



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Aspergillus niger* EN UN SISTEMA MODELO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MELISSA VÁZQUEZ HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, OCTUBRE DEL 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Aspergillus niger* EN UN SISTEMA MODELO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MELISSA VÁZQUEZ HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODALES

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

DIRECTOR

DR. JUAN CAMPOS GUILLÉN

SINODAL

DR. JUAN CABALLERO PÉREZ

SINODAL

DR. ANDRÉS HERNÁNDEZ CRUZ

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Producción de metabolitos y enzimas	1
1.2 Hongos filamentosos: <i>Aspergillus</i>	1
1.2.1 <i>Aspergillus Niger</i>	4
1.3 Producción en fermentación sólida: hallazgos y dificultades	8
1.3.1 Poliuretano como sistema modelo	13
1.4 Expresión diferencial de genes en los sistemas de cultivo	15
1.5 Estudio de la expresión diferencial: ciencias ómicas	17
1.5.1 Transcriptómica	18
1.5.2 Secuenciación	20
1.5.3 Bioinformática	21
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 General	24
3.2 Específicos	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1 Materiales	25
4.2 Métodos	25

4.3 Diseño experimental	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 Crecimiento y determinación de biomasa	30
5.2 Ensayo de la actividad enzimática	35
5.3 Extracción de RNA	36
5.4 Análisis de muestras para secuenciación	38
5.5 Obtención de secuencias	41
5.6 Análisis bioinformático	42
5.7 Comprobación de resultados de la secuenciación por medio de RT-PCR	48
6. CONCLUSIONES	50
7. REFERENCIAS	51
ANEXOS	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales aplicaciones de la fermentación sólida en diferentes sectores económicos.	12
1	Principales aplicaciones de la fermentación sólida en diferentes sectores económicos. Continuación.	13
2	Componentes y concentraciones en el kit de Qiagen OneStep para RT-PCR.	27
3	Programa de corrida de RT-PCR.	28
4	Diagrama de flujo del diseño experimental.	29
5	Biomasa obtenida de cada fermentación cada 24 horas.	32
6	Concentración e integridad del RIN de las muestras antes de secuenciarse.	42
7	Total de fragmentos secuenciados por muestra en cada línea.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura microscópica de <i>A. niger</i> .	3
2	Esquema de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en fermentación sólida sobre poliuretano.	14
3	Fotografías del crecimiento.	30
4	Gráfica de la biomasa obtenida con el peso seco durante el tiempo de crecimiento hasta las 72 horas.	32
5	Microfotografía del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en fermentación sumergida.	33
6	Microfotografía del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en fermentación sólida en poliuretano.	34
7	Ensayo de la actividad enzimática.	35
8	Extracción de RNA de la fermentación sólida en salvado de trigo.	37
9	Geles electroforesis de las extracciones de RNA.	38
10	Gel de electroforesis de las muestras enviadas a análisis de integridad del RNA.	39
11	Valor de integridad del RNA.	40
12	Integridad de las muestras al momento de secuenciarse.	41
13	Resultados de calidad de las secuencias.	43
14	Gráficas de densidad de las comparaciones.	44
15	MA-plot de la expresión diferencial de genes entre la muestra 1 (poliuretano) y la 2 (líquido).	46
16	Expresión diferencial de hidrolasas en las fermentaciones.	47
17	Gel de electroforesis de RT-PCR.	49

RESUMEN

La industria biotecnológica ha crecido de manera exponencial en los últimos años gracias principalmente a la importancia en la producción de enzimas y metabolitos. Uno de los hongos más usados es *Aspergillus niger*, que ha sido empleado tradicionalmente para la producción de ácido cítrico, pero su uso actual se extiende desde la producción de glucoamilasas hasta interferón e interleucinas. La fermentación sumergida ha sido el método por excelencia en la producción de enzimas, sin embargo las limitaciones que conlleva ha provocado la búsqueda de métodos alternativos como la fermentación sólida, la cual permite obtener más proteínas con menores tiempo de cultivo. Debido a la complejidad de los sustratos en la fermentación sólida, se ha buscado el uso de soportes inertes como el poliuretano (PUF), creando un sistema modelo que permite replicar los hallazgos durante la fermentación sólida. Investigaciones previas han permitido determinar el tipo de crecimiento y la producción de proteínas en este soporte, los cuales han demostrado ser diferentes a la fermentación sumergida. Para entender estas diferencias, la transcriptómica es una herramienta necesaria, que junto con la bioinformática pueden descifrar en qué consiste esta diferencia de la producción. El objetivo del presente proyecto es comparar el transcriptoma de tres fermentaciones: una líquida y dos sólidas con diferