a corto plazo de cepas y crecimiento para obtención de esporas.

3.3.2. Medio para producción de celulasas

Según Gutiérrez-Correa y Villena (2012): KH_2PO_4 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, urea 0.3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, peptona 1 g, Tween 80 2 mL, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, lactosa 10 g y agua destilada c.s.p. 1 L. Además, se reemplazó la fuente de carbono (lactosa) por CMC para los experimentos de obtención de biopelículas óptimas.

Se mezclaron todos los reactivos y se ajustó el pH a 5.5 con NaOH 0.1 N.

3.3.3. Medio de pre-crecimiento

Se utilizó el medio de cultivo descrito en el apartado 3.3.2. con modificación en la fuente de carbono (lactosa) por glucosa 2 por ciento (p/v) y se ajustó el pH a 5.5 con NaOH 0.1 N.

3.3.4. Medio semi-sólido de producción de celulasas

Se utilizó el medio de cultivo descrito en el apartado 3.3.2. con agar 1.5 por ciento (p/v). Se vertió 20 mL del medio previamente esterilizado en placas estériles y se mantuvo sobre una superficie plana y equilibrada hasta su enfriamiento.

3.4. TEST DE COMPATIBILIDAD DE CEPAS: ENSAYO DE CONFRONTACIÓN EN MEDIO SEMI-SÓLIDO

A partir del protocolo usado por Malmierca *et al.* (2016), las placas con medio de producción de celulasas se inocularon con 2 μ L de suspensión de esporas de concentración 10^6 esporas/mL con una distancia de 4 cm entre ambos hongos (Figura 13). La compatibilidad entre cepas se evaluó, en primer lugar, comparando el crecimiento individual y dual de los hongos inoculados simultáneamente uno frente al otro. Posteriormente, se estandarizó el tiempo de inoculación entre cepas para una adecuada determinación de la actividad cualitativa endoglucanasa en las placas duales. Con el fin de facilitar la extracción enzimática de estos cultivos duales, se añadió sobre el agar un disco de fibra de vidrio, el cual fue retirado al terminar el cultivo para proseguir según se indica en el apartado 3.6.1.

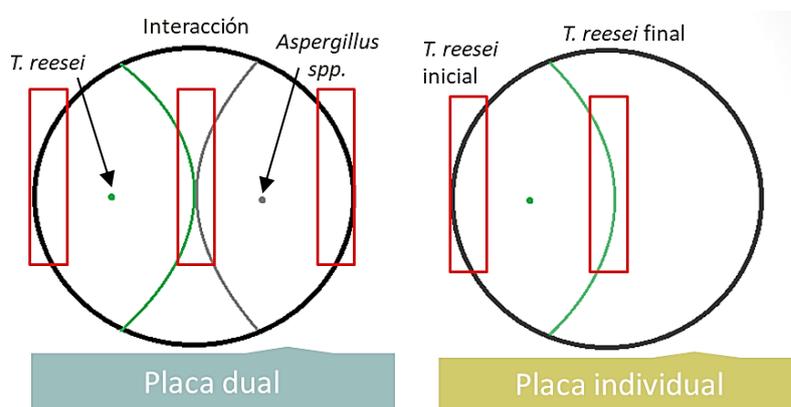


Figura 13. Esquema para ensayo de confrontación y zonas (en recuadro rojo) para la extracción de enzimas.

3.5. PROCEDIMIENTOS PARA LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS

El Anexo 1 muestra el flujo de trabajo por completo y las modificaciones realizadas a lo largo de los experimentos. A continuación, se detalla cada procedimiento:

3.5.1. Obtención del inóculo

Para la obtención de esporas fúngicas, se depositó un fragmento de agar procedente de un cultivo anterior en matraces (150 mL de capacidad) con medio PDA (aproximadamente 1.5 cm de espesor) y se incubaron a 28°C durante 7 días, hasta la esporulación completa del

hongo. Posteriormente, se añadió 5 mL de Tween 80 al 0.1 por ciento (v/v) y se agitó para desprender las esporas del agar; luego, se traspasó la suspensión de esporas a tubos de centrífuga estériles y se procedió a su conteo en la cámara Neubauer. Por último, con la concentración inicial determinada se procedió a diluir hasta alcanzar la concentración 10^6 esporas/mL.

3.5.2. Protocolo estándar de formación de biopelículas

Se siguió el procedimiento estandarizado por Villena (2002), con la proporción constante entre el soporte y volumen líquido del medio de cultivo de $0.27\text{cm}^2/\text{mL}$. Este soporte fue lavado varias veces con agua destilada para eliminar los residuos de fibras y fue secado en el horno a 100°C por 24 horas, pre-pesado y esterilizado por autoclave. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, con el apoyo de mechero con alcohol y cámaras de siembra con luz UV.

1. La primera etapa consiste en la adhesión de esporas al soporte. Para ello, se calculó un volumen del 3 por ciento (v/v) de la suspensión de esporas (ver apartado 3.5.1) con respecto al volumen del medio de producción de celulasas; es decir, por ejemplo, este volumen sería 2.1 mL de suspensión de esporas para 70 mL de medio de producción. El volumen de inóculo se añadió directamente al soporte, dentro de un matraz con agua destilada estéril. Esta etapa de adhesión se llevó a cabo en un agitador orbital húmedo a 28°C y 175 rpm por 15 minutos para el cultivo individual de *A. niger* y 2 horas para el cultivo individual de *T. reesei*.

Para las biopelículas mixtas se inoculó con 1.50 por ciento (v/v) de cada hongo. Primero, se inoculó a *T. reesei* con dos horas de adhesión en un matraz con agua destilada; luego, se trasladó el soporte a otro matraz con agua destilada estéril para la adhesión de 30 minutos con el inóculo de *A. niger*.

2. En esta etapa de lavados, se retira el exceso de esporas no adheridas. Es así que se traslada el soporte con esporas adheridas a un nuevo matraz con agua destilada para realizar dos lavados a 28°C y 175 rpm por 15 minutos cada uno.
3. Finalmente, para la etapa de producción de enzimas, se trasladó el soporte a un matraz con medio de producción de celulasas. Este fue incubado a 28°C y 175 rpm por 72 horas.

3.5.3. Modificaciones al protocolo estándar

Se realizaron experimentos modificando las variables determinantes para la mejora de la formación de la biopelícula, tales como:

- Velocidad de agitación: 120 rpm vs. 175 rpm.
- Compatibilidad entre cepas: *T. reesei-A. niger* vs. *T. reesei-A. phoenicis*.
- Soporte para el desarrollo de la biopelícula: Tela de poliéster vs. fibra de poliéster.
- Etapas de cultivo: 1 etapa (sin pre-crecimiento) vs. 2 etapas (con pre-crecimiento)
- Porcentaje de inóculo (v/v) con respecto al volumen de medio de producción: 3 por ciento vs. 1.5 por ciento vs. 0.75 por ciento.
- Fuente de carbono para la producción de celulasas: lactosa vs. CMC.

Para determinar la formación óptima de biopelículas, se tomaron como criterios principales de decisión el coeficiente específico de adherencia y la actividad endoglucanasa.

3.6. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN DE ENZIMAS

3.6.1. A partir de medio de cultivo semi-sólido

Según King *et al.* (2009a, 2011b), se recuperaron las enzimas secretadas a partir de cinco discos de agar retirados, con la ayuda de un sacabocado de 7 mm de diámetro, de las zonas de interacción e individual como se muestra en el recuadro rojo de la Figura 13. Para ello, los discos se colocaron en microtubos con 2 mL de buffer de extracción y se incubaron por 2 horas; posteriormente, se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante para realizar las pruebas bioquímicas cualitativas. Las enzimas recuperadas se conservaron a -20°C.

- *Buffer* de extracción: *buffer* acetato 0.1 M con 0.02 M NaCl ajustado a pH 5.5 y esterilizado por autoclave.

3.6.2. A partir de medio de cultivo líquido

Las enzimas secretadas por las biopelículas al medio de cultivo se recuperaron mediante filtración al vacío. Los filtrados se colectaron en microtubos para su uso inmediato y en tubos de centrífuga de 50 mL para su uso a mediano plazo. Ambas colecciones se conservaron a -20°C.

3.7. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.7.1. Determinación de biomasa

La biomasa se determinó por diferencia de peso seco. Para ello, los cultivos fueron filtrados al vacío con papel filtro pre-pesado y las biopelículas se colocaron en papel aluminio pre-pesado. Tanto la biomasa no adherida en el papel filtro como la biopelícula en el papel aluminio, se secaron en horno a 100°C por 24 horas; luego, se calculó el peso seco de la biomasa no adherida al restar el peso del papel filtro pre-pesado, y el peso seco de la biomasa adherida (biopelícula) al restar el peso del papel aluminio y soporte.

3.7.2. Métodos bioquímicos cualitativos

Los métodos descritos a continuación se utilizaron para una selección preliminar del sinergismo enzimático buscado y fueron modificados a partir de Pointing (1999).

- **Actividad endoglucanasa:** se mezcló y licuó 0.3 por ciento de carboximetilcelulosa (CMC), 1.5 por ciento de agar en *buffer* acetato 50 mM a pH 4.8 c.s.p. 200 mL. Para el revelado, se añadió Rojo Congo 0.5 por ciento por 15 minutos y se enjuagó con NaCl 1 M. El resultado positivo de esta actividad fue un halo de hidrólisis claro observado con la ayuda de un transiluminador de luz blanca.
- **Actividad β -glucosidasa:** se mezcló y licuó 0.2 por ciento de esculina, 1.5 por ciento de agar en buffer acetato 50 mM a pH 4.8 c.s.p. 200 mL; luego se añadió 0.06 por ciento de FeCl₃ (revelador). El resultado positivo de la actividad β -glucosidasa fue un halo de hidrólisis oscuro observado con la ayuda de un transiluminador de luz blanca.

En ambos casos, se vertió la mezcla en placas cuadradas de vidrio (18 cm x 17 cm) y una vez solidificada, se retiraron cilindros de agar con la ayuda de un sacabocado de 7 mm de diámetro. Estos orificios se rellenaron con 50 μ L de la mezcla, una vez solidificado, se colocaron 100 μ L del filtrado enzimático. Estas placas fueron incubadas a 50°C en baño María por 24 horas.

3.7.3. Métodos bioquímicos cuantitativos

La determinación cuantitativa de actividad enzimática se realizó en los cultivos óptimos para la producción enzimática que mostraron el sinergismo de interés.

- **Determinación de proteína soluble:** Se utilizó el método de Lowry descrito por Ghose (1987) usando la Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar (Anexo 2). La reacción utilizó 200 μL de filtrado enzimático con 1000 μL de solución C, se homogeneizó e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se añadió 400 μL de reactivo de Folin 1 N, se homogeneizó e incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La lectura de absorbancias se realizó a 550 nm.

Reactivo C: mezclar las soluciones A (Na_2CO_3 al 2 por ciento en 1 M de NaOH), B1 ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 por ciento) y B2 (tartrato de sodio al 1 por ciento) en proporción de 100:1:1.

- **Determinación de actividad endoglucanasa:** Se utilizó el método en microplaca descrito por Xiao *et al.* (2005) para un volumen de reacción total de 90 μL . Se usó 60 μL de CMC 1 por ciento como sustrato, 30 μL de filtrado enzimático y una curva estándar de glucosa (Anexo 3). Se incubó a 50°C por 30 minutos, se añadió 90 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se volvió a incubar a 95°C por 5 minutos. La lectura de absorbancias se realizó en un espectro de placas RT-2100C Microplate Reader a 540 nm.
- **Determinación de actividad papel filtro para celulasas totales (FPA):** Se utilizó el método de Mandels descrito por Ghose (1987) para un volumen de reacción total de 1.5 mL. Se usó 50 mg (1 x 6 cm) de papel filtro Whatman N°1 como sustrato, 0.5 mL de filtrado enzimático y una curva de glucosa como estándar (Anexo 4). Se incubó a 50°C en baño María por 60 minutos, se añadió 3 mL de DNS y se volvió a incubar a 95°C por 5 minutos. La lectura de absorbancias se realizó a 540 nm en un espectrofotómetro de tubos.

3.8. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y DE CRECIMIENTO

Se cultivaron biopelículas fúngicas simples y mixtas con la finalidad de observar su tendencia de crecimiento y actividad cualitativa endoglucanasa y β -glucosidasa a lo largo del tiempo. Para ello, se colectaron dos réplicas biológicas cada 10 a 12 horas (ver apartado 3.6.2.), se determinaron sus biomasas (apartado 3.7.1.), y las actividades cualitativas endoglucanasa y β -glucosidasa (apartado 3.7.2.) de los filtrados enzimáticos colectados.

3.9. ANÁLISIS PARA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CELULASAS

3.9.1. Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se realizó de forma manual, de acuerdo a las directrices señaladas en Basu (2015) y Bio-Rad Laboratories (2006), con el uso de herramientas como *Alignment Search Tool* (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *OligoAnalyzer 3.1* (*Integrated DNA Technologies*) y *FastPCR* (Valla & Lale, 2014).

Los cebadores se diseñaron para ser especie-específicos debido a la importancia de discriminar entre genes de secuencias parecidas dentro de una muestra mixta; para ello, se identificaron las zonas no conservadas entre genes homólogos de *T. reesei* y *A. niger* a través de alineamientos múltiples con ayuda del *software online Clustal Omega* (Figura 14).

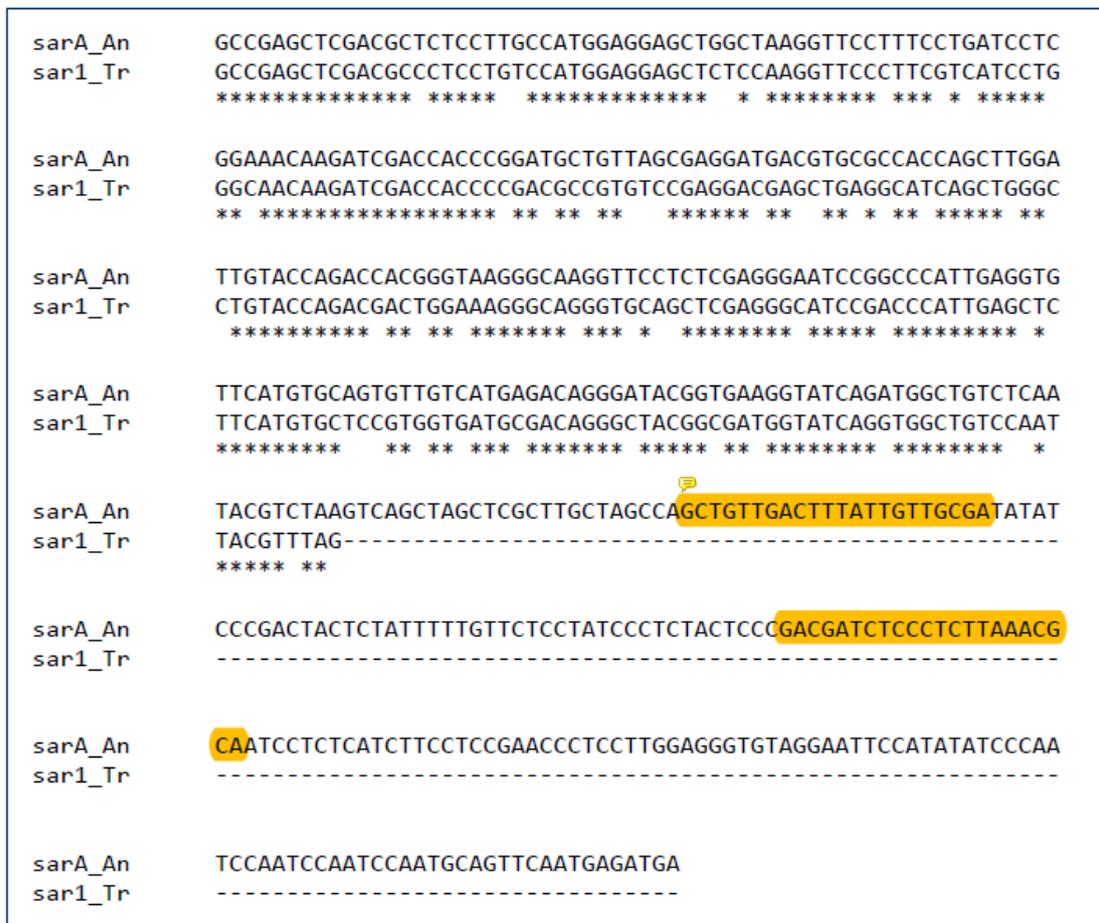


Figura 14. Imagen parcial de alineamiento del gen de referencia *sarA* de *A. niger* y *sar1* de *T. reesei* en el software online *Clustal Omega*.

Cebadores específicos para *A. niger* en sombreado anaranjado. Los asteriscos indican las bases nitrogenadas conservadas entre las secuencias *sarA* y *sar1*.

FUENTE: Elaboración propia.

Como se muestra en la Figura 14, ambos genes tienen zonas muy conservadas, lo que se refleja en un alto porcentaje de identidad entre las secuencias y, por lo tanto, dificulta el diseño de cebadores específicos; por ello, se seleccionaron genes con bajo porcentaje de identidad y presencia de zonas no conservadas.

De esta manera, los genes de referencia (*housekeeping genes*) usados en este trabajo para la normalización fueron escogidos con base en la bibliografía revisada: *sarA* y *cox5* para *A. niger* según Bohle *et al.* (2007); y *sar1* y *cox4* para *T. reesei* según Steiger *et al.* (2010).

Así también, los genes de celulasas y reguladores de *T. reesei* fueron seleccionados según Kubicek *et al.* (2009) y sus homólogos para *A. niger* se seleccionaron desde *Aspergillus Genome Database* (Arnaud *et al.*, 2011). Las secuencias de estos genes se descargaron de la base de datos del servidor de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Aspergillus Genome Database* (Arnaud *et al.*, 2011) y *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZy).

Se verificó experimentalmente la especificidad de los pares de cebadores diseñados mediante un ensayo de qPCR con ADNc de cultivos simples y mixtos. Con los datos obtenidos, se analizaron las curvas de fusión (*melting curves*), temperaturas de fusión (*melting temperatures*) y electroforesis en gel de agarosa 1.5 por ciento (p/v).

La eficiencia de amplificación de los cebadores específicos se calculó con los resultados de fluorescencia sin la corrección automática del equipo, en el *software* LinRegPCR versión 2017.1 (Ruijter *et al.*, 2009).

3.9.2. Extracción y purificación de ARN

Los materiales de vidrio, porcelana y metal utilizados fueron esterilizados previamente en un horno a 200°C por 2 horas; el material de plástico se esterilizó por autoclave; y las superficies de trabajo se limpiaron con alcohol 70 por ciento y lejía 1 por ciento. Además, se utilizó peróxido de hidrógeno 3 por ciento para eliminar la contaminación con ARNasas.

Para la extracción de ARN de las biopelículas, estas fueron lavadas con agua estéril, filtradas al vacío y conservadas inmediatamente a -80°C en papel aluminio con su respectivo etiquetado.

El protocolo usado que se detalla a continuación se basa en el *kit* Direct-zol™ RNA Miniprep de *Zymo Research* con algunas modificaciones:

1. Se pulverizó la biopelícula en un mortero con la ayuda de nitrógeno líquido.
2. Se pesó aproximadamente 25 mg del pulverizado en un microtubo de 2 mL, en otro se colocó la fibra de poliéster y la biomasa pulverizada restante se almacenó en un microtubo a -80°C.
3. Al microtubo con la fibra se le añadió 600 µL del reactivo TRI Reagent® y se homogeneizó con la ayuda del vórtex, se recuperó el sobrenadante y se transfirió al microtubo con los 25 mg de biomasa, luego se homogeneizó con vórtex.

4. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Se añadió 120 µL de cloroformo y se homogeneizó con el vórtex.
6. Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos.
7. Se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C.
8. Se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo (400 µL aproximadamente) y se le añadió el mismo volumen de etanol grado molecular, la mezcla se realizó por inversión.
9. El volumen total se transfirió a una columna zymo-spin™ IIC con su respectivo tubo colector y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el contenido del tubo colector.
10. Se añadió 400 µL de *RNA Wash Buffer* a la columna y se centrifugó a 12000 g por 30 segundos.
11. Tratamiento con DNasa I: En un microtubo nuevo se mezcló 10 µL de DNasa I (12 U) y 70 µL de *DNA Digestion Buffer*, y se añadió directamente a la columna.
12. La incubación con la enzima fue de 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.
13. Luego se añadió 400 µL del *RNA PreWash* a la columna, se centrifugó a 12000 g por 1 minuto y se descartó el contenido del tubo colector. Se repitió este paso.
14. Se añadió 700 µL de *RNA Wash Buffer* a la columna y se centrifugó a 12000 g por 2 minutos.
15. La columna fue transferida cuidadosamente a un nuevo microtubo, debidamente rotulado para su almacenamiento a -80°C
16. Se añadió 50 µL de agua libre de nucleasas (provista por el *kit*) a la columna y se centrifugó a 12000 g por 2 minutos. Se conservaron a mediano plazo a -20°C.

La calidad y cantidad de las muestras de ARN se analizaron espectrofotométricamente en NanoDrop™ 2000, para lo cual se consideró un valor aceptable de ~2.0 para la *ratio* 260/280, y un valor entre 2.0-2.2 para la *ratio* 260/230. Esta información espectrofotométrica se complementó con la visualización de la integridad del ARN ribosomal a través de la electroforesis en gel de agarosa 1 por ciento (p/v) con *buffer* TAE 1X y mix GelRed®, cuyas bandas se observaron mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

- *Buffer* TAE 50X: 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de 0.5 M EDTA y agua ultra pura c.s.p. 1 L a pH 8.0, este se autoclavó para luego ser diluido a 1X con agua ultra pura.

- Mix GelRed®: 87 por ciento de *DNA Gel Loading Dye 6X* (Thermo Scientific) y 13 por ciento de GelRed® diluido 1/10 con agua libre de nucleasas.

3.9.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se realizó la síntesis de ADNc a partir de 2 µg de ARN total a partir de una mezcla homogénea de ARN de 3 réplicas biológicas, y se utilizó el *kit* comercial *Reverse Transcription System Promega*®. Según las especificaciones del fabricante, se incubaron las muestras con 0.5 µg de Oligo (dT)₁₅ Primer a 70°C por 5 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo; luego, se mezcló con los otros componentes del *kit* y se incubó a 42°C por 60 minutos. Todas las muestras sintetizadas tuvieron su respectivo control sin enzima transcriptasa reversa (NRT) para verificar la ausencia de ADN genómico en el ensayo de expresión en qPCR. Estas fueron conservadas a -20°C.

3.9.4. Análisis de expresión génica relativa de celulasas mediante qPCR

La reacción se realizó en un termociclador CFX96™ Real-Time System con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo inicial a 95°C durante 3 minutos (activación de la enzima y desnaturalización del ADN), seguido de 40 ciclos a 95°C durante 3 segundos (desnaturalización) y 60°C durante 20 segundos (hibridación y extensión). Tras la amplificación, se incluyó un paso de extensión final a 95°C por 10 segundos, luego de lo cual se añadió un paso de disociación en el que se midió continuamente la fluorescencia emitida en un rango de 65-95°C aumentando la temperatura 0.5°C cada 5 segundos. Todas las reacciones se prepararon utilizando el *kit* comercial Kapa SYBR® Fast qPCR Kit Master Mix (2x) Universal, según las especificaciones del fabricante para un volumen de reacción final de 10 µL con 1 µL de ADNc en dilución 1/3. Además, se tomó en cuenta en el diseño de la placa (Anexo 5) los controles NRT (control con ADNc sin transcriptasa reversa) y NTC (control sin ADNc molde).

Los valores de fluorescencia obtenidos del termociclador Bio-Rad CFX se cargaron en el *software* LinRegPCR versión 2017.1 para determinar los C_T y eficiencia de amplificación, que posteriormente se analizaron de acuerdo con el modelo matemático descrito por Pfaffl (2001) para un gen de interés con un gen de referencia (ver apartado 2.6.).

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico Minitab®18 tomando las siguientes consideraciones:

- Nivel de confianza: 95 por ciento
- Nivel de significación: 0.05
- El rechazo de la hipótesis nula consideró un p-valor obtenido menor al nivel de significación.
- Se utilizaron las pruebas estadísticas t-student, ANOVA y HDS de Tukey según la cantidad de tratamientos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. OBTENCIÓN DE UN SISTEMA ÓPTIMO DE CULTIVO DE BIOPELÍCULAS MIXTAS

Experimentos previos con el protocolo estándar de formación de biopelículas mostraron alta adhesión al soporte por parte de *Aspergillus* sp. y baja adhesión por parte de *T. reesei*, a causa de ello se observó alta heterogeneidad morfológica y de adhesión entre las biopelículas mixtas.

De esta manera, se escogieron variables determinantes para la formación de biopelículas óptimas e inducción de la actividad enzimática celulolítica de acuerdo con la bibliografía revisada. A continuación, se estudió el efecto de las siguientes variables sobre la formación de las biopelículas individuales, en primer lugar, y luego sobre las biopelículas mixtas:

4.1.1. Velocidad de agitación

Dentro del protocolo estándar existen dos procedimientos clave que se influyen por esta variable, la adhesión de esporas y el cultivo en medio de producción. Para el desarrollo de este experimento, se probaron dos velocidades de agitación sobre el cultivo en medio de producción de celulasas. La importancia de la velocidad de agitación sobre esta parte del procedimiento es evitar la presencia de micelio no adherido en el medio de producción, pues implica incertidumbre sobre la procedencia de las enzimas difundidas al medio líquido circundante.

La agitación mecánica sobre los cultivos con hongos filamentosos influencia a la absorción de nutrientes, la cantidad de oxígeno disuelto y la biomasa micelial (Singh *et al.*, 2014), su morfología y fragmentación (Novy *et al.*, 2016). Una excesiva agitación puede provocar daño y destrucción del micelio en fragmentos pequeños, por ello, el enfoque con esta variable se direccionó hacia óptimas características de transferencia de masa por efecto de la aireación e incremento de la velocidad evitando fraccionar el micelio.

La Figura 15 muestra la biomasa adherida y no adherida de los cultivos simples de *T. reesei* a dos velocidades de agitación, la visible diferencia entre estas velocidades se refleja en el peso de la biomasa no adherida y el coeficiente de adhesión. *T. reesei* presentó biopelículas bien formadas y casi intactas a una velocidad de agitación de 120 rpm; mientras que, a 175 rpm, el micelio no adherido fue casi semejante en peso a la biopelícula formada.

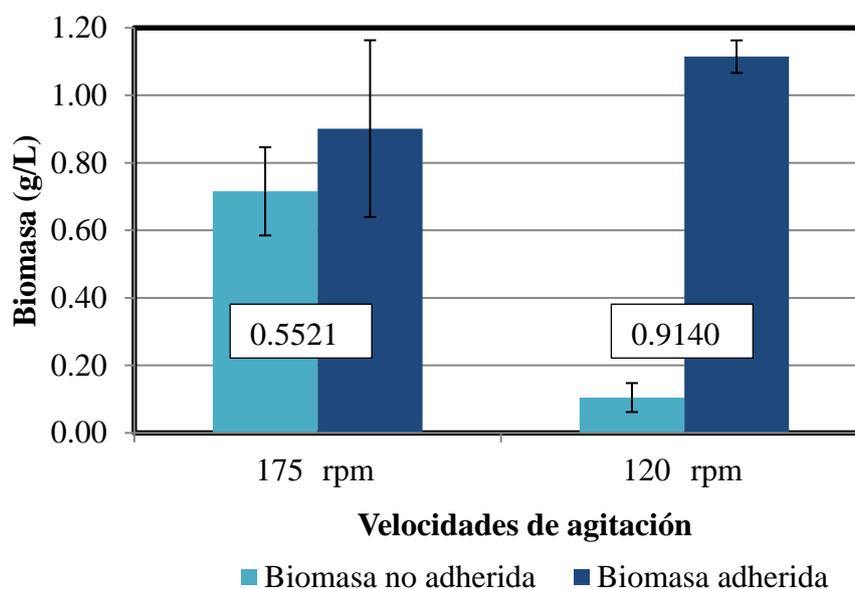


Figura 15. Efecto de la velocidad de agitación (175 rpm y 120 rpm) sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas simples de *T. reesei* QM6a.

Condiciones de cultivo: Sobre soporte de tela de poliéster tras 72 horas de cultivo en medio de producción de celulasas con lactosa. En los recuadros blancos se incluyen las medias de los coeficientes de adhesión.

La desventaja principal del uso de una velocidad de agitación tan baja es la concentración de oxígeno disuelto, lo que se refleja a su vez en actividades enzimáticas bajas (Lejeune & Baron, 1995); sin embargo, para este trabajo no sólo se deben considerar las altas tasas de actividad celulolítica sino su pertenencia completa a una biopelícula adherida. Por ello, se decidió continuar los posteriores experimentos con la velocidad de agitación más baja (120 rpm) sobre el cultivo en medio de producción de celulasas.

En contraste con nuestros resultados, Villena (2002) obtuvo biopelículas mixtas uniformes y con alto coeficiente específico de adherencia a 175 rpm. Esta diferencia se podría conferir únicamente a las cepas utilizadas en su investigación (*T. reesei* LM-UC4 y *A. niger* ATCC® 10864); es decir que, la elección de cepas compatibles es la siguiente variable fundamental.

4.1.2. Compatibilidad entre cepas

Según Kolasa *et al.* (2014), la compatibilidad se define como la habilidad del hongo de crecer en un cultivo mixto. Es así que, para este análisis, se llevó a cabo el ensayo de confrontación entre las cepas *T. reesei*- *A. niger* y *T. reesei*- *A. phoenicis*, de tal manera que en ambas combinaciones se inocularon los hongos al mismo tiempo en extremos opuestos de una placa con medio de producción de celulasas con lactosa. Los patrones de crecimiento se determinaron como: crecimiento compatible, si el crecimiento de las especies es una en dirección de la otra sin ningún efecto negativo entre ellas; inhibición al contacto o a distancia, si se observa ausencia de una zona de interacción y crecimiento opuesto; y sobrecrecimiento, si una especie es dominante sobre la otra (Hu *et al.*, 2011; Malmierca *et al.*, 2016).

Este test de compatibilidad manifestó la capacidad de crecimiento de cultivos mixtos de ambas combinaciones; es decir, *T. reesei* es compatible con *A. phoenicis* y con *A. niger*.

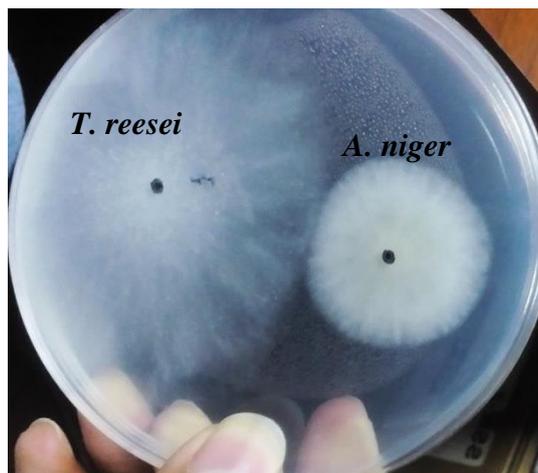


Figura 16. Ensayo de confrontación de *T. reesei* y *A. niger*, inoculados simultáneamente.

Condiciones de cultivo: 48 horas de cultivo en medio semi-sólido de producción de celulasas con lactosa a 28°C.

Sin embargo, el crecimiento de *T. reesei* fue mayor que el de sus parejas, tanto en cultivos duales como en los controles de sus cultivos individuales (resultados no mostrados). Para determinar la presencia de sinergismo enzimático de estas combinaciones y escoger la mejor pareja, se optimizó el tiempo de inoculación entre cepas, porque se precisa de la mayor área posible de la zona de interacción entre hongos para la extracción de enzimas y determinación de su actividad.

Para ello, se tomó como referencia el ensayo de confrontación anterior (Figura 16) y se inoculó en primer lugar a *Aspergillus* sp., otorgándole una ventaja temporal de 24 (resultados no mostrados) y 48 horas sobre *T. reesei* (Figura 17). Siendo este último el tiempo óptimo de inoculación entre cepas.

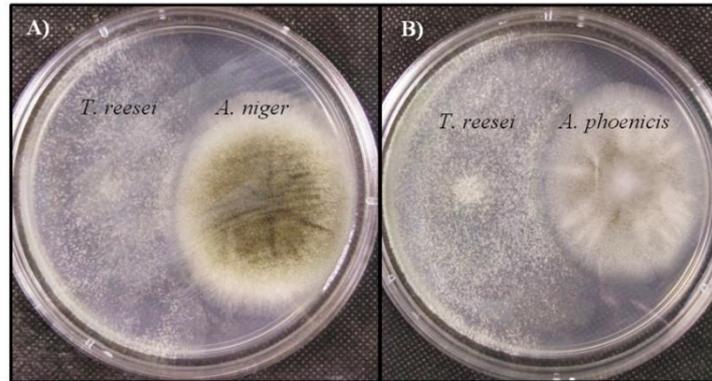


Figura 17. Ensayos de confrontación optimizados de A) *T. reesei* y *A. niger*; y B) *T. reesei* y *A. phoenicis*, para la recuperación de enzimas.

Condiciones de cultivo: 48 horas en medio semi-sólido de producción de celulasas con lactosa a 28°C. Las esporas de *T. reesei* se inocularon 48 horas después de la inoculación de *Aspergillus*.

La actividad enzimática de estas combinaciones (Figura 18) demostró halos de hidrólisis mayores en la zona de interacción de la combinación *T. reesei*-*A. phoenicis* con respecto a sus zonas de cultivo individual.

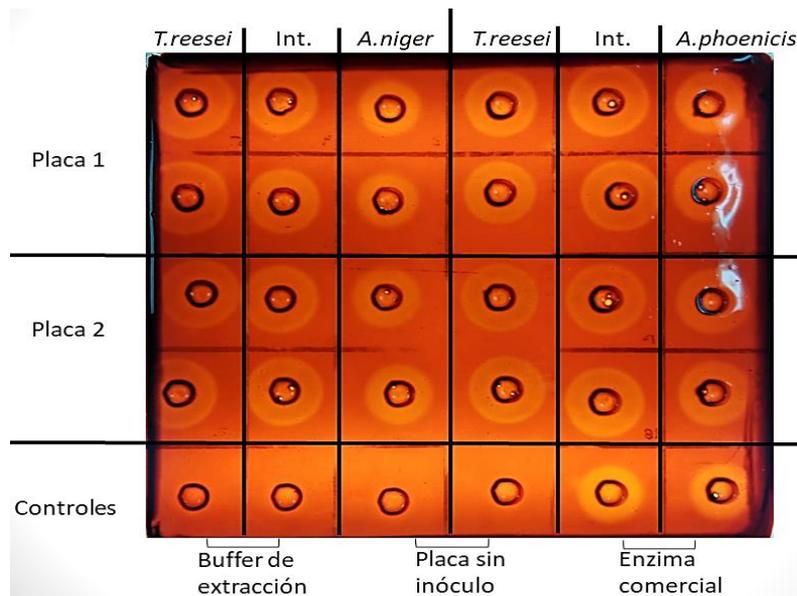


Figura 18. Actividad enzimática cualitativa endoglucanasa de placas duales de *T. reesei*-*A. niger*, y *T. reesei*-*A. phoenicis*.

Int.: zona de interacción

Las interacciones entre microorganismos son diversas y complejas, pues dependen del ambiente y de los mismos microorganismos (Bertrand *et al.*, 2014); por ello, las combinaciones entre *T. reesei* y *Aspergillus* sp. pueden variar su compatibilidad de acuerdo con la cepa y el medio de cultivo utilizado (Gutiérrez-Correa & Tengerdy, 1997; Wen *et al.*, 2005; Kolasa *et al.*, 2014). Esto se manifiesta tanto en el crecimiento como en su actividad enzimática, lo cual conllevó a realizar pruebas de compatibilidad en el sistema fermentativo a estudiar, es decir en el sistema de biopelículas.

Las biopelículas mixtas se cultivaron de acuerdo al protocolo estándar en medio de producción con lactosa a la velocidad de agitación de 120 rpm, determinada con anterioridad. Los resultados obtenidos (Figura 19) de coeficiente específico de adherencia y peso seco de la biomasa de las combinaciones realizadas, muestran una relación compatible y poco variable entre *T. reesei* y *A. niger*, a diferencia del cultivo mixto de *T. reesei* y *A. phoenicis*.

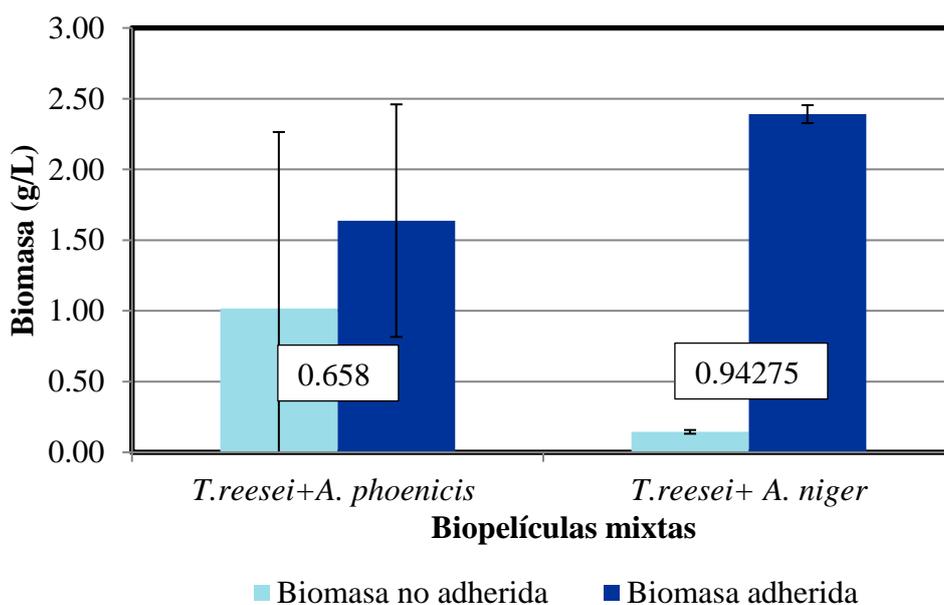


Figura 19. Efecto de la compatibilidad de cepas sobre el peso seco de biomasa de biopelículas mixtas de dos combinaciones de *Aspergillus* sp. con *T. reesei* QM6a.

Condiciones de cultivo: Sobre soporte de tela de poliéster tras 72 horas de cultivo a 120 rpm en medio de producción de celulasas con lactosa. En los recuadros blancos se incluyen las medias de los coeficientes de adhesión.

Esta combinación compatible concuerda con estudios realizados sobre cultivos mixtos, tal como Kolasa *et al.* (2014), que reportan la mayor cantidad de interacciones compatibles entre

T. reesei y *A. niger* en diferentes fuentes de carbono, con mayor compatibilidad en Avicel y menor en CMC. Empero, a pesar de la visible compatibilidad entre *T. reesei* y *A. niger*, Daly *et al.* (2017) reportaron efectos antagónicos en el crecimiento de la biomasa micelial en otro sistema fermentativo, pues la tasa de crecimiento más rápida de *T. reesei* conllevó a la disminución de biomasa del otro hongo.

De esta manera, se precisó optimizar el cultivo en biopelícula de la combinación *T. reesei* y *A. niger*, pues si bien son compatibles en crecimiento, existen otras variables que afectan su cultivo mixto.

4.1.3. Soporte para el desarrollo de la biopelícula

Si bien las variables anteriores aportaron mejoras en la adhesión y crecimiento de los hongos, tanto en cultivos de biopelícula simples como mixtos, la variabilidad entre lotes (cultivos en diferentes puntos temporales) de las biopelículas simples de *T. reesei* fue alta. Considerando el menor tamaño de las esporas de este hongo, otra de las variables a desarrollar fue el soporte de poliéster.

Entre las características que se tomaron en cuenta para elegir otro soporte se encuentran la porosidad, rugosidad, condición inerte (no interactúa metabólicamente con el hongo) y facilidad para cuantificar la biomasa. Así, se compararon dos soportes de material similar: tela de poliéster y fibra de poliéster, siendo el último un entretejido más laxo lo que provee más zonas para el atrapamiento de esporas.

En la figura 20 se observa que la adhesión de *T. reesei* al soporte de tela de poliéster fue muy baja, la biomasa no adherida superó en peso a la biopelícula formada; no obstante, esta baja adhesión se ve corregida en los cultivos mixtos, pues *A. niger* parece promover la adhesión de *T. reesei* a este soporte. Sin embargo, la comparación entre cultivos simples y mixtos en el soporte de tela no es factible, debido a la incertidumbre sobre la procedencia de las enzimas anteriormente mencionada.

Los resultados al utilizar el soporte de fibra de poliéster fueron superiores, la adhesión aumentó en los cultivos simples de *T. reesei* y se mantuvo en los cultivos mixtos; así también, la biomasa total de ambos cultivos disminuyó con respecto al uso del soporte de tela.

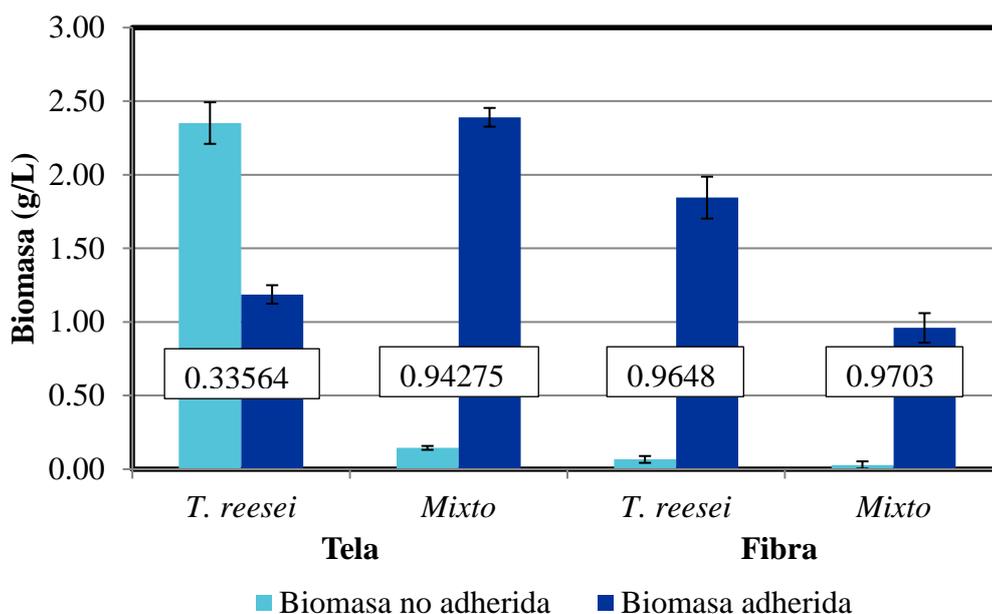


Figura 20. Efecto del soporte de poliéster (Tela vs. Fibra) sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas de *T. reesei* QM6a y mixtas.

Condiciones de cultivo: 72 hora de cultivo en medio de producción de celulasas con lactosa a 120 rpm. En los recuadros blancos se incluyen las medias de los coeficientes de adhesión.

Analógicamente, Velichkova *et al.* (2014) emplearon una esponja vegetal, donde inmovilizan a *T. reesei* y *A. awamori* para la producción de hidrolasas; esta referencia de matriz de inmovilización asegura un precedente para el uso de fibras y esponjas, que por su alta porosidad, bajos costos y alta retención de viabilidad celular prometía ser la mejor opción sustituible.

Por otra parte, la adhesión de esporas contempla interacciones ácido-base de las esporas (donador de electrones) con la superficie de adhesión (aceptor de electrones) (El Abed *et al.*, 2010). Esta adhesión difiere entre las esporas de *A. niger* y *T. reesei* en un mismo soporte, dados los resultados anteriores y las pocas fluctuaciones en los cultivos simples de *A. niger* (resultados no mostrados), esta diferencia parece estar relacionada con aspectos morfológicos de sus esporas. Es decir, morfológicamente, las esporas de *A. niger* están fuertemente agrupadas formando agregados celulares (El Abed *et al.*, 2010), mientras que las esporas de *T. reesei* se observaron más dispersas bajo la vista al microscopio. Esto se traduce en agregados de esporas de *A. niger* con mayor volumen que son atrapados en el soporte, lo cual no ocurre con *T. reesei*, pues el atrapamiento de estas es individual y por ende existen más posibilidades de desprendimiento.

Además, se conocen hidrofobinas presentes en ambos hongos, que son proteínas involucradas en la adhesión a superficies; sin embargo, la expresión de estos en *T. reesei* diverge debido a las distintas fuentes de carbono en el medio de cultivo. Por ejemplo, *hfb1* se expresa en medios con glucosa o sorbitol, pero no en xilano, celobiosa, lactosa o celulosa; *hfb2* y *hfb3* se expresan muy bien en medios con lactosa y celulosa, mas no en medios con glucosa (Askolin, 2006; Khalesi *et al.*, 2014). Por lo que, posteriormente, se incluyeron experimentos con distintas fuentes carbonadas para la formación de biopelículas en soporte de fibra de poliéster.

4.1.4. Etapas de cultivo de la biopelícula

El cultivo de la biopelícula bajo el protocolo estándar se denominó como cultivo en 1 etapa, este protocolo modificado con las variables antes mencionadas (apartados 4.1.1., 4.1.2. y 4.1.3.) mostró variabilidad morfológica y de coloración entre las réplicas biológicas y lotes de cultivo de biopelículas mixtas (ver Anexo 10). Los aspectos morfológicos de las biopelículas mixtas están relacionados con la cantidad de inóculo inicial adherido al soporte y en el caso del cultivo en 1 etapa, esta adhesión aún siguió siendo variable en las biopelículas mixtas; por ello, con el fin de uniformizar la morfología de estas biopelículas y, por ende, todos los aspectos enzimáticos y de interrelación entre los hongos, se planteó un cultivo en 2 etapas.

El cultivo en 2 etapas constó de una etapa previa de crecimiento, en la cual se inocularon simultáneamente la misma cantidad de esporas de ambos hongos y se cultivaron por 24 horas en medio de pre-crecimiento con glucosa. Después de ello, se trasladó el soporte a un matraz con agua para retirar la glucosa extracelular y biomasa no adherida; finalmente, este soporte se trasladó al medio de producción de celulasas, etapa que sería estrictamente de producción de celulasas. De esta manera, este cultivo en dos etapas proporcionó un periodo en el que ambos hongos interaccionan, se adhieren de manera más uniforme al soporte y tienen la expresión celulolítica reprimida por la presencia de glucosa.

Los resultados obtenidos mostraron mayor variabilidad en el peso de las biomásas no adheridas y los coeficientes de adhesión de los cultivos en 2 etapas que el cultivo en 1 etapa (Figura 21). La biomasa total de los cultivos en 2 etapas aumentó debido a la etapa previa de crecimiento; pese a los resultados no favorables en cuanto a biomasa no adherida, las diferencias morfológicas y de coloración entre las réplicas se estrecharon (Figura 22), lo cual

nos otorga mayor seguridad de encontrarnos frente a biopelículas mixtas más homogéneas y se comprobará la presencia de ambos hongos con los análisis moleculares para la expresión génica de celulasas.

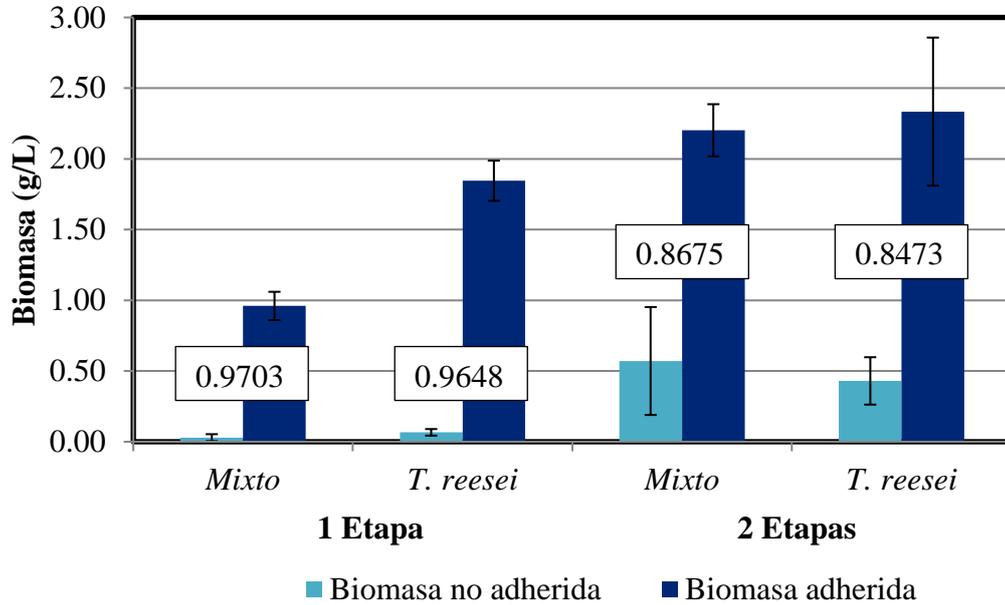


Figura 21. Efecto del pre-crecimiento de la biopelícula (cultivo en 1 etapa vs. 2 etapas) sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas simples de *T. reesei* QM6a y mixtas.

Condiciones de cultivo: 72 horas de cultivo a 120 rpm en soporte de fibra de poliéster en medio de producción de celulasas con lactosa. En los recuadros blancos se incluyen las medias de los coeficientes de adhesión.



Figura 22. Réplicas biológicas de biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei*.

Condiciones de cultivo: 72 horas de cultivo a 120rpm sobre fibra de poliéster en medio de producción de celulasas con lactosa. Biopelículas mixtas de coloración blanca y micelio de morfología algodonosa superficial y con núcleo fuertemente adherido.

Tanto la glucosa como otros azúcares monoméricos son de fácil absorción para *A. niger* (Lameiras *et al.*, 2018) y *T. reesei* (Bischof *et al.*, 2013); así también, como se detalló en el apartado 2.5, la glucosa cumple un papel importante en la represión por catabolito carbono. Todo ello converge en la idoneidad de la glucosa para ser fuente de carbono del pre-cultivo, pues proporciona la oportunidad de crecimiento de ambos hongos sin competitividad o preferencia de una especie sobre otra, es decir facilita el crecimiento micelial y permite la comunicación de especies. Además, la inoculación con micelio pre-crecido genera menor heterogeneidad en la morfología frente a distintas fuentes de carbono (Lameiras *et al.*, 2018).

No obstante, la cantidad de biomasa total nos indica un exceso de inóculo en el pre-cultivo y el ingreso de una biopelícula sobrecrecida a la etapa de producción de celulasas, lo cual perjudicaría al sistema por sobrecrecimiento y desprendimiento de la biopelícula formada. Por ello, otra de las variables a modificar fue el porcentaje de inóculo total del pre-cultivo.

4.1.5. Porcentaje de inóculo (v/v) con respecto al volumen de medio de producción

Los cultivos simples y mixtos se inocularon con tres porcentajes de inóculo total: 3.00 por ciento como control; 1.50 por ciento y 0.75 por ciento como tratamientos. En primer lugar, se evaluaron los efectos de esta variable en las biopelículas simples de *T. reesei* por ser el individuo más sensible a los cambios realizados; luego se comparó con las biopelículas mixtas y se determinó el porcentaje adecuado para que el sistema sea óptimo en términos de crecimiento.

Las biopelículas simples de *T. reesei* mostraron altos coeficientes de adherencia, baja cantidad de biomasa no adherida y reducción de la variabilidad entre réplicas biológicas al disminuir el porcentaje de inóculo (Figura 23), lo cual indica un exceso en el inóculo inicial en el protocolo estándar.

Caso similar, las biopelículas mixtas mostraron las mismas características que los cultivos simples al modificar esta variable (Figura 24). Es decir, la disminución en la cantidad total inicial del inóculo favorece a la obtención de biopelículas con ausencia de micelio desprendido o no adherido. Pese a estos resultados cuantitativos y visuales, el análisis estadístico determinó que sólo existen diferencias significativas en el tratamiento 1.50 por ciento de inóculo total en biopelículas mixtas.

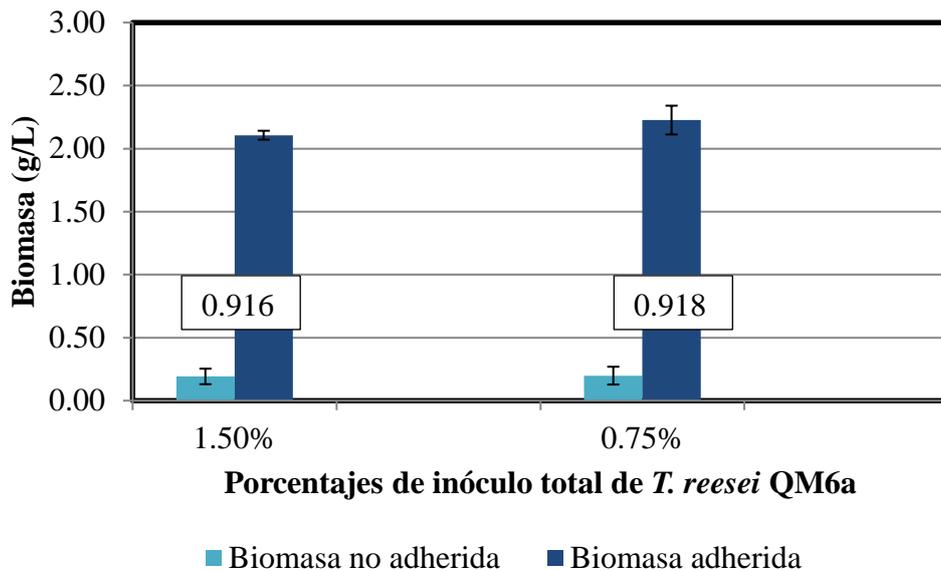


Figura 23. Efecto de los porcentajes de inóculo total sobre el peso seco de la biomasa de biopelículas simples de *T. reesei* QM6a.

Condiciones de cultivo: 72 horas de cultivo en 2 etapas en medio de producción de celulasas con lactosa sobre fibra de poliéster a 120 rpm. En los recuadros blancos se incluyen las medias de los coeficientes de adhesión.

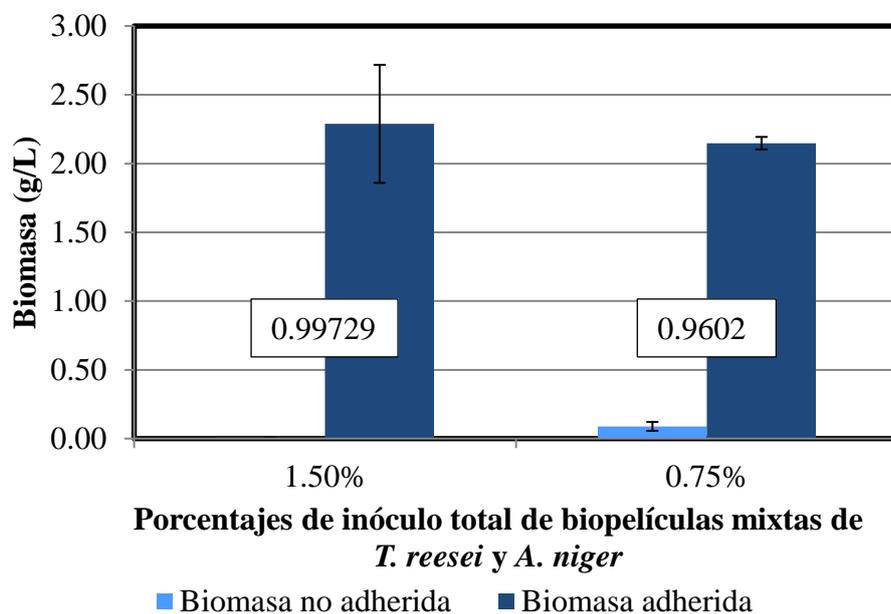


Figura 24. Efecto de los porcentajes de inóculo total sobre el crecimiento de biopelículas mixtas de *T. reesei* QM6a y *A. niger*.

Condiciones de cultivo: 72 horas de cultivo en 2 etapas en medio de producción de celulasas con lactosa sobre fibra de poliéster a 120 rpm. En los recuadros blancos se incluyen las medias de los coeficientes de adhesión.

Con base en las propiedades de las esporas para adherirse a una superficie, se puede inferir que estas ocupan un espacio físico sobre el soporte, así como su aglomeración sobre sí mismas y atrapamiento en el entretejido del soporte.

Así también, la morfología de los hongos puede verse afectada directamente por la concentración de esporas en el medio de cultivo; tal como Papagianni & Matthey (2006) reportan para *A. niger*, existen cuatro clases morfológicas en fermentación sumergida: *pellets* globulares, *pellets* alargados, grumos y micelio libre. De tal manera que, a bajas concentraciones (10^4 esporas/mL) predomina la forma de *pellets* y a altas concentraciones (10^9 esporas/mL), la forma filamentosa o dispersa con menores niveles de oxígeno disuelto (Veiter *et al.*, 2018). Debido a ello, la concentración y porcentaje de inóculo desproporcionado entre el medio de cultivo y soporte, conllevaría a la formación de biomasa no adherida.

Como se observó a lo largo todos los ensayos, *T. reesei* presentó muchas dificultades en su adhesión al soporte, este problema se percibió con claridad en sus pre-cultivos, pues en los distintos porcentajes de inóculo, exhibió mucha biomasa no adherida de aspecto algodonoso. En contraste, *A. niger* mostró alta adhesión en bajos porcentajes de inóculo y en menor medida a 3.00 por ciento de inóculo total, situación en la que destacó la presencia de *pellets* libres en el medio circundante.

Cabe resaltar la completa adhesión observada en los cultivos mixtos durante el pre-cultivo con 1.50 por ciento de inóculo total (Figura 25). Estos cultivos exhibieron la ausencia de biomasa no adherida y mantuvieron las características morfológicas de ambos hongos. Este fenómeno de adhesión sugiere que la presencia de *A. niger* favorece a la adhesión de *T. reesei*. Las diferentes explicaciones planteadas para este fenómeno implicarían la adhesión total de las esporas al soporte, el atrapamiento de las esporas de *T. reesei* por parte de las esporas más grandes y “pegajosas” de *A. niger*, entre otras; es así que un estudio focalizado podría ayudar a determinar los factores que favorecen la adhesión de *T. reesei* para mejorar su cultivo industrial.

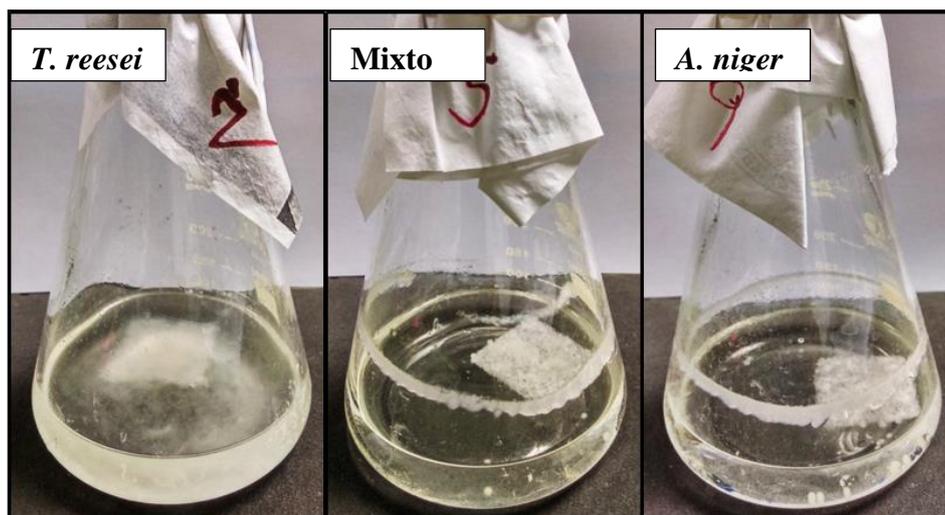


Figura 25. Biopelículas simples y mixta de *T. reesei* QM6a y *A. niger* obtenidas tras 24 horas de pre-cultivo en medio de pre-crecimiento con 1.50 por ciento de inóculo total.

En los recuadros blancos se mencionan las especies de las biopelículas.

Las interacciones entre hongos pueden ser muy variables, como se discutió anteriormente en el apartado 4.1.2., no sólo dependen de los individuos en estudio sino también de la interacción con el medio de cultivo. Dado que la glucosa es un azúcar de fácil absorción, no debería afectar otras variables más que el crecimiento micelial; sin embargo, se ha visto que la presencia de este azúcar varía la expresión de genes no celulolíticos como aquellos que codifican hidrofobinas (Askolin, 2006), los cuales están implicados en la adhesión a superficies hidrofóbicas.

Por otra parte, este pre-cultivo en glucosa es la etapa previa a la de producción enzimática, y por ello, no se requiere perfeccionar más que en dos puntos importantes: la formación de una biopelícula ralmente pre-crecida y la represión de los genes celulolíticos. Es así que, se decidió continuar la selección de la fuente carbonada para la inducción de celulasas con cultivos de 1.50 por ciento de inóculo total.

4.1.6. Fuente de carbono para la producción de celulasas

Las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo afectaron a la cantidad de biomasa total de los hongos estudiados; es así que, cultivos simples sumergidos de *T. reesei* y *A. niger* exhibieron diferencias en el peso seco de la biomasa en presencia de lactosa y glicerol, siendo *T. reesei* el hongo favorecido por estas fuentes de carbono (resultados no mostrados). Así también, Cortes-Tolalpa *et al.* (2017) resalta la importancia de la elección de la fuente carbonada debido a su efecto sobre el sinergismo enzimático de los cultivos mixtos. De esta

manera, las fuentes carbonadas en estudio deben cumplir tres objetivos: generar una tasa de crecimiento similar entre los hongos, capacidad de promover la producción de celulosas y ser perfectamente solubles en el medio para precisar el peso seco de la biomasa.

Por ello, se probó CMC como fuente de carbono alternativa a la lactosa del medio de producción estándar. Los resultados obtenidos mostraron menores coeficientes de adhesión y biomasa total de los cultivos simples y mixtos en el medio de producción con CMC 1 por ciento; así también, disminuyeron las barras de desviación estándar (variabilidad entre réplicas) en este medio (Figura 26). En cuanto a los análisis estadísticos, sólo existieron diferencias significativas en los cultivos mixtos y simples de *T. reesei* en el medio de producción con CMC 1 por ciento.

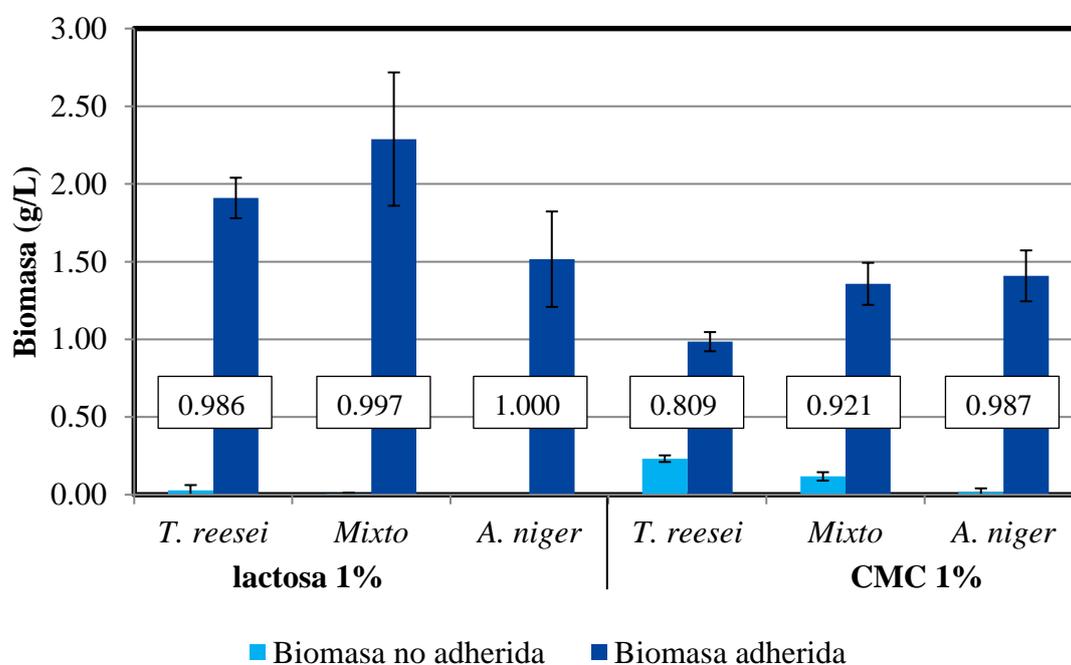


Figura 26. Efecto de la fuente de carbono (lactosa 1 por ciento vs. CMC 1 por ciento) del medio de producción sobre el crecimiento de biopelículas simples y mixtas de *T. reesei* QM6a y *A. niger*.

Condiciones de cultivo: 48 horas de cultivo en 2 etapas a 120 rpm en soporte de fibra de poliéster con 1.50 por ciento de inóculo total. En los recuadros blancos se incluyen las medias de los coeficientes de adhesión.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores. Tanto *T. reesei* (Dashtban *et al.*, 2011) como *A. niger* (Gautam *et al.*, 2010) presentan menor biomasa total (baja tasa de crecimiento) en CMC frente a otros sustratos. Sin embargo, Dashtban *et al.* (2011) también concluye que la producción enzimática no está relacionada directamente con el

crecimiento del micelio, sino con factores inductores complejos, pues a medida que la concentración del sustrato y la biomasa aumenta, no se observan cambios significativos en su producción, comparados con el uso de distintos sustratos o cepas.

Si bien los experimentos con la fuente de carbono CMC mostraron menores coeficientes de adherencia, la selección de esta variable dependerá de la actividad enzimática y sinérgica de los cultivos mixtos.

Las actividades cualitativas endoglucanasas ofrecieron una primera vista de la cantidad de enzimas secretadas al medio líquido. Como era de esperarse, la lactosa indujo la producción de celulasas en los cultivos simples de *T. reesei* mas no mostró mayores diferencias en los cultivos mixtos y simples de *A. niger*. En contraste con estos resultados, el medio con CMC 1 por ciento indujo la producción de altas cantidades de enzimas en los cultivos mixtos, mientras que los cultivos simples produjeron menos de la mitad (Figura 27), con lo cual nos encontramos frente al escenario deseado de sinergismo enzimático.

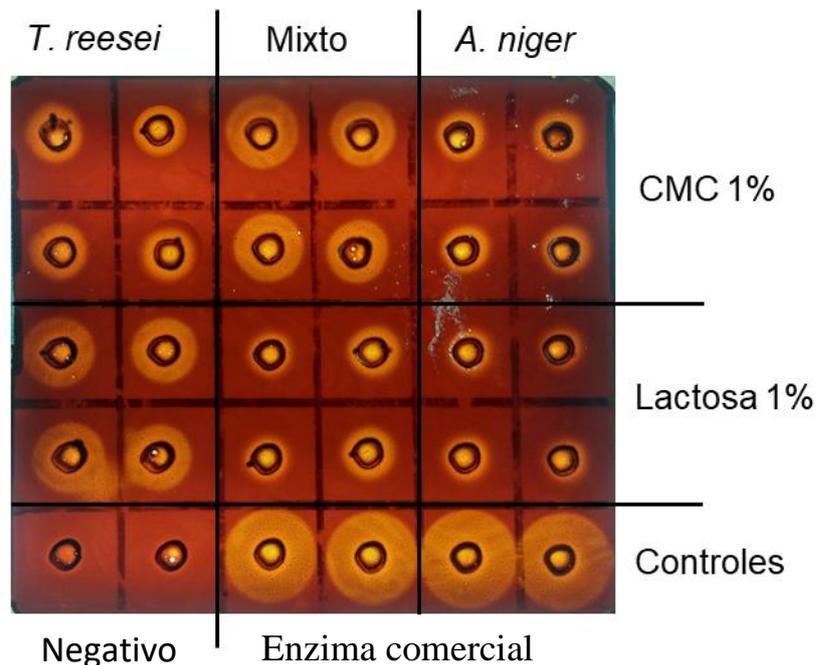


Figura 27. Actividad cualitativa endoglucanasa de las enzimas secretadas por biopelículas de *T. reesei*, mixtas y *A. niger* en medio de producción de celulasas con CMC 1 por ciento y lactosa 1 por ciento tras 24 horas de cultivo.

Existen dos estrategias para inducir la producción de celulasas: directa e indirectamente. Directamente, la expresión de la mayoría de celulasas es regulada por moléculas inductoras; tal es el caso de *T. reesei* que principalmente cuenta con cuatro inductores diferentes (D-xilosa, xilobiosa, soforosa y lactosa), mientras que *A. niger* solo con D-xilosa (de Souza *et al.*, 2011). La inducción de celulasas por lactosa aún no es del todo clara; sin embargo, la presencia de transportadores lactosa permeasa (Trire2:3405) (Ivanova *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013) y enzimas β -glucosidasas intracelulares (*cella* y *cellb*) son críticos para inducir la expresión génica de celulasas con este inductor en *T. reesei* (Xu *et al.*, 2014). Asimismo, *A. niger* presenta una lactosa permeasa putativa (*lac12/An12g09270*) que se induce por D-xilosa y se reprime por glucosa (de Souza *et al.*, 2011; Arnaud *et al.*, 2011), no obstante, su función aún no ha sido ampliamente estudiada, pero a nivel proteico y genético, muestra un gran parecido con la lactosa permeasa *lac12* de *Kluyveromyces lactis* que transporta lactosa para su hidrólisis intracelular (<https://www.uniprot.org/>, Arnaud *et al.*, 2011). Además, la secreción de enzimas β -galactosidasas (LacA, LacB, LacC y LacE) permiten la hidrólisis y transgalactosilación extracelular de la lactosa para su metabolismo (Niu *et al.*, 2017), aún no es claro el mecanismo de inducción con esta fuente carbonada.

Por otro lado, indirectamente, la “inducción” por residuos lignocelulósicos y polisacáridos como celulosa o CMC (derivado soluble de celulosa) se da a partir de la expresión secuencial de genes sensibles a la presencia de azúcares en el medio circundante. Es decir, el alivio de la represión CreA y la inanición de fuentes carbonadas de primer consumo, inducen genes celulolíticos extracelulares que a medida que actúan sobre el sustrato, liberan azúcares inductores de celulosas (Delmas *et al.*, 2012; van Munster *et al.*, 2014).

Para este trabajo, el efecto sinérgico sobre la actividad enzimática endoglucanasa se obtuvo en la inducción de CMC en el medio de producción tras 24 horas de cultivo.

En cuanto a la apariencia morfológica, el desprendimiento de biomasa adherida se percibió en el cultivo simple de *T. reesei* y esta es una característica que acompaña en menor proporción al cultivo mixto, además este último posee un núcleo compacto y fuertemente adherido al soporte, característica principal de *A. niger* en las biopelículas obtenidas (Figura 28).

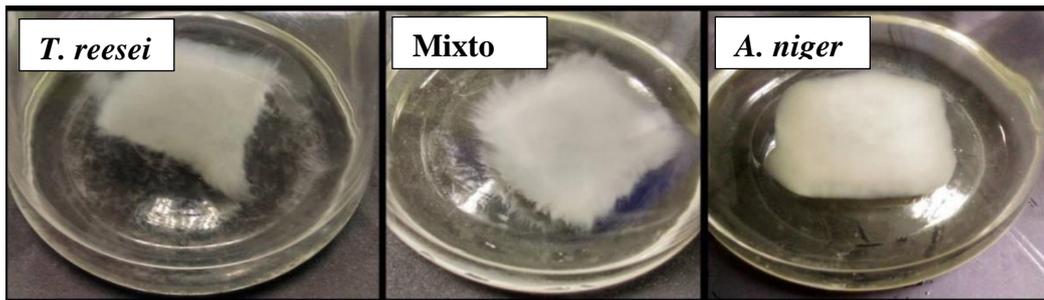


Figura 28. Biopelículas simples y mixta en medio de producción con CMC 1 por ciento.

Condiciones de cultivo: 24 horas de cultivo a 120 rpm en soporte de fibra de poliéster en cultivo 2 etapas con 1.50 por ciento de inóculo total. En los recuadros blancos se mencionan las especies de las biopelículas.

4.1.7. Resumen y consideraciones finales

El sistema de cultivo utilizado para la producción enzimática de celulasas se indica en la Tabla 6 para el estudio cinético de crecimiento y de producción de celulasas, así como para el análisis de expresión relativa de celulasas.

Tabla 6: Cuadro resumen del sistema óptimo de cultivo de biopelículas simples y mixtas.

Etapas	Variables	Óptimo
Pre-crecimiento	Hongos	<i>T. reesei</i> QM6a <i>A. niger</i> ATCC® 10864
	Concentración de inóculo	10 ⁶ esporas/mL
	Porcentaje de inóculo con respecto al medio de producción	1.50 por ciento (v/v) para biopelícula individual; 0.75 por ciento (v/v) de cada hongo para biopelícula mixta.
	Soporte	Fibra de poliéster, área de 0.27 cm ² /mL de medio de cultivo.
	Tiempo	24 horas
	Temperatura y velocidad	28°C, 175 rpm
	Medio de cultivo	Medio de pre-crecimiento con glucosa
	Lavado (cantidad: 1)	Tiempo
Temperatura y velocidad		28°C, 175 rpm
Solución de lavado		Matraz con 70 mL de agua destilada estéril
Producción de celulasas	Tiempo	24 horas (análisis de expresión) Rango entre 10-14 horas hasta las 62 horas (estudio cinético)
	Temperatura y velocidad	28°C, 120 rpm
	Medio de cultivo	Medio de producción de celulasas con CMC 1 por ciento.

FUENTE: Elaboración propia.

4.2. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y DE CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS MIXTAS Y SIMPLES

Debido al exceso de biomasa inicial en el pre-cultivo, experimentos previos con biopelículas de 72 horas en medio de producción de celulasas mostraron un sobre-crecimiento de esta por encima del medio de cultivo líquido, exponiendo la parte superior del micelio adherido y provocando la esporulación. Para evitar la interferencia de factores de estrés sobre el análisis comparativo entre el crecimiento y la producción enzimática, se consideró tomar puntos más cercanos entre 10 y 14 horas hasta obtener seis puntos temporales para realizar la cinética de crecimiento y de producción de celulasas de las biopelículas simples y mixta.

4.2.1. Cinética de crecimiento

A partir de las 62 horas de cultivo, las biopelículas mixtas y simples de *T. reesei* casi sobrepasaron el medio de cultivo, llegando a la capacidad límite del sistema y presentando dificultades en la agitación y aireación.

La cinética de crecimiento de las biopelículas simples de *T. reesei* (Figura 29) mostraron un aumento progresivo en la biomasa adherida sin alcanzar el estado estacionario hasta las 62 horas de cultivo en medio de producción; y a pesar de las características visuales de los cultivos en los últimos puntos de la cinética, la biomasa no adherida por efecto del desprendimiento del micelio fue menor a lo esperado. Esto podría deberse al atrapamiento del micelio desprendido por parte de la biopelícula formada mediante el movimiento orbital de la agitación, pues se observaron apéndices en los extremos de la biopelícula.

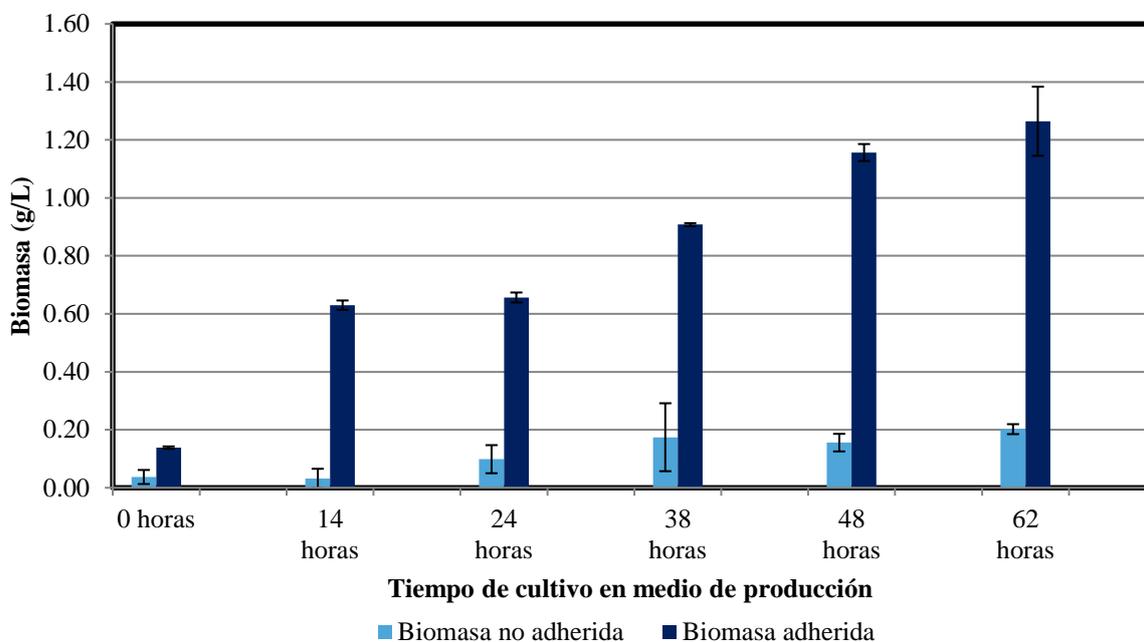
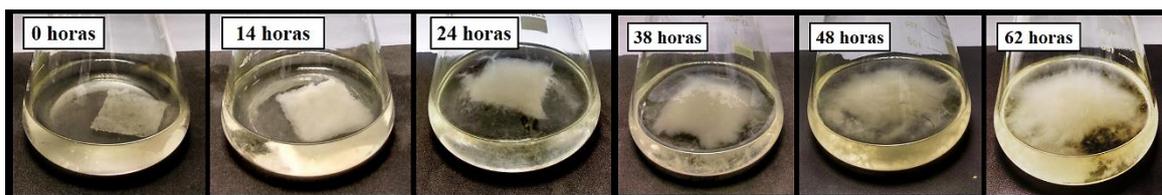


Figura 29. Cinética de crecimiento de biopelículas simples de *T. reesei* con el sistema óptimo de cultivo.

Condiciones de cultivo: en medio de producción con CMC 1 por ciento a 120 rpm en soporte de fibra de poliéster, en cultivo 2 etapas con 1.50 por ciento de inóculo total. En la parte superior se muestran fotografías de una réplica biológica de las biopelículas simples, y en la parte inferior, los promedios de los pesos secos de las biomazas adheridas y no adheridas por cada punto temporal.

La cinética de crecimiento de las biopelículas simples de *A. niger* (Figura 30) mostraron un aumento progresivo en la biomasa adherida hasta alcanzar el estado estacionario a partir de las 38 horas de cultivo en medio de producción. Entre las características visuales más resaltantes de sus cultivos se encuentran: el cambio en la coloración del medio de cultivo y la biopelícula, con lo cual se infiere la presencia de metabolitos secundarios; y la fuerte adhesión del micelio al soporte, debido a la ausencia de biomasa desprendida.

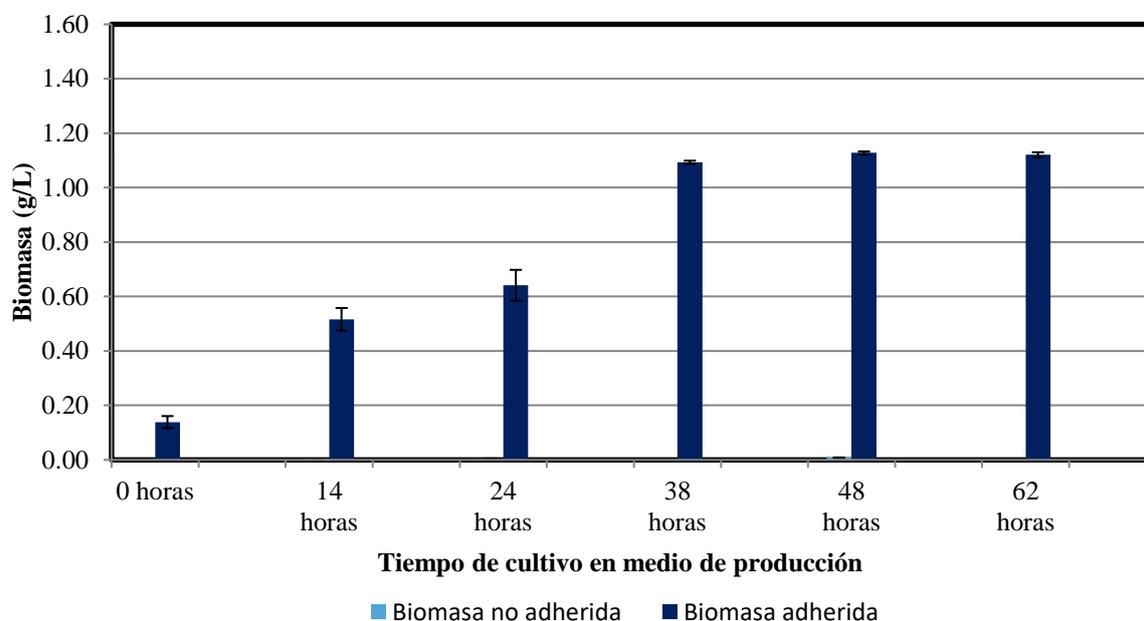
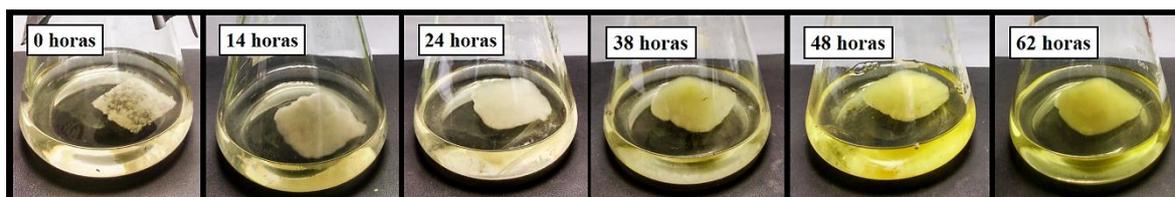


Figura 30. Cinética de crecimiento de biopelículas simples de *A. niger* con el sistema óptimo de cultivo.

Condiciones de cultivo: en medio de producción con CMC 1 por ciento a 120 rpm en soporte de fibra de poliéster, en cultivo 2 etapas con 1.50 por ciento de inóculo total. En la parte superior se muestran fotografías de una réplica biológica de las biopelículas simples, y en la parte inferior, los promedios de los pesos secos de las biomazas adheridas y no adheridas por cada punto temporal.

La cinética de crecimiento de las biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* (Figura 31) mostraron un aumento progresivo en la biomasa adherida hasta alcanzar el estado estacionario a partir de las 38 horas de cultivo en medio de producción, así también se observó una ligera disminución de biomasa total en el último punto temporal. Las características visuales que caben destacar son la coloración de la biopelícula y del medio de cultivo, pues coincidió con una tonalidad intermedia de ambos cultivos simples; conjuntamente, la baja cantidad de biomasa desprendida sugiere la fuerte cohesión de *A. niger* al soporte y el crecimiento superficial y ramificado de *T. reesei*.

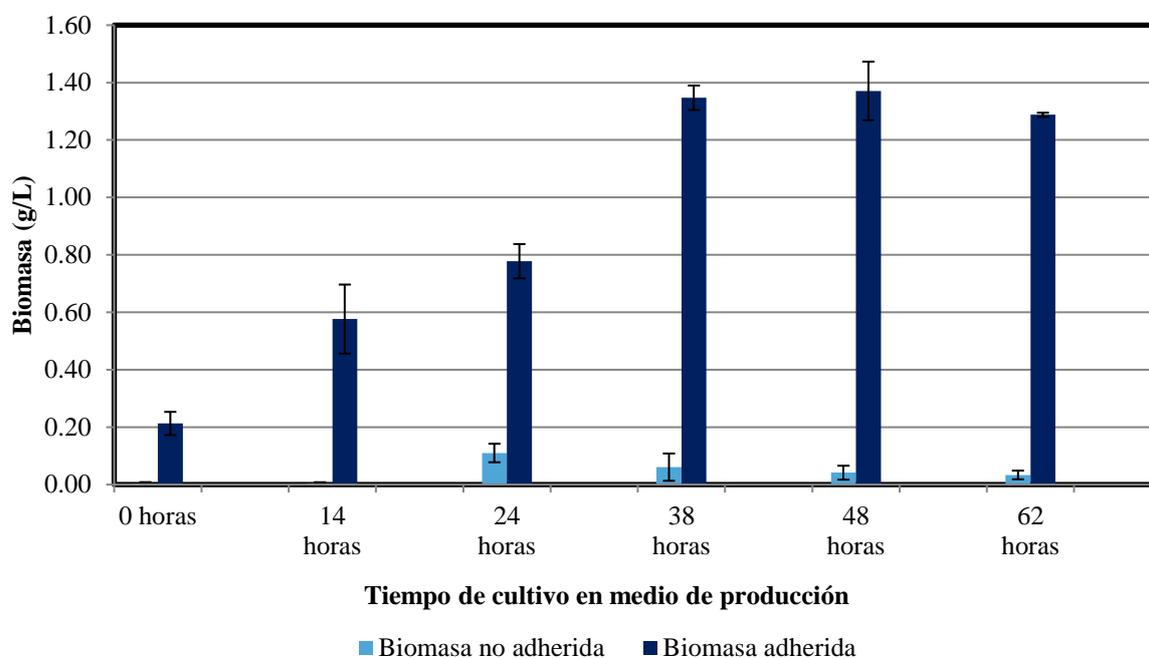
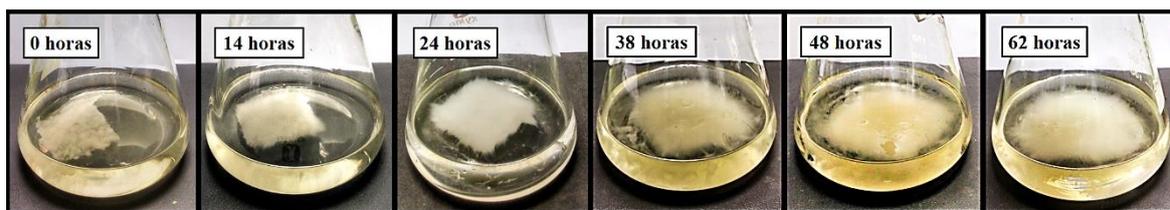


Figura 31. Cinética de crecimiento de biopelículas mixtas de *T. reesei* y *A. niger* con el sistema óptimo de cultivo.

Condiciones de cultivo: en medio de producción con CMC 1 por ciento a 120 rpm en soporte de fibra de poliéster, en cultivo 2 etapas con 1.50 por ciento de inóculo total. En la parte superior se muestran fotografías de una réplica biológica de las biopelículas simples, y en la parte inferior, los promedios de los pesos secos de las biomazas adheridas y no adheridas por cada punto temporal.

En resumen, las diferencias morfológicas visuales entre las biopelículas mixtas y simples durante la cinética de crecimiento se mantuvieron. Es decir, los cultivos simples de *A. niger* (Figura 30) presentaron una apariencia cohesiva a su soporte hasta el final de la cinética; mientras que *T. reesei* (Figura 29) creció ampliamente ramificada y desprendió biomasa de la biopelícula, así también, los cultivos mixtos permanecen en un estado intermedio de ambos (Figura 31).

Debido a la pigmentación amarilla evidenciada en los cultivos, se infiere la secreción de metabolitos secundarios, muchos de estos pigmentos están identificados en ambos hongos.

Para *A. niger* se reportan *riboflavin*, *flavasperone* (*asperxanthone*), *aurasperone A*, *aurasperone B*, *aurasperone C*, *asperenone* (*asperyellone*) y *asperrubrol*, *funalenone* y *naphtho- γ -pyrones*, algunos de ellos asociados a actividad antioxidante (Zaika & Smith, 1975; Frisvad *et al.*, 2018); y para *T. reesei*, los *sorbicillin*, *sorbicillinol* y *sorbicillinoids*, derivados de policétidos (PKS), con diferentes actividades biológicas según su estructura química, tales como antimicrobiana, antiviral, antioxidante y anticancerígeno (Li *et al.*, 2018).

Asimismo, cabe mencionar que esta pigmentación amarillenta fue más perceptible en los ensayos de confrontación entre cepas, pues se exhibió un halo amarillento en la zona de interacción de los hongos estudiados (Figura 32), lo cual sugiere una comunicación interespecífica a través de metabolitos secretados en esta zona.

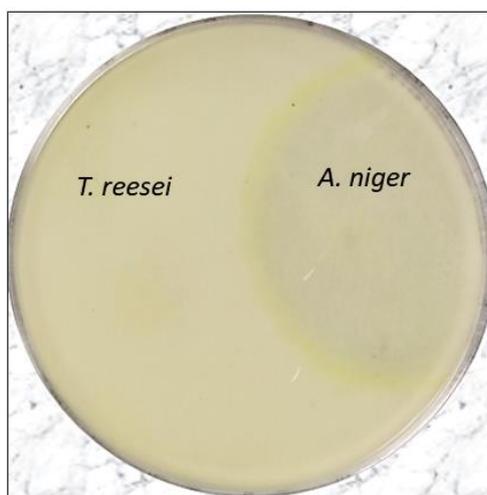


Figura 32. Vista del reverso de una placa dual del ensayo de confrontación entre cepas de *T. reesei* y *A. niger* en medio semi-sólido de producción de celulasas optimizado para la extracción de enzimas.

El diálogo molecular existente para la comunicación entre células de la misma especie y otros individuos es llamado *quorum sensing* (QS) e influye en la expresión génica de los individuos (Barriuso *et al.*, 2018). Este mecanismo QS regula procesos biológicos como la esporulación, producción de metabolitos secundarios, transición morfológica, secreción enzimática, factores de expresión de virulencia, crecimiento y formación de biopelículas, entre otros (Cottier & Mühlischlegel, 2012; Barriuso *et al.*, 2018).

Estos compuestos (*quorum sensing molecules*, QSM) han sido ampliamente estudiados en *Candida albicans* y están relacionados directamente con la densidad celular. Además, deben

cumplir los siguientes requisitos basados en el modelo bacteriano: ser acumulables en el ambiente extracelular, ser acumulables en una concentración proporcional a la densidad celular, inducir una respuesta coordinada, reproducir el fenotipo QS al ser agregado al cultivo exógenamente y no ser solo un subproducto del catabolismo (Albuquerque & Casavedal, 2012).

No obstante, el conocimiento molecular, ecológico y fisiológico aún es escaso en hongos y hasta la fecha solo se han aislado pocas moléculas que cumplen los criterios antes mencionados; por ejemplo, el farnesol y tirosol para *C. albicans*, el CO₂ para la germinación de los conidióforos de *A. niger* (Padder *et al.*, 2018); 1-octen-3-ol, 3-octanol y 3-octanona para la conidiación de *Trichoderma*, y a altas concentraciones junto con 6-pentil- α -pirona como fungistáticos y fungicidas (Cottier & Mühlischlegel, 2012). Así también, la relación entre este diálogo y la producción enzimática aún está siendo estudiada; sin embargo, se ha demostrado que la adición de farnesol en cultivos de *Penicillium decumbens* promueve el cambio de su morfología y una mayor producción de celulasas (Guo *et al.*, 2011).

Los metabolitos secundarios son un grupo grande de compuestos de bajo peso molecular los cuales incluyen antimicrobianos, antioxidantes, pigmentos, hormonas y quelantes de metal (Frisvad *et al.*, 2018); dentro de los cuales, se han identificado, en hongos, compuestos QSM por participar en la comunicación inter- e intra-específica. y pertenecen a las familias de péptidos, terpenos, alcoholes, lactonas, lípidos, acetaldehídos y algunos compuestos volátiles (Barriuso *et al.*, 2018; Padder *et al.*, 2018).

Entre los principales metabolitos secundarios tenemos a diferentes clases biosintéticas tales como los policétidos (PKs), péptidos no ribosómicos, terpenos, compuestos derivados del ácido shikimico y compuestos híbridos de estas clases. De esta manera, se describen 78 y 27 grupos de genes para su biosíntesis por *A. niger* y *T. reesei*, respectivamente (Frisvad *et al.*, 2018). Dentro de los cuales se refieren muchos metabolitos que funcionan como micotoxinas, pero entre los de interés dentro de interacciones microbianas tenemos a la ocratoxina A de *A. niger*, que induce el estrés oxidativo, apoptosis celular y necrosis; y las paracelsinas de *T. reesei*, que tiene actividad antimicrobiana.

4.2.2. Cinética de producción de celulosas

Con el propósito de comparar la actividad enzimática entre las biopelículas mixtas y simples y correlacionarlas con su crecimiento durante la cinética, se determinó la actividad cualitativamente la actividad endoglucanasa y β -glucosidasa en cada punto temporal estudiado con anterioridad.

Entre los resultados obtenidos, podemos resaltar que la secreción de enzimas endoglucanasas en los cultivos simples de *T. reesei* se evidenció recién tras 24 horas de cultivo, mientras que los cultivos mixtos y simples de *A. niger* presentaron respuestas más inmediatas al medio de producción (Figura 33). Además, si bien el sinergismo observado durante la estandarización de la biopelícula mixta se mantuvo tras 24 horas de cultivo, desde las 38 horas en adelante, los halos de hidrólisis de las biopelículas mixtas y simples se asemejaron entre ellas.

Las actividades cualitativas β -glucosidasas (Figura 34) de los cultivos simples se observaron según lo esperado: las biopelículas de *A. niger* incrementaron su producción enzimática a lo largo de la cinética, mientras que las de *T. reesei* evidenciaron baja actividad de estas enzimas y tendieron a disminuir. Es preciso resaltar que las biopelículas mixtas secretaron enzimas β -glucosidasas desde las 24 horas y aumentaron a lo largo de la cinética, aunque estos no alcanzaron los niveles de los cultivos simples de *A. niger*.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gautam *et al.* (2010), según lo cual la actividad enzimática FPA, CMCasa y β -glucosidasa de *A. niger* en medio con CMC pueden alcanzar niveles próximos a la inducción con celulosa; contrariamente, *T. reesei* QM6a muestra una menor actividad que la reportada con otras fuentes de carbono como D-lactosa y celulosa (Dashtban *et al.*, 2011).

Tanto Ahamed y Vermette (2008) como Gutiérrez-Correa y Villena (2012), reportaron, tras 72 horas de cultivo, más del doble de actividades enzimáticas FPA y CMCasa en cultivos mixtos de las especies estudiadas con respecto a sus monocultivos; esto se explica porque los medios de producción utilizados fueron suplementados con celulosa, lactosa o ácido lactobiónico, y/o por las cepas usadas. En contraste, la actividad enzimática en el cultivo mixto obtenido en el presente estudio, no superó la actividad de sus monocultivos después de las 24 horas de cultivo; sin embargo, como se discutió anteriormente, los períodos tempranos de interacción entre las cepas sugieren la presencia de sinergismo en el cultivo

por la producción enzimática y secreción de metabolitos secundarios, situación que debe estudiarse para dilucidar el tipo de interacción entre las cepas.

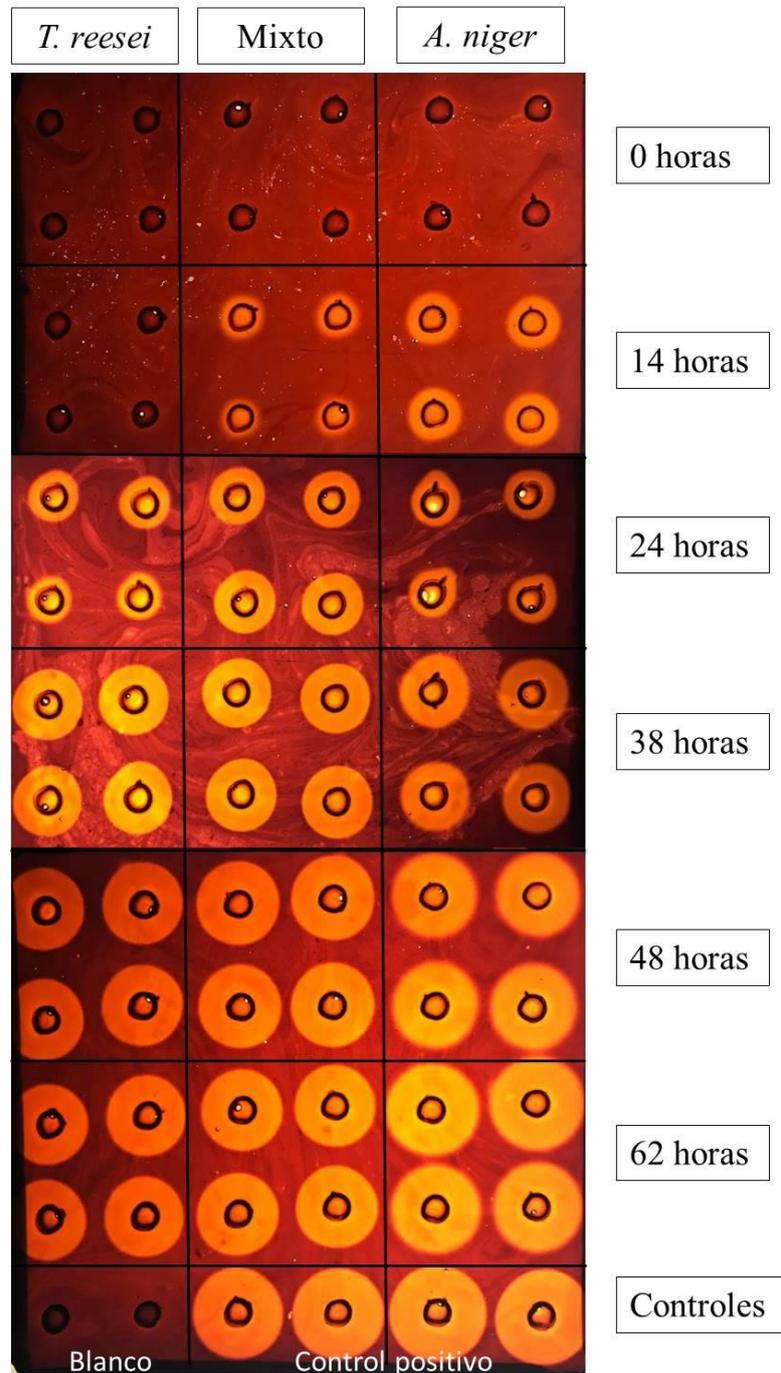


Figura 33. Cinética cualitativa de producción de endoglucanasas de biopelículas simples de *T. reesei*, *A. niger* y mixta.

En los recuadros blancos se muestran las horas de producción y especies utilizadas en el cultivo de la biopelícula. Blanco: *Buffer* acetato. Control positivo: Diluciones de enzima comercial.

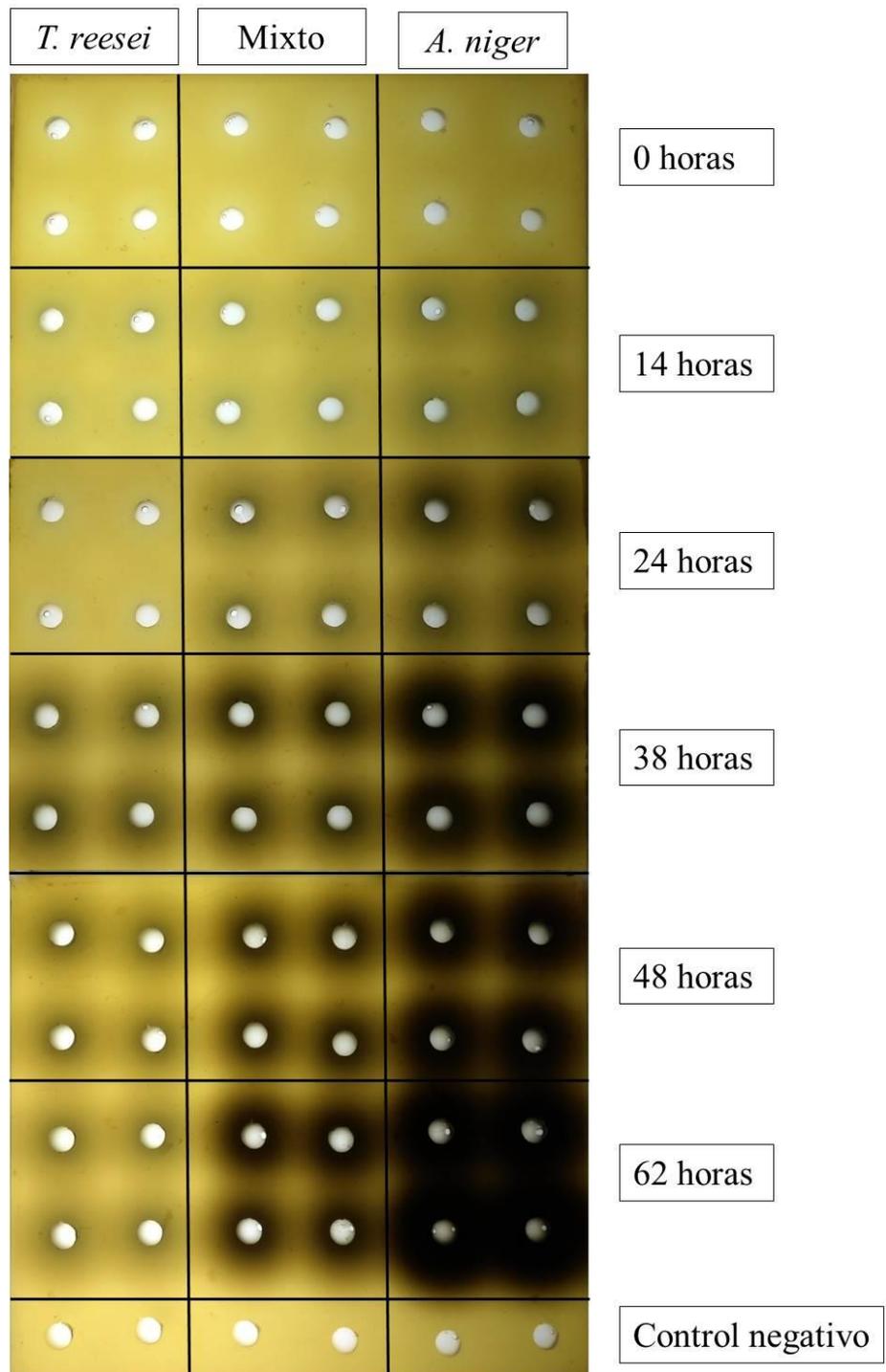


Figura 34. Cinética cualitativa de producción de β -glucosidasas de biopelículas simples de *T. reesei*, *A. niger* y mixta.

En los recuadros blancos se muestran las horas de producción y especies utilizadas en el cultivo de la biopelícula. Control negativo: *Buffer* acetato.

En adición, se determinaron las actividades cuantitativas tras 24 horas de cultivo en medio de producción, punto temporal en el que se observó el sinergismo enzimático (ver Tabla 7). Como se muestra, los parámetros de productividad se calcularon con base en la actividad endoglucanasa, puesto que la actividad enzimática de celulasas totales (FPA) no alcanzó el límite de detección del método utilizado. Efectivamente, las actividades específicas con respecto a proteína ($Y_{E/Pr}$) y a biomasa ($Y_{E/x}$) mostraron la superioridad de la biopelícula mixta sobre sus cultivos simples, así también, las productividades volumétricas específicas (Γ_E) y de biomasa ($\Gamma_{E/x}$) de las biopelículas mixtas tuvieron valores significativamente mayores a *T. reesei* y menor variabilidad entre sus réplicas.

Tabla 7: Comparación de parámetros de productividad para producción de endoglucanasas en biopelículas de *T. reesei*, mixto y *A. niger* tras 24 horas de cultivo.

Biopelículas	Proteínas totales (g/L)	Actividad endoglucanasa U/L	$Y_{E/Pr}$ (U/g proteína)	$Y_{E/x}$ (U/g biomasa)	Γ_E (U/L.h)	$\Gamma_{E/x}$ (U/g biomasa.h)
<i>T. reesei</i>	0.52 ± 0.33	0.12 ± 0.17	0.16 ± 0.23	0.18 ± 0.26	0.005 ± 0.007	0.008 ± 0.011
Mixto	0.46 ± 0.15	84.50 ± 0.14	193.40 ± 63.10	108.61 ± 0.18	3.521 ± 0.006	4.526 ± 0.008
<i>A. niger</i>	0.46 ± 0.11	73.88 ± 11.28	161.71 ± 12.50	83.66 ± 12.77	3.078 ± 0.470	3.486 ± 0.532

Los parámetros de productividad mostrados son el promedio de dos cultivos independientes con tres réplicas biológicas por cada tratamiento ± Desviación estándar.

Estos resultados coinciden con la tendencia observada por Villena (2002) en la actividad endoglucanasa de biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei*. En esta tendencia, los monocultivos presentan menor actividad endoglucanasa y de celulasas totales que los cultivos mixtos; además, de modo contrario a nuestros hallazgos, el sinergismo observado permaneció hasta las 120 horas. Según los hallazgos de Villena (2002), infirió que el sinergismo no está influenciado por la actividad β -glucosidasa (complementaridad de

actividades enzimáticas) y biomasa producida, sino que se relaciona a la compatibilidad entre especies.

Sin embargo, en biopelículas mixtas de *T. reesei* y *A. phoenicis*, Xiros y Studer (2017) reportan mejoras principalmente en actividades específicas de celulasas totales y β -glucosidasas; así también, Ahamed y Vermette (2008) y Zhao *et al.* (2018) reportan para cultivos mixtos sumergidos de *A. niger* y *T. reesei*, mejoras en actividades específicas de β -glucosidasas. Por ello, es importante dilucidar el rol de las β -glucosidasas dentro de los cultivos mixtos.

4.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE CELULASAS Y SUS REGULADORES MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR)

Con el propósito de explicar a nivel genético las respuestas observadas en la actividad enzimática, se seleccionaron los genes de celulasas a estudiar mediante alineamientos múltiples y se diseñaron cebadores específicos para cada hongo para su posterior uso en el análisis de expresión génica mediante qPCR. Este análisis nos ayuda a la formulación de nuevas hipótesis sobre la interacción de los hongos, puesto que, según lo revisado anteriormente, existe una relación estrecha entre la producción enzimática y la comunicación inter- e intra- específica debido a que las moléculas involucradas en este diálogo molecular generan respuestas a nivel génico.

4.3.1. Diseño de cebadores especie-específicos

Se seleccionaron los genes principales por cada función celulolítica de cada hongo. Es decir: 2 celobiohidrolasas, 3 endoglucanasas, 2 β -glucosidasas y 2 reguladores; así también 2 genes de referencia para la normalización. De estos genes, se diseñaron hasta tres pares de cebadores y se analizaron las curvas de disociación en qPCR con ADNc molde de *T. reesei*, *A. niger* y mixto; además, para disminuir la amplificación de secuencias inespecíficas de algunos cebadores diseñados, se optimizó la temperatura de alineamiento, según los parámetros recomendados en la metodología.

Para determinar que la secuencia amplificada sea la del gen de interés, se observaron las curvas de fusión. Cada amplicón se representa por un solo pico en dicha curva (Anexo 24) e indica una temperatura de fusión (T_m) única para cada amplicón.

Diez de los cebadores diseñados solo amplificaron en su secuencia diana, es decir, la secuencia amplificada solo tuvo una T_m en el mismo hongo y mixto; mientras que, los seis restantes amplificaron de modo cruzado, esto debido a la alta conservación de estos genes entre los hongos en estudio. Para estos seis casos con amplificación en ambos hongos, se consideraron secuencias distintas a aquellas con una diferencia de T_m mayor a 1°C , y se comprobaron en gel de agarosa la diferencia de bandas (Anexo 25 y 26) y el C_T al cual amplifica.

La Tabla 8 muestra los cebadores que resultaron específicos de acuerdo a las curvas de fusión de la Tabla 9 y la comprobación en gel de agarosa (Anexo 25 y 26).

Tabla 8: Secuencias de los cebadores de genes seleccionados para *A. niger* y *T. reesei*.

Especie	Gen	Secuencia de cebadores 5'→3'	Tamaño de amplicón (pb)	Proteína	T _{ann} (°C)
<i>A. niger</i>	<i>cbhB</i>	F: AGTGGATCTTCTTCGGGGT R: CTGGTGGTCGAGGTAGTCTT	95	Celobiohidrolasa B	60
	<i>eglA</i>	F: TCAACTCATA CAGTGGGACATCA R: TACTGAGAGCTGGCGGGAA	79	Endoglucanasa A	60
	<i>eglB</i>	F: CTGCTGCTACCTCCACTG R: GAGGAAGAAGAGGAAGAGGCAATC	97	Endoglucanasa B	60
	<i>bglA</i>	F: AGTGGAGCACA ACTCTGAC R: GCAAACACCATCTTGGGATAC	94	β-glucosidasa A	60
	<i>bglB</i>	F: GAGGTCTGGATCACTGAGA R: CCTCATCCCAGAAA GTCTTAGC	97	β-glucosidasa B	60
	<i>creA</i>	F: ATTTGCCGTCTATCCGTCAT R: GAAGGACTGTAGTAGTTGGGC	94	Represor de catabolito carbono	60
	<i>xlnR</i>	F: AGCGGCAGAAATCTTGGAGTAC R: CGCCAGTAACAGCAAGAACTG	97	Activador transcripcional	60
	<i>sarA</i>	F: GCTGTTGACTTTATTGTTGCCA R: TGC GTTTAAGAGGGAGATCGTC	89	small GTP-binding protein	60
<i>T. reesei</i>	<i>cbh1</i>	F: CGGCGGTATTGGCTACAG R: TTACAGGCACTGAGAGTAGT	88	Celobiohidrolasa I	65
	<i>egl1</i>	F: CTCCAAGACCTTCACCATCATC R: GTACTTGCGGGTGATGCTCA	85	Endoglucanasa I	65
	<i>egl3</i>	F: CCAGAACTCTCAGATTGCCATTCC R: CGGTGAACAAGTCATACGCAACA	128	Endoglucanasa III	60
	<i>bgl1</i>	F: ACTTCGACGACGCCAATATC R: TCGCAGGACCAGACTTGG	114	β-glucosidasa I	65
	<i>bgl2</i>	F: TGGTGTGGATCAGCAAGAGGT R: CTTGACCCTGAAGTCATCTTCGAG	122	β-glucosidasa II	65
	<i>cre1</i>	F: GCTTTCTTCGTACCACATGGCGA R: TCTTGGCGTGCCTCAAGCTG	80	Represor de catabolito carbono	65
	<i>xyl1</i>	F: GAAGCGTCCTTCTTGACGAGC R: AGTCTTGGGAGACGGGCTGT	126	Activador transcripcional	60
	<i>sar1</i>	F: ACGTCTTGTCGTCTTGGGT R: CTCCTCAGAAGTAGGGTGGAG	149	small GTP-binding protein	60

T_{ann}: Temperatura de alineamiento en °C.

Tabla 9: Temperaturas de fusión (Tm) de cebadores especie-específico con tres ADNc.

Especie	Gen	ADNc		
		<i>A. niger</i>	Mixto	<i>T. reesei</i>
<i>A. niger</i>	<i>cbhB</i>	82.5	83	-----
	<i>eglA</i>	79	79	86.5
	<i>eglB</i>	83.5	83.5	-----
	<i>bglA</i>	82	82	-----
	<i>bglB</i>	84	84	74.5
	<i>creA</i>	82.5	82.5	-----
	<i>xlnR</i>	81	81	77
	<i>sarA</i>	77.5	77.5	-----
<i>T. reesei</i>	<i>cbh1</i>	85	84	84
	<i>egl1</i>	-----	82.5	82.5
	<i>egl3</i>	-----	81	81
	<i>bgl1</i>	-----	83	83
	<i>bgl2</i>	-----	83.5	83.5
	<i>cre1</i>	-----	81.5	81.5
	<i>xyl1</i>	85.5	86	86
	<i>sar1</i>	78.5	84	84

Estos cebadores se consideraron específicos pues se alinean a las secuencias dianas para las cuales fueron diseñadas, de esta manera, las Tm obtenidas mediante la amplificación del ADNc molde del microorganismo individual con sus respectivos cebadores se repiten en las obtenidas con ADNc molde mixto.

El siguiente punto importante para el análisis de expresión, fue determinar la eficiencia de los cebadores, ya que estos se usan directamente en el modelo matemático de Pfaffl. En teoría, si en cada ciclo de amplificación se duplica el ADN molde, la eficiencia debería ser de 100 por ciento; sin embargo, los factores como calidad del ADN molde, el diseño de cebadores, la pericia del analista y variación entre sesiones de placas de PCR, afectan a este valor. Por ello, el cálculo de eficiencias de estos cebadores se realizó por cada reacción de PCR para el análisis de la expresión relativa, como se mencionó en la metodología, y se

utilizó el *software* LinRegPCR, que gracias a su algoritmo determina el C_T al cual el incremento de la fluorescencia fue significativo. Las eficiencias obtenidas experimentalmente se encuentran en su mayoría en el rango de 80 y 95 por ciento (Anexo 27). Los valores aceptables de eficiencia se encuentran entre 90 y 100 por ciento y trabajar con valores por debajo de este rango subestima las proporciones *Fold Change* obtenidas con el modelo de Pfaffl (Svec *et al.*, 2015); por ello, si bien los resultados *Fold Change* de los lotes estudiados no coinciden en valores, estos resultados son válidos e informativos para observar tendencias en el análisis de expresión génica y constituyen un estudio preliminar para investigaciones transcriptómicas con el uso ARNseq.

4.3.2. Análisis de expresión relativa de celulasas y sus reguladores

Las proporciones de expresión relativa fueron calculadas con respecto a sus monocultivos y posteriormente corregidas con el logaritmo en base 2 para su mejor visualización y discusión.

Si bien las desviaciones en las proporciones *Fold Change* de los lotes estudiados son altos (Anexo 28), ambos lotes evidencian una misma tendencia entre los genes sobreexpresados y subexpresados (Figura 35). Así también, una posible explicación de estas desviaciones son las fluctuaciones sobre la cantidad de ARNm sujetas a las interacciones microbianas, pues no son constantes y dependen tanto de la densidad celular como los metabolitos secretados al medio de cultivo.

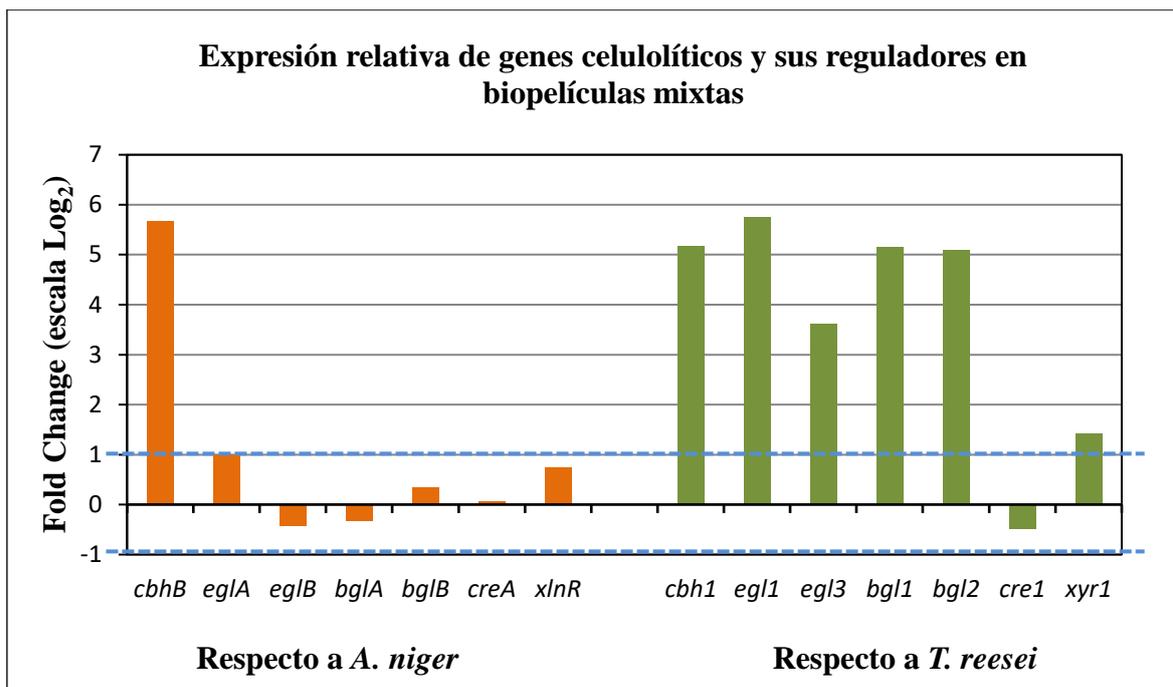


Figura 35. Análisis de expresión relativa de genes de celulasas y reguladores en biopelículas mixtas respecto a sus biopelículas simples del primer lote de cultivo.

Los *fold change* escala Log₂ representan cuántas veces más o menos (proporciones) se expresa cada gen con respecto a la muestra control, normalizados por el gen *sar1* para *T. reesei* y *sarA* para *A. niger*. Color anaranjado: genes de *A. niger*. Color verde: genes de *T. reesei*. Cambio en la expresión: Log₂ (Fold Change) >1 o < -1.

Con respecto a los reguladores, según lo esperado, dado que el medio de producción no incluyó fuentes carbonadas de rápido consumo, los represores *creA* y *cre1* no fueron afectados bajo las condiciones de cultivo ensayadas. Además, la ligera sobreexpresión de los activadores *xlnR* y *xyr1* se relacionó con la temprana inducción en la producción enzimática de celulasas por productos de la hidrólisis del CMC.

Los genes celulolíticos de *A. niger* estudiados en la biopelícula mixta no mostraron grandes diferencias con excepción de la celobiohidrolasa B y endoglucanasa A; por el contrario, todos los genes celulolíticos de *T. reesei* estudiados sí mostraron una sobreexpresión, dicho de otro modo, las actividades enzimáticas cualitativas a las 24 horas se deben en su mayoría a la acción de *T. reesei*.

Los más resaltantes dentro de estos genes sobreexpresados en *T. reesei*, fueron los genes pertenecientes a las β-glucosidasas, este resultado junto con la baja expresión de sus homólogos en *A. niger* sugieren que la actividad observada en los ensayos cualitativos β-glucosidasas no corresponden solo a la acción de las enzimas de *A. niger*. Es decir, este

sistema fermentativo a las 24 horas en el medio de producción no presenta la complementariedad de las funciones enzimáticas de ambos hongos, si no, que el sinergismo observado ocurre a través de la interacción física y comunicación de ambos hongos, en la cual, la presencia de *A. niger* promueve la mayor expresión de celulasas en *T. reesei*.

Desde el descubrimiento y aislamiento de cepas de *T. reesei* para la producción enzimática, se ha buscado optimizar sus procesos celulolíticos; en primer lugar mediante la mutación de cepas silvestres para la obtención de cepas hiperproductoras, luego mediante la combinación con otros microorganismos en cultivos mixtos (ver apartado 2.3.1.) y el desarrollo de recombinantes.

Los recientes estudios de cultivos mixtos contemplan investigaciones sobre las interacciones entre individuos, pues afectan a la producción de enzimas y de metabolitos secundarios; esto es debido a que son grupos de genes estrechamente ligados por sus mecanismos de regulación (García-Estrada *et al.*, 2018; Rodríguez-Iglesias & Schmoll, 2019).

Daly *et al.* (2017) sostienen que la interacción entre los hongos estudiados es antagonista, pues al comparar los genes expresados diferencialmente en cultivos mixtos con respecto a sus monocultivos, muestran una abundancia incrementada en genes de respuesta a estímulos xenobióticos en *T. reesei*. Estos genes de respuesta tiene un dominio pfam para la proteína parecida a RTA1 que se encuentra unida a la membrana para detoxificar componentes liberados presumiblemente por la degradación de lignocelulosa y/o secretados por parte de *A. niger*. Esta producción de componentes tóxicos, así como el limitado incremento de los transcritos CAZy y la actividad enzimática en cultivos mixtos es una característica prominente de las interacciones competitivas o antagónicas en hongos. Sin embargo, también se señala que en las relaciones antagonistas con contacto físico, la actividad enzimática puede variar en las zonas de interacción de hongos. Tanto Boddy (2016) y Šnajdr *et al.* (2011) indican que la producción de especies reactivas de oxígeno, fenoloxidasas y, algunas veces, β -glucosidasa aumentan a lo largo del micelio, mientras que las lacasas y las peroxidasas dependientes de manganeso aumentan en las zonas de contacto entre las especies lignocelulolíticas.

Por ello, si bien los resultados de expresión génica a las 24 horas mostraron genes sobreexpresados y concordantes con una mayor actividad en cultivos mixtos, a lo largo de la cinética enzimática y de crecimiento no se observaron mejoras, en términos de actividad

enzmática, del cultivo mixto frente a sus cultivos simples. Todo ello indica un comportamiento antagónico como lo anteriormente mencionado por los autores.

Del mismo modo, Romero-Cortes *et al.* (2019) señalan efectos antagónicos de *Trichoderma asperellum* frente a cepas de *A. niger*, pues las zonas de interacción de estos hongos presentan deformaciones morfológicas y lisis de micelio, debido a la estrategia micoparasitaria de *T. asperellum* mediante la secreción de enzimas hidrolíticas como quitinasas y β -1,3-glucanasas que degradan los componentes de la pared celular.

El género *Trichoderma* es caracterizado por sus especies micoparasitarias, dentro de las cuales la especie estudiada, *T. reesei*, contiene 20 genes de quitinasas en su genoma. La cantidad de estos genes es el menor dentro del género y es debido al cambio en su estilo de vida de micoparasitismo a saprófito (Seidl-Seiboth *et al.* 2014); es decir, *T. reesei* carece o no utiliza estrategias de micoparasitismo en sus interrelaciones, lo cual concuerda con los resultados de los ensayos de confrontación entre cepas, pues no se evidenció deformaciones en el crecimiento de las colonias. Por otro lado, aún no se establece la naturaleza y función de los metabolitos secundarios visualizados como pigmentos amarillentos, para lo cual se precisan estudios del metaboloma del sistema mixto.

Así también, Daly *et al.* (2017) reportan que los genes de quitinasas de *T. reesei* están apenas expresados en cultivos mixtos y sugiere que la relación antagonista no es directa; si no mediante otras enzimas activas de la pared celular fúngica, las cuales hidrolizan paredes celulares del otro hongo con preferencia a las propias, y a su vez, *A. niger* presenta respuestas directas al antagonismo de *T. reesei*, lo que se percibe en la disminución de su biomasa y la activación genes modificadores de la pared celular. Este hecho es difícil de precisar dentro de los resultados obtenidos, pues si bien se pudo demostrar la presencia de ambos hongos en la biopelícula mixta y que existieron diferencias en la expresión de genes celulolíticos, no se determinó la cantidad de biomasa perteneciente a cada individuo. Empero, la biomasa a lo largo de la cinética de crecimiento de las biopelículas mixtas fue mayor a sus cultivos individuales, por lo que se pueden inferir dos escenarios: el crecimiento de ambos hongos o el sobrecrecimiento de un hongo sobre otro debido a la competencia por el sustrato y el soporte.

Los resultados obtenidos de expresión podrán ser analizados al complementar la información desconocida de los otros transcritos, así pues, el análisis completo del transcriptoma mediante el secuenciamiento del ARN (ARN-seq) podrá determinar con mayor precisión los

niveles de expresión de una condición y sus isoformas, y por consiguiente evaluar los distintos genes involucrados en la sinergia enzimática, comunicación interespecífica y adhesión de la biopelícula mixta.

Por último, el estudio de los cultivos mixtos es importante para determinar las interacciones microbianas existentes, descubrir y optimizar la producción de metabolitos secundarios de interés (Bertrand *et al.*, 2014). Se han reportado vías biosintéticas solo expresadas en cultivos mixtos y por ende, silenciadas en monocultivos (Chatterjee *et al.*, 2016), estos metabolitos son considerados de interacción-específica y su origen aún es desconocido. Sin embargo, como se discutió a lo largo de este trabajo, existen muchas variables que afectan a su cultivo para la producción industrial. Para este caso en particular, la producción enzimática se vería modificada por fluctuaciones en el crecimiento de estos hongos, además de las respuestas a distintas moléculas secretadas para el diálogo inter- e intra- específico. Por ello, identificar estas moléculas de respuesta y genes responsables de inducir la expresión de sinergismo en *T. reesei* podría ser valioso para la optimización de procesos industriales o programas de mejoramiento.

V. CONCLUSIONES

Las distintas variables evaluadas (velocidad de agitación, compatibilidad entre cepas, soporte para la adhesión, pre-crecimiento de la biopelícula, porcentaje de inóculo y fuente de carbono) influyeron significativamente en la formación de biopelículas y su modificación permitió desarrollar un sistema óptimo de cultivo para biopelículas mixtas conformadas por *Trichoderma reesei* QM6a y *A. niger* ATCC® 10864. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el potencial de este sistema de cultivo para la producción de metabolitos de interés industrial.

El análisis de la cinética de producción de endoglucanasas revela la existencia de un sinergismo enzimático en la biopelícula mixta de *T. reesei* QM6a y *A. niger* ATCC® 10864 tras 24 horas de cultivo en presencia de CMC, con respecto a los cultivos simples de cada hongo. A nivel de productividad enzimática y bajo las mismas condiciones, esta sinergia es significativa solamente con respecto a la biopelícula simple de *T. reesei*.

El análisis de la cinética de producción de β -glucosidasas sugiere que el sinergismo observado en términos de actividad endoglucanasa tras 24 horas de cultivo en presencia de CMC, no se debe a una complementariedad enzimática, es decir, al aporte enzimático por parte de *A. niger*, sino que obedece a otro mecanismo.

Los resultados de la amplificación por qPCR de genes de celulasas, sus reguladores y genes *housekeeping* a partir de ADN de biopelículas fúngicas mixtas, demostraron que los cebadores diseñados específicamente para *T. reesei* QM6a y *A. niger* ATCC® 10864 son una herramienta útil para la identificación y cuantificación de la expresión de genes de celulasas en sistemas mixtos de cultivo.

El análisis de expresión génica de biopelículas mixtas de *T. reesei* QM6a y *A. niger* ATCC® 10864, utilizando cebadores específicos, evidencia mayores cambios en el perfil de expresión de genes de celulasas y sus reguladores de *T. reesei*, en comparación con las respectivas condiciones de referencia (cultivos simples), que en el perfil de *A. niger*. Esta

respuesta está en consonancia con la mayor productividad enzimática mostrada por las biopelículas mixtas con respecto a las biopelículas simples de *T. reesei*.

Los resultados del análisis de expresión génica confirman que la actividad β -glucosidasa observada en las biopelículas mixtas de *T. reesei* QM6a y *A. niger* ATCC® 10864 se debe al aporte de *T. reesei* y no de *A. niger*, y descartan que el sinergismo sea consecuencia de una complementariedad de funciones enzimáticas. Esto indica que el diálogo molecular establecido entre ambos hongos, promueve la producción de celulasas en *T. reesei*.

VI. RECOMENDACIONES

Un sistema de cultivo mixto óptimo para producción de enzimas depende de muchas más variables que las evaluadas en este trabajo. Por ello, es recomendable realizar la optimización de estos cultivos mediante diseños experimentales como la metodología de superficies de respuesta, lo cual aportaría, además, nuevos conocimientos acerca de los mecanismos implicados en las interacciones microbianas que dan lugar a una mayor producción de metabolitos de interés.

La cuantificación de la proporción de biomasa de cada hongo en la biopelícula mixta mediante qPCR aportará un mayor entendimiento del proceso de interacción y de producción enzimática.

El uso de sondas de hidrólisis (TaqMan) en lugar de SYBR Green tanto para la cuantificación de biomasa específica en biopelículas mixtas como para el análisis de expresión génica mediante qPCR mejorará no solo la especificidad, sino permitirá analizar más genes que, debido a su alta conservación, no se lograron discriminar entre sí en los hongos estudiados.

El análisis del transcriptoma global mediante RNA-Seq permitirá identificar qué genes y rutas metabólicas están implicados en la promoción de producción de enzimas en las biopelículas mixtas. Entender a nivel molecular qué factores intervienen en el sinergismo observado será fundamental para la optimización de bioprocesos.

La identificación de los metabolitos secundarios secretados durante la interacción entre ambos hongos también contribuiría con un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares que dan lugar a una mayor producción de enzimas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Albuquerque, P., & Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi – a review. *Medical Mycology*, 50(4), 337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>

Aguilera, P., Ruiz-Tachiquín, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chánez-Cárdenas, M. (2014). PCR en tiempo real. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (256p). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).

Ahamed, A., & Vermette, P. (2008). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.05.007>

Ahmed, A., & Bibi, A. (2018). Fungal cellulase; production and applications: Minireview. *LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences*, 4(1), 19–36. <https://doi.org/10.20319/lijhls.2018.41.1936>

Alonso Peña, J. R. (2011). *Manual de histología vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Impreso en España. 326 p.

Amore, A., Giacobbe, S., & Faraco, V. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, 14(4), 230–249. <https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>

Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, J., Chibucos, M. C., Crabtree, J., Howarth, C., Orvis, J., Shah, P., Wymore, F., Binkley, G., Miyasato, S. R., Simison, M., Sherlock, G., & Wortman, J. R. (2011). *The Aspergillus Genome Database* (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D653–D659.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkr875>. Consultado 15 jul. 2019. Disponible en: <http://www.aspgd.org/>

Askolin, S. (2006). Characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobins HFBI and HFBI. [PhD Thesis]. VTT Publications 601. 137 p.

Barcelos, C., Rocha, V., Groposo, C., de Castro, A., & Pereira Jr, N. (Eds.). (2015). Enzymes and accessory proteins involved in the hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Mycology: Current and Future Developments*, 23–56. <https://doi.org/10.2174/9781681080741115010005>.

Barriuso, J., Hogan, D. A., Keshavarz, T., & Martínez, M. J. (2018). Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 627–638. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy022>

Basu, C. (2015). PCR Primer Design. Second Edition. Humana Press. *Methods in Molecular Biology* 1275. 216 p.

Benocci, T., Aguilar-Pontes, M. V., Zhou, M., Seiboth, B., & de Vries, R. P. (2017). Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0841-x>.

Benoit-Gelber, I., Gruntjes, T., Vinck, A., van Veluw, J. G., Wösten, H. A. B., Boeren, S., Vervoort, J. J. M., & de Vries, R. P. (2017). Mixed colonies of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* cooperatively degrading wheat bran. *Fungal Genetics and Biology*, 102, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.02.006>

Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J.-L. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1180–1204. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.001>.

Bio-Rad Laboratories. (2006). Real-Time PCR Applications Guide. 100 p.

Bischof, R., Fourtis, L., Limbeck, A., Gamauf, C., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2013). Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulase inducing substrates wheat straw and lactose. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 127. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-127>.

Biswas, R.; Persad, A.; Bisaria, V.S. (2014). Production of cellulolytic enzymes. En VS. Bisaria and A. Kondo (Eds.), *Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts* (p. 105-132), New Jersey: John Wiley & Sons.

Boddy, L. (2016). Chapter 10 Interactions between fungi and other microbes. *The Fungi*. En SC. Watkinson, L. Boddy and NP. Money (Eds.). Third Edition. 466 p.

Bohle, K., Jungebloud, A., Göcke, Y., Dalpiaz, A., Cordes, C., Horn, H., & Hempel, D. C. (2007). Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 132(4), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.005>

Borin, G. P., Sanchez, C. C., de Souza, A. P., de Santana, E. S., de Souza, A. T., Leme, A. F. P., Squina, F. M., Buckeridge, M., Goldman, G. H., & Oliveira, J. V. de C. (2015). Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLOS ONE*, 10(6), e0129275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129275>

Borin, G. P., Sanchez, C. C., de Santana, E. S., Zanini, G. K., dos Santos, R. A. C., de Oliveira Pontes, A., de Souza, A. T., Dal'Mas, R. M. M. T. S., Riaño-Pachón, D. M., Goldman, G. H., & Oliveira, J. V. de C. (2017). Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics*, 18(1), 501. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3857-5>.

Camassola, M. (2012). Cellulases and Hemicellulases, why we need so much of these Enzymes? *Fermentation Technology*, 01(03), e112. <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000e112>

Castillo, M. R., Gutierrez-Correa, M., Linden, J. C., & Tengerdy, R. P. (1994). Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 16(9): 967–972. <https://doi.org/10.1007/bf00128635>

Chandel, A., & Da Silva, S. S. (Eds.). (2013). Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization. IntechOpen, 283. <https://doi.org/10.5772/1490>

Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P., & Karlovsky, P. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*, 16(1): 83. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0698-3>.

Choi, J., & Kim, S.-H. (2017). A genome tree of life for the fungi kingdom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35): 9391–9396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711939114>

Daly, P., van Munster, J. M., Kokolski, M., Sang, F., Blythe, M. J., Malla, S., Velasco de Castro Oliveira, J., Goldman, G. H., & Archer, D. B. (2017). Transcriptomic responses of mixed cultures of ascomycete fungi to lignocellulose using dual RNA-seq reveal inter-species antagonism and limited beneficial effects on CAZyme expression. *Fungal Genetics and Biology*, 102: 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.04.005>

Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., & Qin, W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4): 302–309. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.490938>

de Souza, W. R., de Gouvea, P. F., Savoldi, M., Malavazi, I., de Souza Bernardes, L. A., Goldman, M. H. S., de Vries, R. P., de Castro Oliveira, J. V., & Goldman, G. H. (2011). Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1): 40. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-40>.

Delmas, S., Pullan, S. T., Gaddipati, S., Kokolski, M., Malla, S., Blythe, M. J., Ibbett, R., Campbell, M., Liddell, S., Aboobaker, A., Tucker, G. A., & Archer, D. B. (2012). Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. *PLoS Genetics*, 8(8): e1002875. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002875>

Del Moral, S., Ramírez-Coutiño, L. P., & García-Gómez, M. J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 2(3):87-102.

Deshpande, S. K., Bhotmange, M. G., Chakrabarti, T., & Shastri, P. N. (2008). Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and

mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). Indian Journal of Chemical Technology 15: 449-456.

Dijksterhuis, J., & Wösten, H. (2013). Development of *Aspergillus niger*. Studies in Mycology 74. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 96 p.

Dorak, M. T. (ed.). (2006). Real-time PCR (Advanced Methods Series). Taylor & Francis Group. 333 p.

dos Santos Castro, L., Pedersoli, W., Antoniêto, A. C., Steindorff, A., Silva-Rocha, R., Martinez-Rossi, N. M., Rossi, A., Brown, N., Goldman, G. H., Faça, V. M., Persinoti, G. F., & Silva, R. (2014). Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. Biotechnology for Biofuels, 7(1): 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-41>.

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., & Kubicek, C. P. (2016). A complete annotation of the chromosomes of the cellulase producer *Trichoderma reesei* provides insights in gene clusters, their expression and reveals genes required for fitness. Biotechnology for Biofuels, 9(1): 75. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0488-z>.

Druzhinina, I.S., & Kubicek, C. P. (2016). Familiar Stranger. Ecological genomics of the model saprotroph and industrial enzyme producer *Trichoderma reesei* breaks the stereotypes. Advances in Applied Microbiology, 69–147. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.02.001>

Druzhinina, Irina S., & Kubicek, C. P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. Microbial Biotechnology, 10(6): 1485–1499. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12726>

Dueñas, R., Tengerdy, R. P., & Gutiérrez-Correa, M. (1995). Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 11(3): 333-337. <https://doi.org/10.1007/bf00367112>

Duff, S. J. B., Cooper, D. G., & Fuller, O. M. (1985). Cellulase and beta-glucosidase production by mixed culture of *Trichoderma reesei* rut C30 and *Aspergillus phoenicis*. Biotechnology Letters, 7(3): 185–190. <https://doi.org/10.1007/bf01027817>

- El Abed, S., Hamadi, F., Latrache, H., Iraqui, H. M., & Ibnsouda, K. S. (2010). Adhesion of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* spores on fez cedar wood substrata. *Annals of Microbiology*, 60(3), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0045-0>
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS Pathogens* 8(4): e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>
- Filiatrault-Chastel, C., Navarro, D., Haon, M., Grisel, S., Herpoël-Gimbert, I., & Chevret, D. *et al.* (2019). AA16, a new lytic polysaccharide monoxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1):55. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1394-y>
- Frisvad, J. C., Møller, L. L. H., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 9481-9515. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9354-1>
- Gamarra, N. N.; Villena, G. K.; & Gutiérrez-Correa, M. (2010). Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 545-551. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2540-4>
- García-Estrada, C.; Domínguez-Santos, R.; Kosalková, K.; Martín, J.-F. (2018). Transcription factors controlling primary and secondary metabolism in filamentous fungi: The β -lactam paradigm. *Fermentation* 4(2): 47. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020047>
- Gautam, SP; Bundela, PS; Pandey, AK; Awasthi, MK; Sarsaiya, S. (2010). Effect of different carbon sources on production of cellulases by *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 5 (3): 295-300.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Application Chemical* 59 (2): 257-268.
- Golan, A. E. (2011). Cellulase: Types and action, mechanism and uses. Nova Science Publishers. 319 p.
- Gong, W; Zhang, H; Liu, S; Zhang, L; Gao, P; Chen, G; Wang, L. (2015). Comparative secretome analysis of *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, and *Penicillium oxalicum*

during solid-state fermentation. *Applications Biochemical Biotechnology* 177(6):1252-1271. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1811-z>

Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., & Shabalov, I. (2013). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D699–D704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>. Consultado 15 julio 2019. Disponible en: <https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>

Gupta, V. K.; Schmoll, M.; Herrera-Estrella, A.; Upadhyay, R. S.; Druzhinina, I.; & Tuohy, M. G. (2014). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier Editorial. 569 p.

Gupta, V. K. (Ed.). (2016). *Microbial enzymes in bioconversions of biomass*. Springer International. 347 p.

Gupta, V. K., Steindorff, A. S., de Paula, R. G., Silva-Rocha, R., Mach-Aigner, A. R., Mach, R. L., & Silva, R. N. (2016). The post-genomic era of *Trichoderma reesei*: What's next? *Trends in Biotechnology*, 34(12): 970–982. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.003>

Gutiérrez-Correa, M.; Ludeña, Y.; Ramage, G.; & Villena, G. K. (2012). Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5): 1235-1253. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9555-5>

Gutiérrez-Correa, M., & Villena G. K. (2012). Batch and repeated batch cellulase production by mixed cultures of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* or *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2 (6): 929-935.

Gutiérrez-Correa, M.; Portal, L.; Moreno, P.; & Tengerdy, R. P. (1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 68(2): 173-178. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00139-4](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00139-4)

Gutiérrez-Correa, M.; & Tengerdy, R. P. (1998). Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnology Letters*, 20(1): 45-47. <https://doi.org/10.1023/A:1005379030092>

Gutiérrez-Correa, M.; & Tengerdy, R. P. (1997). Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters* 19 (7): 665-667. <https://doi.org/10.1023/A:1018342916095>

- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos [Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: classical cases and new models]. *Revista iberoamericana de micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Hassan, L.; Reppke, M. J.; Thieme, N.; Schweizer, S. A.; Mueller, C. W.; & Benz, J. P. (2017). Comparing the physiochemical parameters of three celluloses reveals new insights into substrate suitability for fungal enzyme production. *Fungal Biology and Biotechnology* 4:10. <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0039-9>
- Heinze, T.; El Seoud, O. A.; & Koschella, A. (2018). Cellulose derivatives. Synthesis, structure, and properties. Springer International. Cham, Switzerland. 531 p.
- Hu, H. L.; van den Brink, J.; Gruben, B. S.; Wösten, H. A. B.; Gu, J.-D.; & de Vries, R. P. (2011). Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(1): 248-252. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.008>
- ITC (International Trade Center). (2019). TRADE MAP Estadísticas del comercio para el desarrollo de empresas. Datos comerciales mensuales, trimestrales y anuales. Valores de importación y exportación, volúmenes, tasas de crecimiento, cuotas de mercado, etc. Consultado el 20 mayo 2019. Disponible en: https://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx
- Ivanova, C.; Baath, J. A.; Seiboth, B.; & Kubicek, C. P. (2013). Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS ONE* 8(5): e62631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062631>
- Jensen, B. G., Andersen, M. R.; Pedersen M. H.; Frisvad, J. C.; & Sondergaard, I. (2010). Hydrophobins from *Aspergillus* species cannot be clearly divided into two classes. *BMC Research Notes*, 3:344. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-344>
- Khalesi, M., Zune, Q., Telek, S., Riveros-Galan, D., Verachtert, H., Toye, D, *et al.* (2014). Fungal biofilm reactor improves the productivity of hydrophobin HFBII. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.001>

- Klein-Marcuschamer, D.; Oleskowicz-Popiel, P.; Simmons, B. A.; & Blanch, H. W. (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*. 109 (4):1083-7. <https://doi.org/10.1002/bit.24370>
- Kolasa, M.; Ahring, B. K.; Lübeck, P. S.; & Lübeck, M. (2014). Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. *Bioresource Technology* 169:143-148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.082>
- Kubicek, C. P.; & Harman, G. E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium* Volumen 1. Taylor & Francis Inc. 293 p.
- Kubicek, C. P.; Mikus, M.; Schuster, A.; Schmoll, M.; & Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels* 2: 19. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-19>
- Lameiras, F.; Ras, C.; ten Pierick, A.; Heijnen, J. J.; & van Gulik, W. M. (2018). Stoichiometry and kinetics of single and mixed substrate uptake in *Aspergillus niger*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 41: 157-170. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1854-3>
- Lejeune, R.; & Baron, G. V. (1995). Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:249-258. <https://doi.org/10.1007/BF00172820>
- Li, C.; Lin, F.; Sun, W.; Yuan, S.; Zhou, Z.; Wu, F.-G.; & Chen, Z. (2018). Constitutive hyperproduction of sorbicillinoids in *Trichoderma reesei* ZC121. *Biotechnology for Biofuels* 11:291. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1296-4>
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Stahl, D. A.; & Clark, D. P. (2012). Brock. *Biology of Microorganisms*. Thirteenth Edition. Pearson Education Editorial. 1155 p.
- Mahmoud, M. A.; Al-Othman, M. R.; Abd-El-Aziz, A. R. M.; Metwaly, H. A.; & Mohamed, H. A. (2016). Expression of genes encoding cellulolytic enzymes in some *Aspergillus* species. *Genetics and Molecular Research* 15(4): gmr15048913. <https://doi.org/10.4238/gmr15048913>

- Malmierca, M. G.; Izquierdo-Bueno, I.; McCormick, S. P.; Cardoza, R. E.; Alexander, N. J.; Moraga, J.; Gomes, E. V.; Proctor, R. H.; Collado, I. G.; Monte, E.; & Gutiérrez, S. (2016). Botrydial and botcinins produced by *Botrytis cinerea* regulate the expression of *Trichoderma arundinaceum* genes involved in trichothecene biosynthesis. *Molecular Plant Pathology* 17(7):1017-31. <https://doi.org/10.1111/mpp.12343>
- Martínez, D.; Berka, R. M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S. E.; Chapman, J.; *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology* 26: 553-560. <https://doi.org/10.1038/nbt1403>
- Monroy, A. A.; Stappler, E.; Schuster, A.; Sulyok, M., & Schmoll, M. (2017). A CRE1-regulated cluster is responsible for light dependent production of dihydrotrichotetronin in *Trichoderma reesei*. *PLoS ONE* 12(8): e0182530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182530>
- Morgenstern, I., Powlowski, J., & Tsang, A. (2014). Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. *Briefings in functional genomics*, 13(6), 471–481. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elu032>
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., & Schmoll, M. (2013). *Trichoderma*. *Biology and Applications*. CAB International. 346p.
- Nadumade, V. K., Venkatachalam, P., & Gajaraj, B. (2016). *Aspergillus* applications in cancer research. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering Aspergillus system properties and applications*. Elsevier. 314 p.
- Niu, D., Tian, X., Mchunu, N. P., Jia, C., Singh, S., Liu, X., Prior, B. A., & Lu, F. (2017). Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.001>
- Novy, V., Schmid, M., Eibinger, M., Petrasek, Z., & Nidetzky, B. (2016). The micromorphology of *Trichoderma reesei* analyzed in cultivations on lactose and solid lignocellulosic substrate, and its relationship with cellulase production. *Biotechnology for Biofuels* 9(1):169. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0584-0>

- Padder, S. A., Prasad, R., & Shah, A. H. (2018). Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological Research*, 210, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.007>
- Papagianni, M., & Matthey, M. (2006). Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microbial Cell Factories* 5(1):3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-3>
- Peitersen, N., & Ross, E. W. (1979). Mathematical model for enzymatic hydrolysis and fermentation of cellulose by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering* 21: 997-1017. <https://doi.org/10.1002/bit.260210606>
- Pel, H. J.; de Winde J. H.; Archer, D. B.; Dyer, P. S.; Hofmann, G.; Schaap, P. J.; Turner, G.; de Vries, R. P.; *et al.* (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology* 25(2):221-231. <https://doi.org/10.1038/nbt1282>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 900.
- Pointing, S. B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 2:17-33.
- Quintanilla, D.; Hagemann, T.; Hansen, K.; & Gernaey, K. V. (2015). Fungal morphology in industrial enzyme production. Modelling and monitoring. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 149: 29-54. https://doi.org/10.1007/10_2015_309
- Rincón Martínez, J. M.; & Silva Lora, E. E. (2014). Bioenergía: fuentes, conversión y sustentabilidad. Red Iberoamericana de Aprovechamiento de Residuos Orgánicos en Producción de Energía. Primera Edición. 332 p.
- Rodríguez-Iglesias, A; & Schmoll, M. (2019). Protein phosphatases regulate growth, development, cellulases and secondary metabolism in *Trichoderma reesei*. *Scientific Reports* 9:10995. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47421-z>
- Romero-Cortes, T; López-Pérez, P. A.; Pérez, V. H.; Medina-Toledo, A. K.; Aparicio-Burgos, J. E.; & Cuervo-Parra, J. A. (2019). Confrontation of *Trichoderma asperellum*

VSL80 against *Aspergillus niger* via the effect of enzymatic production. Chilean journal of agricultural & animal sciences (ex Agro-Ciencia) 35(1): 68-80. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000202>

Ruijter, J. M.; Ramakers, C.; Hoogaars, W. M. H.; Karlen, Y.; Bakker, O.; van den Hoff, M. J. B.; & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37(6): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>

Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; *et al.* (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal Biochemistry* 269, 4202–4211. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03095.x>

Sariaslani, S.; & Gadd, G. M. (2016). *Advances in Applied Microbiology*. Volume Ninety-Five. First Edition. Elsevier Inc. 233 p.

Šnajdr, J.; Dobiášová, P.; Větrovský, T.; Valášková, V.; Alawi, A.; Boddy, L.; & Baldrian, P. (2011). Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 78:80-90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01123.x>

Schmoll, M.; Dattenbock, C.; Carreras-Villasenor, N.; Mendoza-Mendoza, A.; Tisch, D.; Aleman, M. I.; *et al.* (2016). The genomes of three uneven siblings: Footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1):205–327. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00040-15>

Seidl, V., & Seiboth, B. (2010). *Trichoderma reesei*: genetic approaches to improving strain efficiency. *Biofuels* 1(2): 343-354. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.1>

Seidl-Seiboth, V; Ihrmark, K; Druzhinina, I; Karlsson, M. 2014. Chapter 5 Molecular evolution of *Trichoderma* chitinases. *Biology and Biotechnology of Trichoderma*. En VG. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, RS. Upadhyay, I. Druzhinina, & M. Tuohy (Eds.). 650 p.

Shida, Y.; Furukawa, T.; & Ogasawara, W. (2016). Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous

fungus. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 80(9): 1712-1729.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1171701>

Shen, X.; Li, T.; Chen, S.; Fan, L.; Gao, J.; & Hou, C. (2015). Characterization and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome of *Shiraia bambusicola* reveals special features in the order of Pleosporales. *PLOS ONE* 10(3): e0116466.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116466>

Siddiquee, S. (2017). Practical handbook of the biology and molecular diversity of *Trichoderma* species from tropical regions. Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7>. 110 p.

Singh, A.; Shahid, M.; Srivastava, M.; Pandey, S.; Sharma, A.; & Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology & Mycology* 3:127. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0517.1000127>

Steiger, M. G.; Mach, R. L.; & Mach-Aigner, A. R. (2010). An accurate normalization strategy for RT-qPCR in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Journal of Biotechnology* 145(1): 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.10.012>

Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 9-16.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>

Svanström, Å.; Van Leeuwen, M. R.; Dijksterhuis, J.; & Melin, P. (2014). Trehalose synthesis in *Aspergillus niger*: characterization of six homologous genes, all with conserved orthologs in related species. *BMC Microbiology* 14(1):90. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-90>

Upton, D. J.; McQueen-Mason, S. J.; & Wood, A. J. (2017). An accurate description of *Aspergillus niger* organic acid batch fermentation through dynamic metabolic modelling. *Biotechnology for Biofuels* 10(1):258. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0950-6>

van Munster, J. M.; Daly, P.; Delmas, S.; Pullan, S. T.; Blythe, M. J.; Malla, S.; Kokolski, M.; *et al.* (2014). The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology* 72:34-47.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.006>

Valla, S; & Lale, R (eds.). (2014). DNA Cloning and Assembly Methods (Methods in Molecular Biology vol. 1116). Springer Science & Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_18

Veiter, L.; Rajamanickam, V.; & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:2997-3006. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>

Velichkova, E.; Yordanova, M.; Badalova, M.; Nikolova, D.; & Evstatieva, Y. (2014). Adherence of *Aspergillus awamori* K-1 and *Trichoderma viride* SL-45 on Loofa sponge for production of hydrolases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(Supplement 1): 97-99.

Villena, G. K. (2002). Producción de celulasas con biopelículas mixtas de hongos filamentosos. [Tesis de maestría]. Lima, Perú. UNALM. 100 p.

Villena, G. K.; & Gutiérrez-Correa, M. (2006). Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiology* 43: 262-268. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01960.x>

Villena, G. K; & Gutiérrez-Correa, M. (2007a). Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Letters in Applied Microbiology* 45: 231-237. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02183.x>

Villena, G. K; & Gutiérrez-Correa, M. (2007b). Production of lignocellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* biofilms at variable water activities. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(1): 124-140.

Villena, G. K.; Fujikawa, T.; Tsuyumu, S.; & Gutiérrez-Correa, M. (2009a). Differential gene expression of some lignocellulolytic enzymes in *Aspergillus niger* biofilms. *Revista Peruana de Biología* 15(2): 097-102.

Villena, G. K.; Venkatesh, L.; Yamazaki, A.; Tsuyumu, S.; & Gutiérrez-Correa, M. (2009b). Initial intracellular proteome profile of *Aspergillus niger* biofilms. *Revista Peruana de Biología* 16: 101-108.

Villena, G. K.; Fujikawa, T.; Tsuyumu, S.; & Gutiérrez-Correa, M. (2010). Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy

and cryo scanning electron microscopy. *Bioresource Technology* 101(6): 1920-1926. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.036>

Xiao, Z; Storms, R., & Tsang, A. (2005). Microplate-Based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. *Analytical Biochemistry* 342: 176-178. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.01.052>

Wallen, R. M.; & Perlin, M. H. (2018). An overview of the function and maintenance of sexual reproduction in dikaryotic fungi. *Frontiers in Microbiology* 9:503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00503>

Wang, B. T., Hu, S., Yu, X. Y., Jin, L., Zhu, Y. J., & Jin, F. J. (2020). Studies of Cellulose and Starch Utilization and the Regulatory Mechanisms of Related Enzymes in Fungi. *Polymers*, 12(3), 530. <https://doi.org/10.3390/polym12030530>

Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. Third Edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. 405 p.

Wen, Z.; Liao, W.; & Chen, S. (2005). Production of cellulase/b-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry* 40:3087-3094. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.044>

Wertz, J. L.; Bédué, O.; & Mercier, J. P. (2010). *Cellulose science and technology*. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne Press. First Edition. 370 p.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, Klein's *Microbiology*. Seventh edition. 719 p.

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-Time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39: 75-85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>

Xiros, C., & Studer, M. H. (2017). A Multispecies Fungal Biofilm Approach to Enhance the Cellulolytic Efficiency of Membrane Reactors for Consolidated Bioprocessing of Plant Biomass. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1930. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01930>

Xu, J., Zhao, G., Kou, Y., Zhang, W., Zhou, Q., Chen, G., & Liu, W. (2014). Intracellular β -Glucosidases CEL1a and CEL1b Are Essential for Cellulase Induction on Lactose in *Trichoderma reesei*. *Eukaryotic Cell*, 13(8), 1001–1013. <https://doi.org/10.1128/ec.00100-14>

Zaika, L. L., & Smith, J. L. (1975). Antioxidants and pigments of *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26:1357-1369.

Zhang, W., Kou, Y., Xu, J., Cao, Y., Zhao, G., Shao, J., Wang, H., Wang, Z., Bao, X., Chen, G., & Liu, W. (2013). Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 288(46): 32861–32872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505826>

Zhang, X.-Z., & Zhang, Y.-H.P. (2013). Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. En S.-T. Yang, H. A. El-Enshasy, & N. Thongchul (Eds.). *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers* (p. 131-146). John Wiley & Sons, Inc.

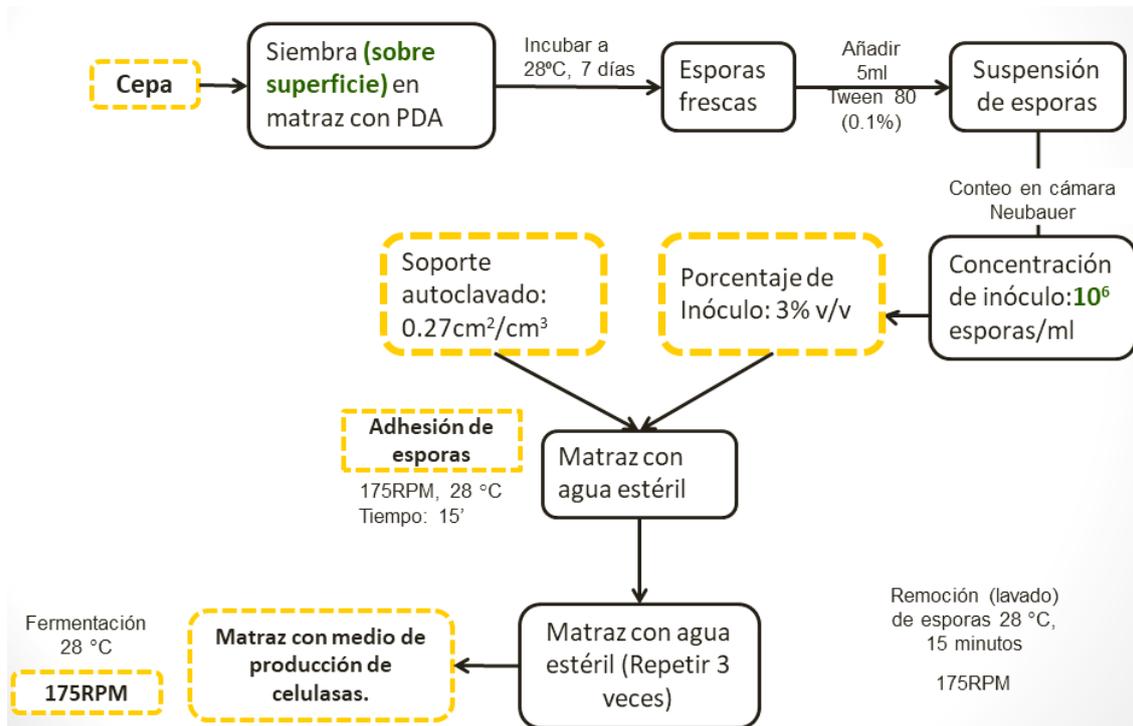
Zhang, F., Bunternngsook, B., Li, J.-X., Zhao, X.-Q., Champreda, V., Liu, C.-G., & Bai, F.-W. (2019). Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* for biofuels production. *Advances in Bioenergy*, 79–119. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2019.03.001>

Zhao, C., Deng, L., & Fang, H. (2018). Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for cellulase production to increase the cellulose degrading capability. *Biomass and Bioenergy*, 112, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.03.001>

Žifčáková, L., & Baldrian, P. (2012). Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. *Fungal Ecology*, 5(5), 481-489. doi: 10.1016/j.funeco.2012.05.001

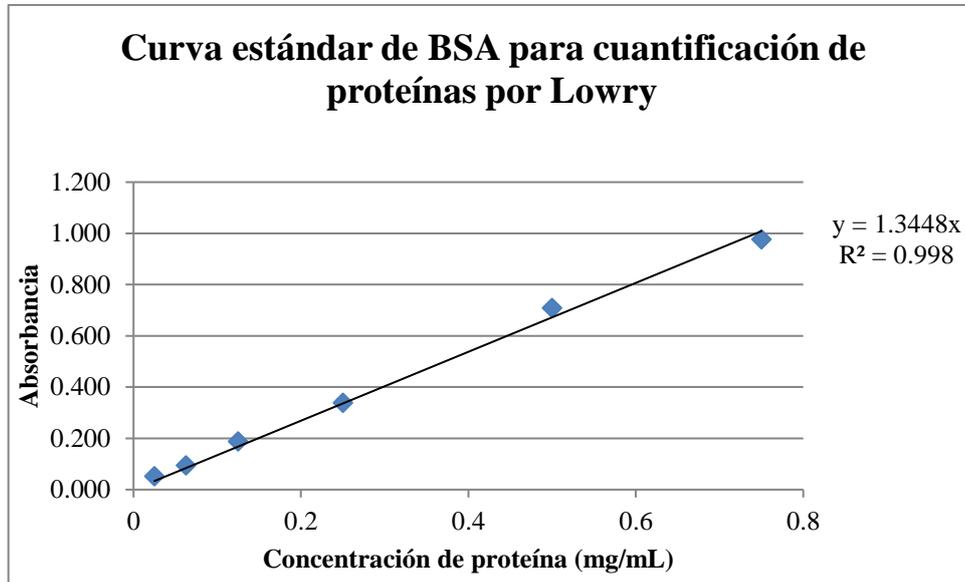
VIII. ANEXOS

Anexo 1. Esquema del procedimiento estándar para la formación de biopelículas.

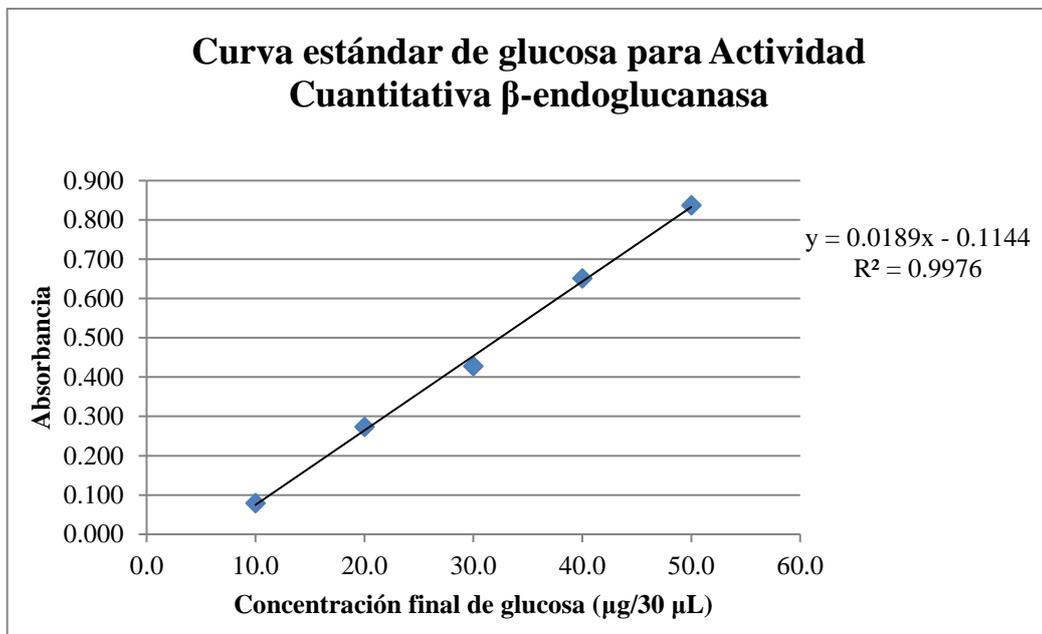


Los recuadros en amarillo indican las modificaciones que se realizaron en este trabajo.

Anexo 2. Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry.

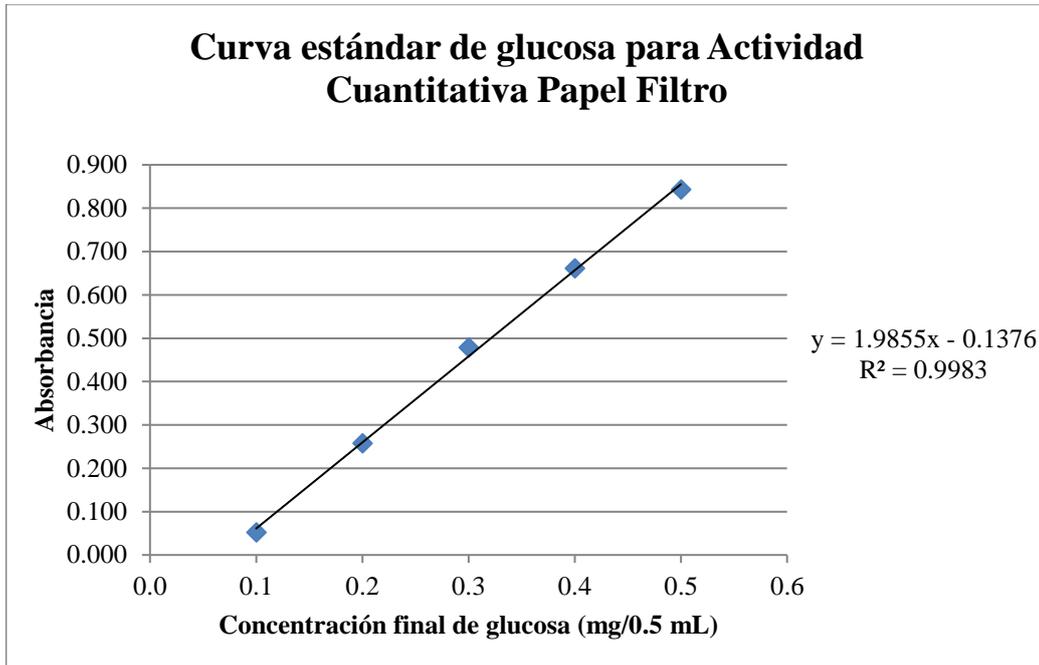


Anexo 3. Curva estándar de glucosa para actividad endoglucanasa en microplaca.



Cada actividad enzimática tuvo su propia curva estándar por la oxidación del DNS.

Anexo 4. Curva estándar de glucosa para actividad de celulasas totales (FPA).



Cada actividad enzimática tuvo su propia curva estándar por la oxidación del DNS.

Anexo 5. Diseño de placa para análisis de expresión de genes mediante qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Individual

Mixto

NRT
individual

NRT
mixto

NTC

En cada fila se analiza un gen y se consideran tres réplicas de reacción por cultivo. NRT: Control sin enzima de la síntesis de ADNc, NTC: Control de reacción con agua libre de nucleasas.

Anexo 6. Prueba estadística de la comparación de coeficiente específico de adherencia de dos velocidades de agitación en biopelículas de *T. reesei* tras 72 horas de cultivo.

Prueba T e IC de dos muestras:

μ_1 : media de Coeficiente de adhesión cuando Velocidad de agitación = 120 rpm

μ_2 : media de Coeficiente de adhesión cuando Velocidad de agitación = 175 rpm

Diferencia: $\mu_1 - \mu_2$

Se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estadísticos descriptivos:

Velocidad de agitación	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
120 rpm	3	0.9140	0.0352	0.020
175 rpm	3	0.5521	0.0463	0.027

Estimación de la diferencia

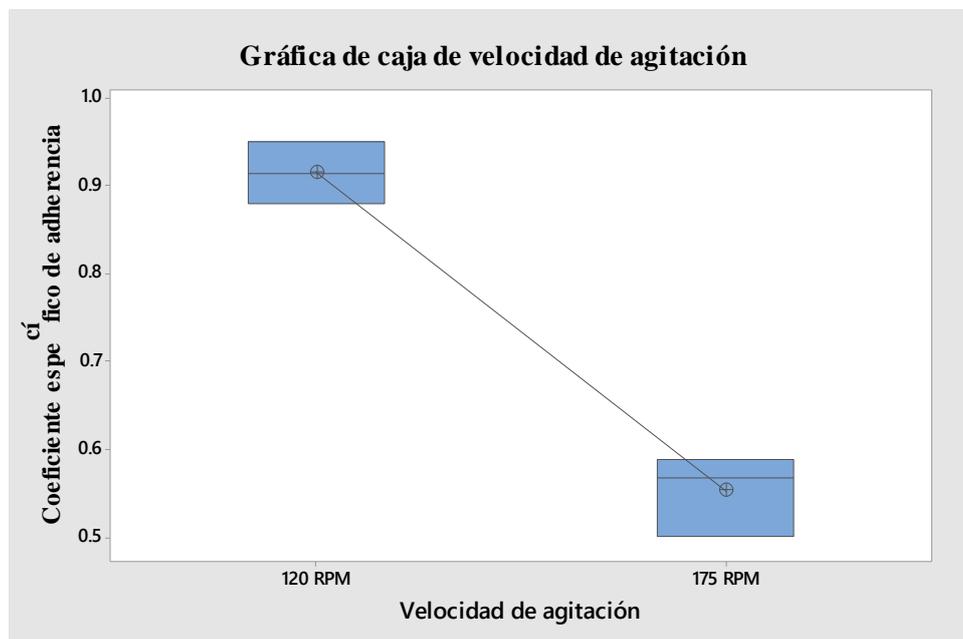
Diferencia	Desv.Est. agrupada	Límite inferior de 95% para la diferencia
0.3619	0.0411	0.2903

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna $H_1: \mu_1 - \mu_2 > 0$

Valor T	GL	Valor p
10.77	4	0.000



Anexo 7. Pruebas estadísticas para comparación del coeficiente específico de adherencia de compatibilidad de especies entre *T. reesei*, *A. niger* y *A. phoenicis* tras 72 horas de cultivo.

Estadísticos descriptivos:

Variable	Cepas	N	Media	Error estándar de la media	Desv.Est	Varianza	CoefVar
C. específico de adherencia	T+An	2	0.94275	0.00447	0.00632	0.00004	0.67
	T+Aph	3	0.658	0.215	0.373	0.139	56.64

Prueba T e IC de dos muestras:

μ_1 : media de Coef. adhesión cuando Cepas = T+An

μ_2 : media de Coef. adhesión cuando Cepas = T+Aph

Diferencia: $\mu_1 - \mu_2$

Se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estimación de la diferencia

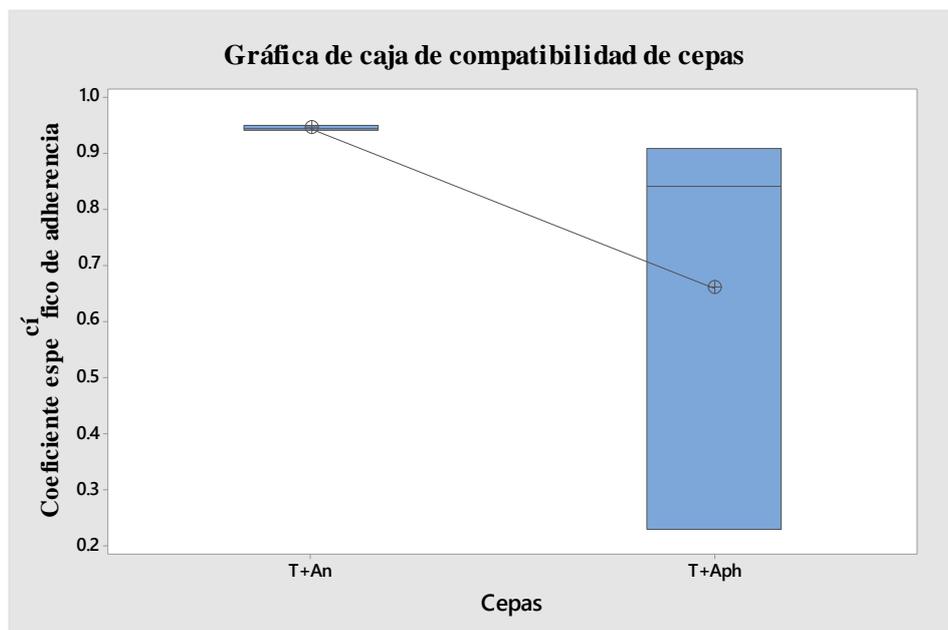
Diferencia	Desv.Est. agrupada	Límite inferior de 95% para la diferencia
0.285	0.304	-0.369

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna $H_1: \mu_1 - \mu_2 > 0$

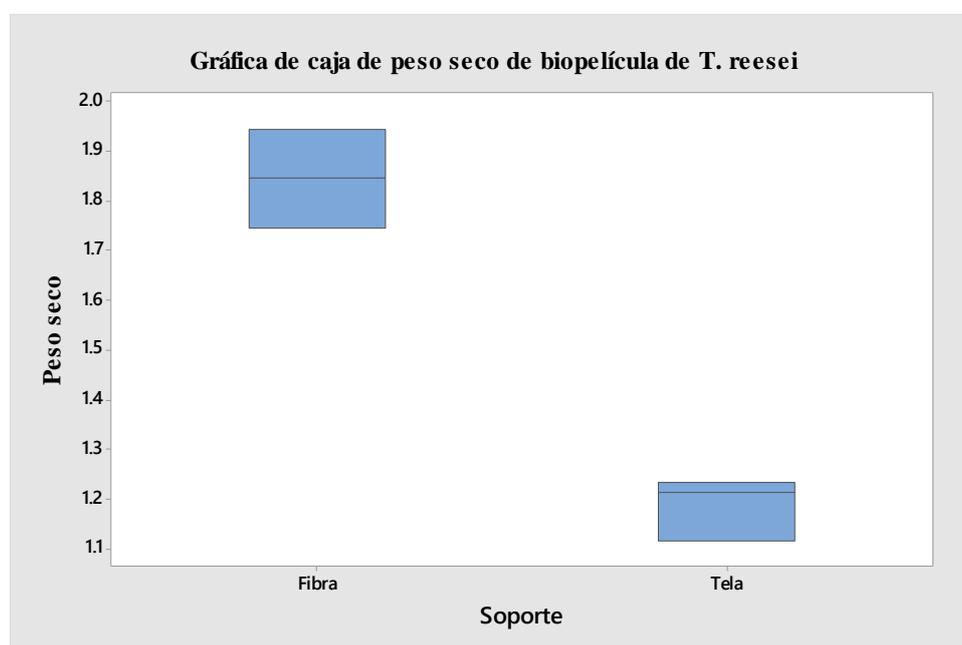
Valor T	GL	Valor p
1.02	3	0.191



Anexo 8. Comparación de peso seco de biomasa adherida de biopelículas individuales de *T. reesei* QM6a y mixtas en diferentes soportes tras 72 horas de cultivo.

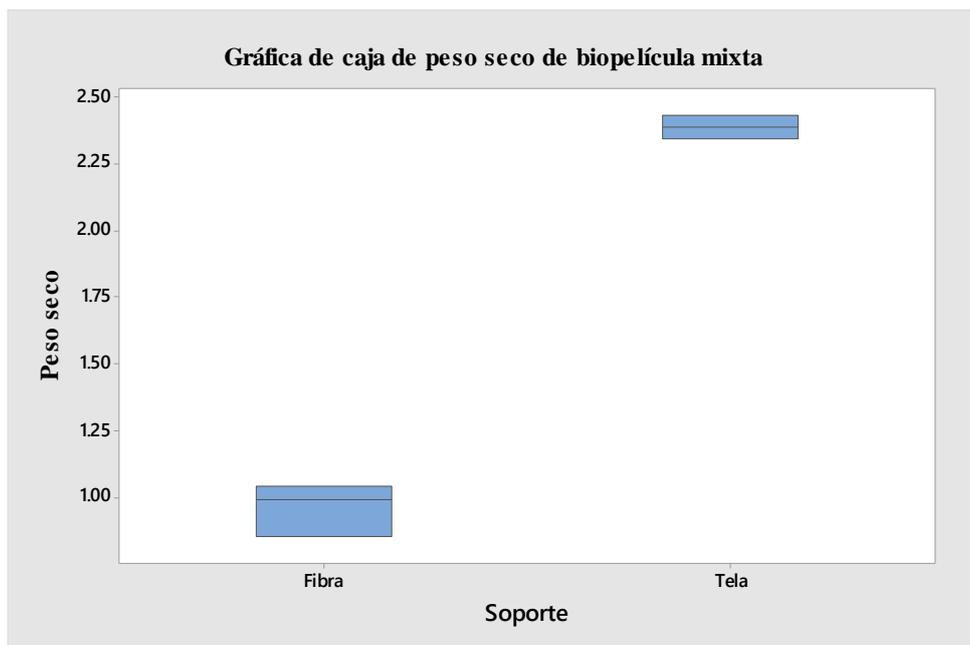
Estadísticos descriptivos: *T. reesei*

Variable	Soporte	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
P. seco	Fibra	2	1	1.845	0.101	0.142	0.020	7.72
	Tela	3	0	1.1871	0.0363	0.0629	0.0040	5.30



Estadísticos descriptivos: Mixto

Variable	Soporte	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
P. seco	Fibra	3	0	0.9600	0.0579	0.1002	0.0100	10.44
	Tela	2	1	2.3907	0.0450	0.0636	0.0040	2.66



Anexo 9. Pruebas estadísticas de la comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas individuales de *T. reesei* QM6a y mixtas en diferentes soportes tras 72 horas de cultivo.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0.821879	0.273960	919.38	0.000
Error	6	0.001788	0.000298		
Total	9	0.823667			

Comparaciones en parejas de Tukey

Factor	N	Media	Agrupación
Mixto_Fibra	3	0.9703	A
<i>T. reesei</i> _Fibra	2	0.9648	A
Mixto_Tela	2	0.94275	A
<i>T. reesei</i> _Tela	3	0.33564	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Mixto_Tela - <i>T. reesei</i> _Te	0.6071	0.0158	(0.5525, 0.6617)	38.53	0.000
<i>T. reesei</i> _Fi - <i>T. reesei</i> _Te	0.6292	0.0158	(0.5746, 0.6838)	39.93	0.000
Mixto_Fibra - <i>T. reesei</i> _Te	0.6347	0.0141	(0.5859, 0.6835)	45.03	0.000
<i>T. reesei</i> _Fi - Mixto_Tela	0.0220	0.0173	(-0.0378, 0.0819)	1.28	0.607
Mixto_Fibra - Mixto_Tela	0.0276	0.0158	(-0.0270, 0.0822)	1.75	0.378
Mixto_Fibra - <i>T. reesei</i> _Fi	0.0055	0.0158	(-0.0491, 0.0601)	0.35	0.984

Nivel de confianza individual = 98.66%

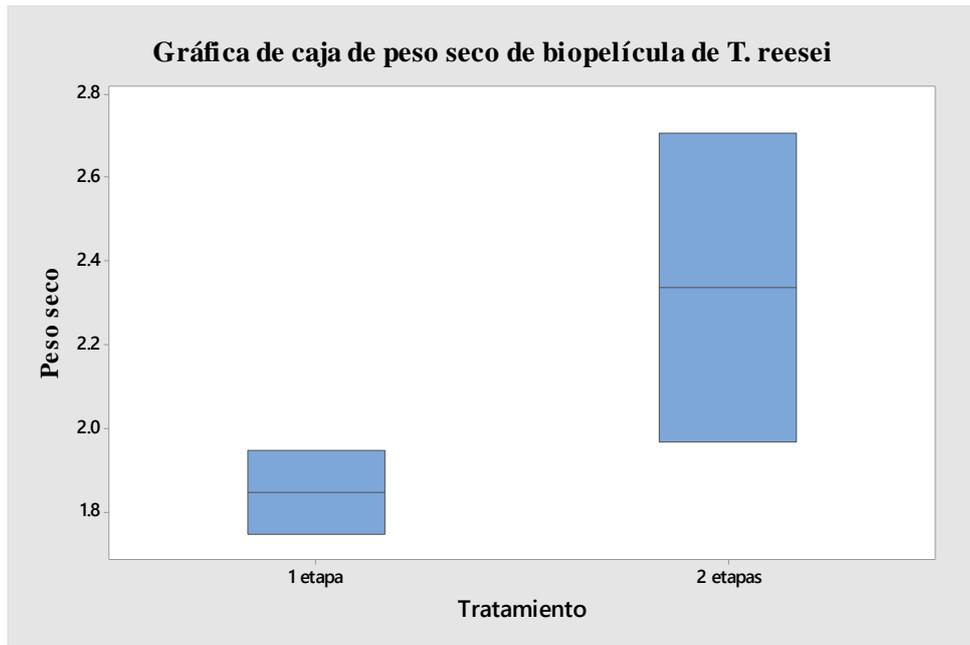
Anexo 10. Biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* en cultivo de 1 etapa tras 72 horas de cultivo en medio de producción de celulasas.



Anexo 11. Comparación de peso seco de biomasa adherida de biopelículas individuales de *T. reesei* QM6a y mixtas en distintos tipos de cultivo tras 72 horas de cultivo.

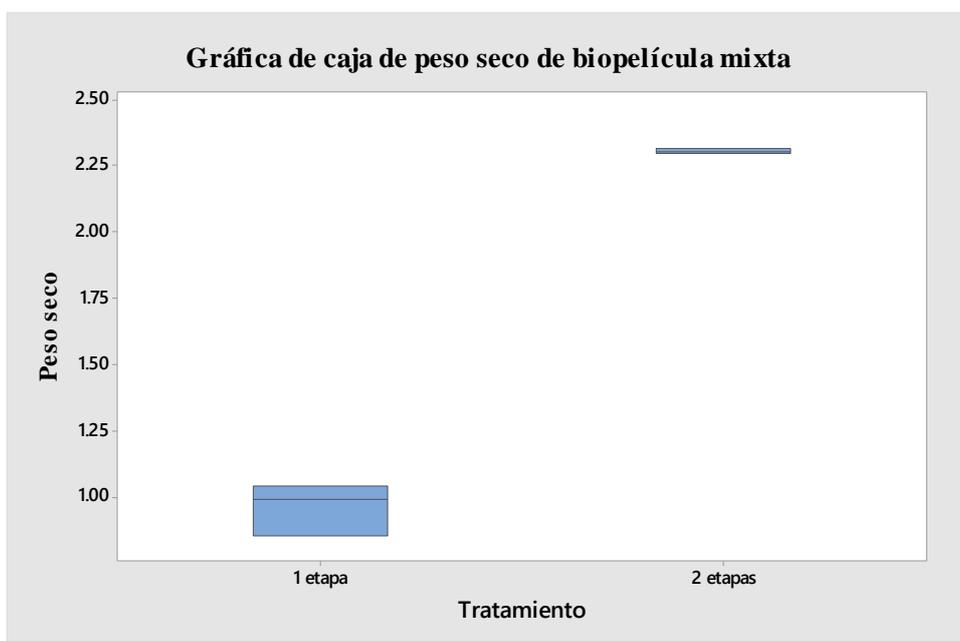
Estadísticos descriptivos: *T. reesei*

Variable	Tratamiento	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
P. seco	1 etapa	2	1	1.845	0.101	0.142	0.020	7.72
	2 etapas	2	1	2.334	0.370	0.523	0.274	22.42



Estadísticos descriptivos: Mixto

Variable	Tratamiento	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
P. seco	1 etapa	3	0	0.9600	0.0579	0.1002	0.0100	10.44
	2 etapas	2	1	2.3086	0.0100	0.0141	0.0002	0.61



Anexo 12. Pruebas estadísticas de la comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas individuales de *T. reesei* QM6a y mixtas en distintos tipos de cultivo tras 72 horas de cultivo.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0.027710	0.009237	16.07	0.005
Error	5	0.002873	0.000575		
Total	8	0.030583			

Comparaciones en parejas de Tukey

Factor	N	Media	Agrupación
Mixto_1E_1	3	0.9703	A
<i>T. reesei</i> _1E_1	2	0.9648	A
Mixto_2E	2	0.8675	B
<i>T. reesei</i> _2E	2	0.8473	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

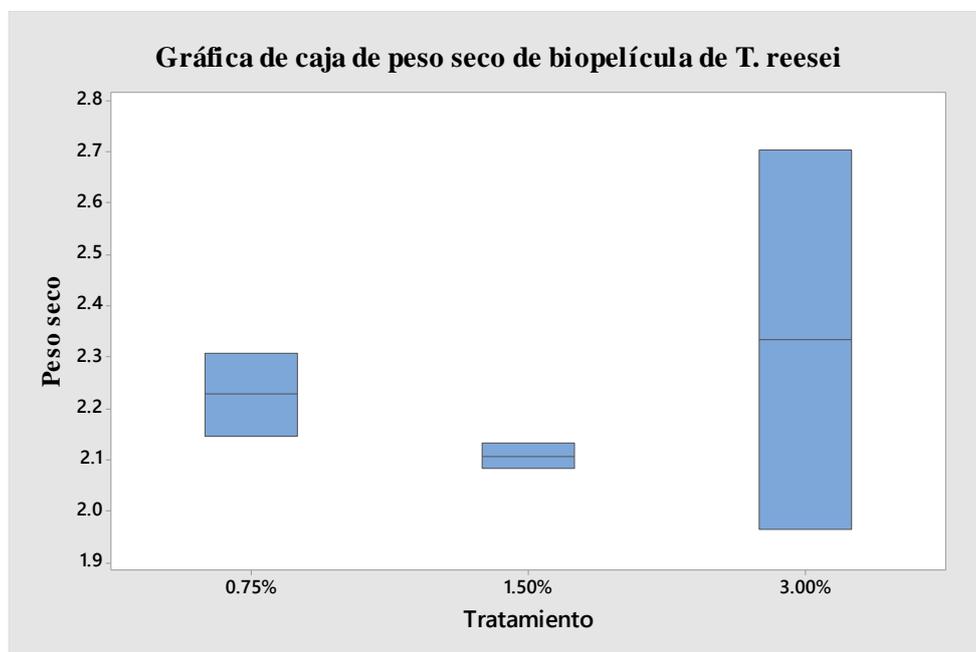
Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Mixto_1E_1 - <i>T. reesei</i> _1E	0.0055	0.0219	(-0.0752, 0.0863)	0.25	0.994
<i>T. reesei</i> _2E - <i>T. reesei</i> _1E	-0.1175	0.0240	(-0.2060, -0.0291)	-4.90	0.016
Mixto_2E - <i>T. reesei</i> _1E	-0.0973	0.0240	(-0.1858, -0.0089)	-4.06	0.035
<i>T. reesei</i> _2E - Mixto_1E_1	-0.1231	0.0219	(-0.2039, -0.0423)	-5.62	0.009
Mixto_2E - Mixto_1E_1	-0.1029	0.0219	(-0.1837, -0.0221)	-4.70	0.020
Mixto_2E - <i>T. reesei</i> _2E	0.0202	0.0240	(-0.0683, 0.1087)	0.84	0.833

Nivel de confianza individual = 98.59%

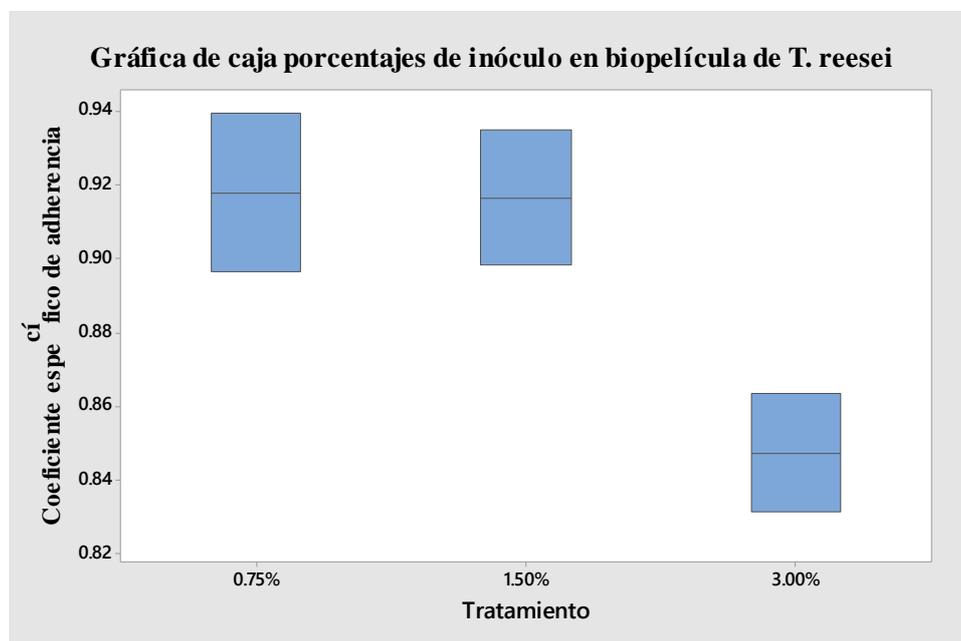
Anexo 13. Comparación de peso seco de biomasa adherida de biopelículas individuales de *T. reesei* QM6a a diferentes porcentajes de inóculo.

Estadísticos descriptivos: *T. reesei*

Variable	Tratamiento	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
P. seco	0.75%	2	0	2.2264	0.0807	0.1141	0.0130	5.13
	1.50%	2	0	2.1064	0.0250	0.0354	0.0012	1.68
	3.00%	2	0	2.334	0.370	0.523	0.274	22.42



Anexo 14. Pruebas estadísticas de comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas individuales de *T. reesei* QM6a a diferentes porcentajes de inóculo tras 72 horas de cultivo.



Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	2	0.006525	0.003262	4.63	0.121
Error	3	0.002112	0.000704		
Total	5	0.008637			

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0.75%	2	0.9178	A
1.50%	2	0.9166	A
3.00%	2	0.8473	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

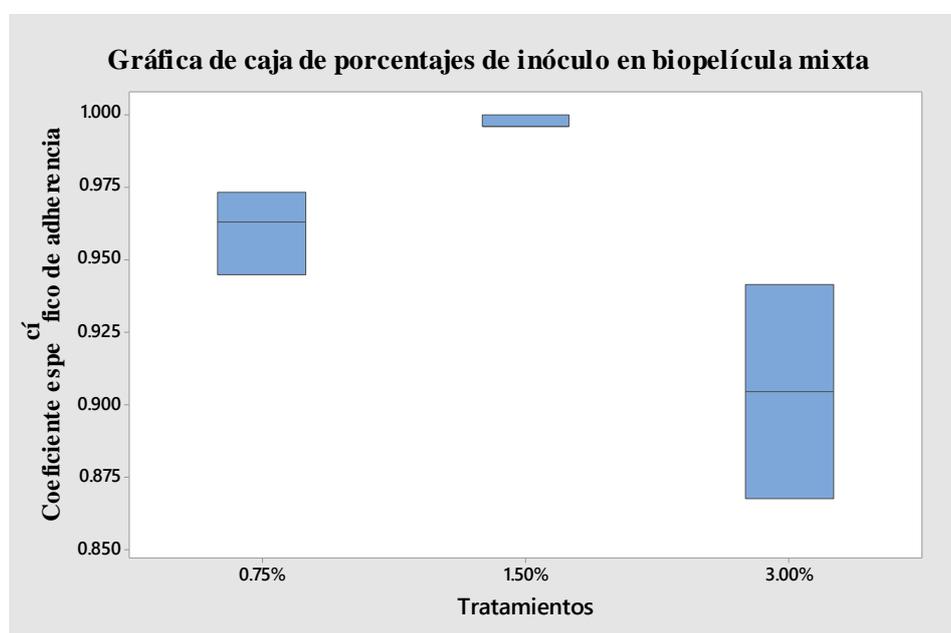
Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
1.50% - 0.75%	-0.0013	0.0265	(-0.1122, 0.1096)	-0.05	0.999
3.00% - 0.75%	-0.0706	0.0265	(-0.1815, 0.0403)	-2.66	0.147
3.00% - 1.50%	-0.0693	0.0265	(-0.1802, 0.0416)	-2.61	0.153

Nivel de confianza individual = 97.50%

Anexo 15. Pruebas estadísticas de comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas mixtas a diferentes porcentajes de inóculo a 48 horas.

Estadísticos descriptivos: Mixto

Variable	Tratamientos	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
C. específico	0.75%	3	0	0.96020	0.00820	0.01420	0.00020	1.48
	1.50%	3	0	0.99729	0.00136	0.00235	0.00001	0.24
	3.00%	2	0	0.9045	0.0370	0.0523	0.0027	5.79



Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	2	0.010336	0.005168	8.20	0.026
Error	5	0.003153	0.000631		
Total	7	0.013489			

Comparaciones en parejas de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
1.50%	3	0.99729	A
0.75%	3	0.96020	A B
3.00%	2	0.9045	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
1.50% - 0.75%	0.0371	0.0205	(-0.0296, 0.1038)	1.81	0.259
3.00% - 0.75%	-0.0557	0.0229	(-0.1303, 0.0188)	-2.43	0.126
3.00% - 1.50%	-0.0928	0.0229	(-0.1674, -0.0182)	-4.05	0.022

Nivel de confianza individual = 97.74%

Anexo 16. Pruebas estadísticas de comparación de coeficiente específico de adherencia de biopelículas simples y mixtas en dos medios de producción tras 48 horas de cultivo.

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	0.061158	0.012232	73.60	0.000
Error	9	0.001496	0.000166		
Total	14	0.062654			

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Factor	N	Media	Agrupación
<i>A. niger</i> _LACTOSA	3	1.000	A
Mixto_LACTOSA	3	0.99729	A
<i>A. niger</i> _CMC	2	0.9866	A
<i>T. reesei</i> _LACTOSA	3	0.98593	A
Mixto_CMC	2	0.92063	B
<i>T. reesei</i> _CMC	2	0.8089	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
<i>Mixto_CMC - T. reesei_CM</i>	0.1118	0.0129	(0.0660, 0.1575)	8.67	0.000
<i>A. niger_CMC - T. reesei_CM</i>	0.1777	0.0129	(0.1320, 0.2235)	13.79	0.000
<i>T. reesei_LA - T. reesei_CM</i>	0.1770	0.0118	(0.1353, 0.2188)	15.04	0.000
<i>Mixto_LACTOS - T. reesei_CM</i>	0.1884	0.0118	(0.1466, 0.2302)	16.01	0.000
<i>A. niger_LAC - T. reesei_CM</i>	0.1911	0.0118	(0.1493, 0.2329)	16.24	0.000
<i>A. niger_CMC - Mixto_CMC</i>	0.0660	0.0129	(0.0202, 0.1117)	5.12	0.006
<i>T. reesei_LA - Mixto_CMC</i>	0.0653	0.0118	(0.0235, 0.1071)	5.55	0.003
<i>Mixto_LACTOS - Mixto_CMC</i>	0.0767	0.0118	(0.0349, 0.1184)	6.51	0.001
<i>A. niger_LAC - Mixto_CMC</i>	0.0794	0.0118	(0.0376, 0.1211)	6.74	0.001
<i>T. reesei_LA - A. niger_CMC</i>	-0.0007	0.0118	(-0.0425, 0.0411)	-0.06	1.000
<i>Mixto_LACTOS - A. niger_CMC</i>	0.0107	0.0118	(-0.0311, 0.0524)	0.91	0.935
<i>A. niger_LAC - A. niger_CMC</i>	0.0134	0.0118	(-0.0284, 0.0552)	1.14	0.854
<i>Mixto_LACTOS - T. reesei_LA</i>	0.0114	0.0105	(-0.0260, 0.0487)	1.08	0.878
<i>A. niger_LAC - T. reesei_LA</i>	0.0141	0.0105	(-0.0233, 0.0514)	1.34	0.760
<i>A. niger_LAC - Mixto_LACTOS</i>	0.0027	0.0105	(-0.0347, 0.0401)	0.26	1.000

Nivel de confianza individual = 99.38%

Anexo 17. Estadísticos descriptivos de Proteínas totales g/L.

Variable	Cultivo	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
Proteínas totales g/L	<i>A. niger</i>	2	1	0.4609	0.0745	0.1054	0.0111	22.86
	Mixto	2	1	0.461	0.106	0.150	0.022	32.45
	<i>T. reesei</i>	2	1	0.522	0.232	0.329	0.108	62.97

Anexo 18. Estadísticos descriptivos de Actividad endoglucanasa U/L.

Variable	Cultivo	N	Media	Error estándar de la media	Desv. Est.	Varianza	CoefVar
Actividad endoglucanasa U/L	<i>A. niger</i>	2	73.88	7.97	11.28	127.20	15.27
	Mixto	2	84.500	0.100	0.141	0.020	0.17
	<i>T. reesei</i>	2	0.121	0.121	0.171	0.029	141.42

Anexo 19. Estadísticos descriptivos de los parámetros de productividad.

Estadísticos descriptivos: Y E/Pr (U/g proteína)

Variable	Cultivo	N	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
Y E/Pr (U/g proteína)	<i>A. niger</i>	2	161.71	8.84	12.50	156.16	7.73
	Mixto	2	193.4	44.6	63.1	3979.6	32.61
	<i>T. reesei</i>	2	0.160	0.160	0.227	0.051	141.42

Estadísticos descriptivos: Y E/x (U/g biomasa)

Variable	Cultivo	N	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
Y E/x (U/g biomasa)	<i>A. niger</i>	2	83.66	9.03	12.77	163.14	15.27
	Mixto	2	108.61	0.129	0.182	0.033	0.17
	<i>T. reesei</i>	2	0.184	0.184	0.261	0.068	141.42

Estadísticos descriptivos: Γ_E

Variable	Cultivo	N	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
Γ_E	<i>A. niger</i>	2	3.078	0.332	0.470	0.221	15.27
	Mixto	2	3.5208	0.00417	0.00589	0.00003	0.17
	<i>T. reesei</i>	2	0.00504	0.00504	0.00713	0.00005	141.42

Estadísticos descriptivos: $\Gamma_{E/x}$

Variable	Cultivo	N	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
$\Gamma_{E/x}$	<i>A. niger</i>	2	3.486	0.376	0.532	0.283	15.27
	Mixto	2	4.5255	0.00536	0.00757	0.00006	0.17
	<i>T. reesei</i>	2	0.00769	0.00769	0.01087	0.00012	141.42

Anexo 20. Pruebas estadísticas de comparación para parámetros de productividad.

- Γ_E :

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cultivo	2	14.6671	98.52%	14.6671	7.33354	99.59	0.002
Error	3	0.2209	1.48%	0.2209	0.07364		
Total	5	14.8880	100.00%				

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cultivo	N	Media	Agrupación
Mixto	2	3.52083	A
<i>A. niger</i>	2	3.078	A
<i>T. reesei</i>	2	0.00504	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Mixto - <i>A. niger</i>	0.443	0.271	(-0.691; 1.577)	1.63	0.361
<i>T. reesei</i> - <i>A. niger</i>	-3.073	0.271	(-4.207; -1.939)	-11.32	0.003
<i>T. reesei</i> - Mixto	-3.516	0.271	(-4.650; -2.382)	-12.96	0.002

Nivel de confianza individual = 97.50%

- $\Gamma_{E/x}$:

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cultivo	2	22.3932	98.75%	22.3932	11.1966	118.52	0.001
Error	3	0.2834	1.25%	0.2834	0.0945		
Total	5	22.6766	100.00%				

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cultivo	N	Media	Agrupación
Mixto	2	4.52549	A
<i>A. niger</i>	2	3.486	A
<i>T. reesei</i>	2	0.00769	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

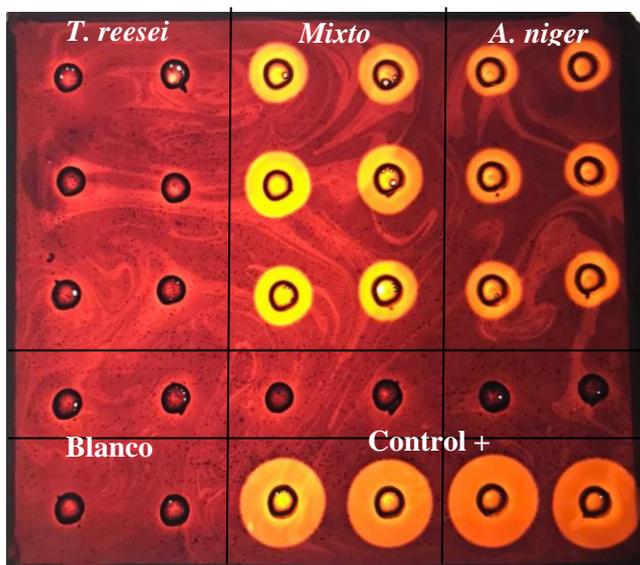
Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Mixto - A. niger	1.040	0.307	(-0.245; 2.324)	3.38	0.085
T. reesei - A. niger	-3.478	0.307	(-4.763; -2.194)	-11.32	0.003
T. reesei - Mixto	-4.518	0.307	(-5.802; -3.233)	-14.70	0.001

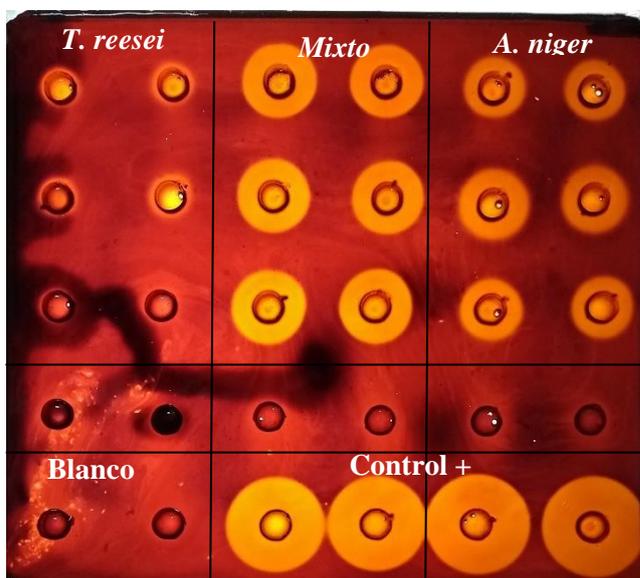
Nivel de confianza individual = 97.50%

Anexo 21. Comprobación de actividad cualitativa endoglucanasa en cultivos para extracción de ARN.

Lote 1



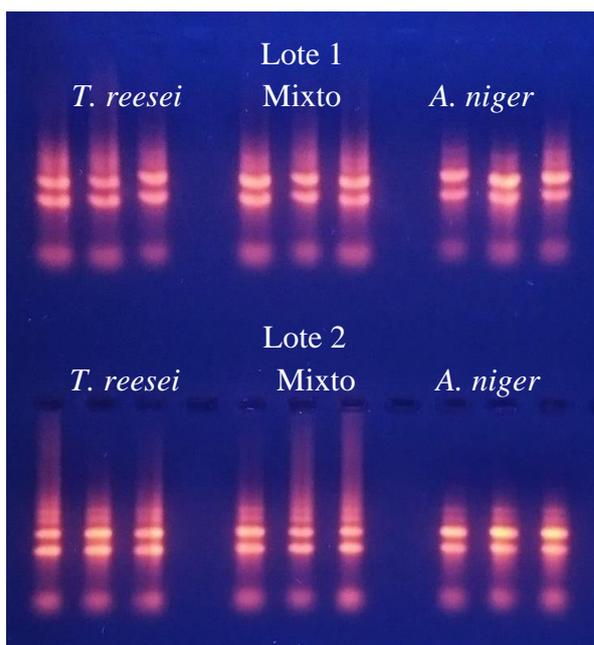
Lote 2



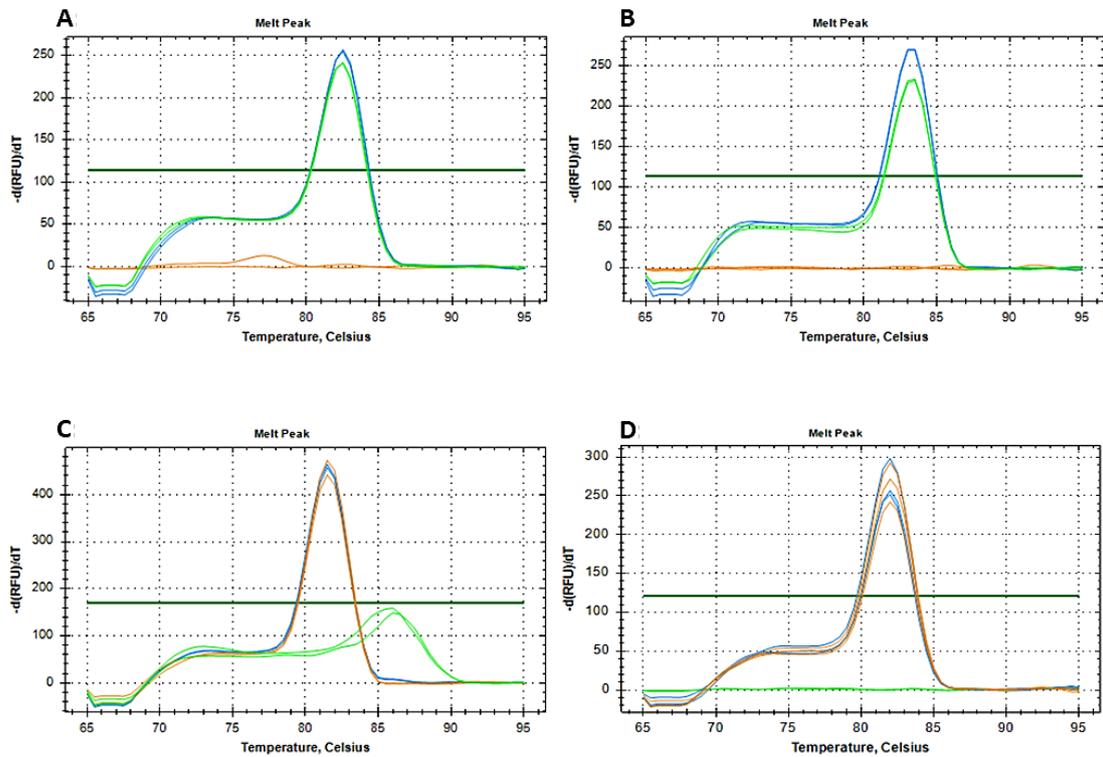
Anexo 22. Lecturas de espectrofotométricas en NanoDrop™ de ARN, obtenidas a partir de un *pool* de 3 réplicas biológicas.

Muestra	Concentración ng/ul	Ratio 260/280	Ratio 260/230
<i>T. reesei_1</i>	311.6	2.10	2.16
<i>Mixto_1</i>	678.1	2.14	2.30
<i>A. niger_1</i>	238.2	2.10	2.28
<i>T. reesei_2</i>	192.7	2.06	2.00
<i>Mixto_2</i>	300.5	2.13	2.28
<i>A. niger_2</i>	178.8	2.10	2.10

Anexo 23. Integridad de ARN de réplicas biológicas de biopelículas *T. reesei*, mixto y *A. niger* de dos lotes en gel de agarosa 1 por ciento.

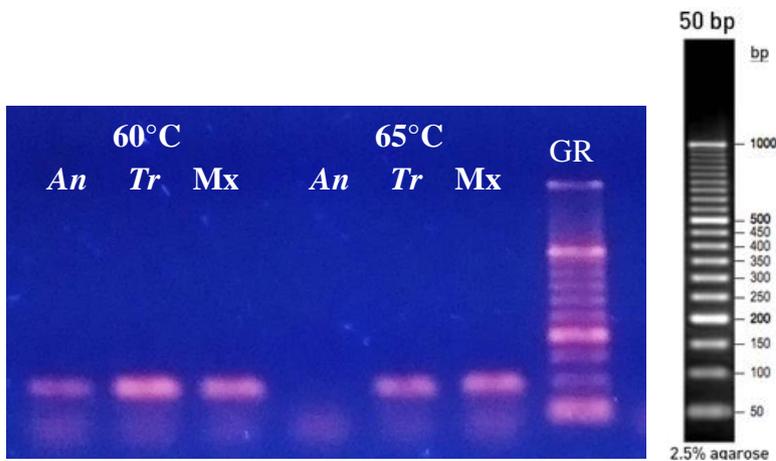


Anexo 24. Curvas de fusión de la amplificación de algunos cebadores específicos, en la parte superior específicos para *T. reesei* y en la parte inferior para *A. niger*.



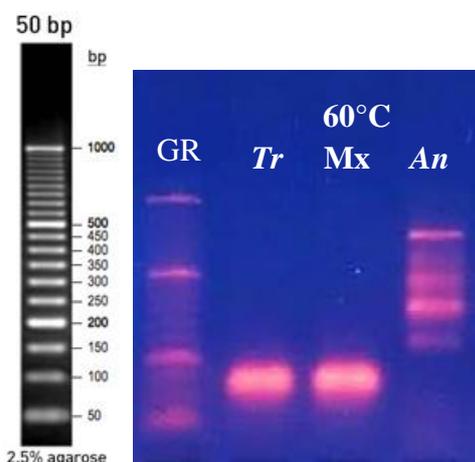
A) Amplificación de cebadores para *egII*, B) Amplificación de cebadores para *bglI*, C) Amplificación de cebadores para *sarA*, D) Amplificación de cebadores para *bglA*. Donde: *T. reesei* (verde), *A. niger* (anaranjado) y mixto (azul).

Anexo 25. Gel de agarosa (1.5 por ciento) de la prueba de especificidad de cebadores en qPCR para la comprobación diferencial de bandas. Amplificación para *cbh1* a 60°C y 65°C de temperatura de alineamiento.



An: con ADNc de *A. niger*, Tr: con ADNc de *T. reesei*, Mx: con ADNc de Mixto, GR: Marcador de 50 bp.

Anexo 26. Gel de agarosa (1.5 por ciento) de la prueba de especificidad de cebadores en qPCR para la comprobación diferencial de bandas. Amplificación para *xyr1* a 60°C de temperatura de alineamiento.



An: con ADNc de *A. niger*, Tr: con ADNc de *T. reesei*, Mx: con ADNc de Mixto, GR: Marcador de 50 bp.

Anexo 27. Eficiencias de cebadores halladas mediante el programa LinRegPCR.

Genes	Eficiencia Lote 1	Eficiencia Lote 2
<i>cbhB</i>	91.52	81.18
<i>eglA</i>	88.16	88.44
<i>eglB</i>	84.03	87.45
<i>bglA</i>	87.12	83.33
<i>bglB</i>	83.87	92.59
<i>creA</i>	83.66	93.14
<i>xlnR</i>	79.51	73.12
<i>sarA</i>	88.41	81.30
<i>cbh1</i> (65°C)	70.01	81.57
<i>egl1</i> (65°C)	76.75	95.43
<i>egl3</i>	89.89	90.77
<i>bgl1</i> (65°C)	93.50	87.51
<i>bgl2</i> (65°C)	102.08	79.52
<i>cre1</i> (65°C)	88.67	89.63
<i>xyr1</i>	93.38	85.72
<i>sar1</i>	87.06	85.19
<i>sar1</i> (65°C)	79.81	83.62

Anexo 28. Análisis de expresión génica relativa de biopelículas mixtas con respecto a biopelículas simples de *A. niger* y *T. reesei* de dos lotes de cultivo.

Genes	Lote 1		Lote 2		Promedio (Log ₂ FC)	SEM (Log ₂ FC)	
	Fold Change	Log ₂ Fold change	Fold Change	Log ₂ Fold change			
<i>A. niger</i>	<i>cbhB</i>	50.81	5.67	11.96	3.58	4.62	1.04
	<i>eglA</i>	2.00	1.00	5.34	2.42	1.71	0.71
	<i>eglB</i>	0.74	-0.43	0.37	-1.43	-0.93	0.50
	<i>bglA</i>	0.80	-0.32	0.62	-0.69	-0.51	0.18
	<i>bglB</i>	1.26	0.34	0.70	-0.51	-0.08	0.42
	<i>creA</i>	1.04	0.06	0.47	-1.09	-0.52	0.58
	<i>xlnR</i>	1.67	0.74	2.72	1.44	1.09	0.35
<i>T. reesei</i>	<i>cbh1</i>	35.94	5.17	41.57	5.38	5.27	0.10
	<i>egl1</i>	53.63	5.74	64.73	6.02	5.88	0.14
	<i>egl3</i>	12.30	3.62	15.91	3.99	3.81	0.19
	<i>bgl1</i>	35.76	5.16	19.20	4.26	4.71	0.45
	<i>bgl2</i>	33.97	5.09	13.33	3.74	4.41	0.67
	<i>cre1</i>	0.71	-0.49	0.50	-1.01	-0.75	0.26
	<i>xyl1</i>	2.69	1.43	1.73	0.79	1.11	0.32

Proporciones *Fold Change* calculadas a partir de eficiencias con el *software* LinRegPCR. SEM: Error Estándar de la Media. Los genes sobreexpresados más relevantes en recuadro rojo.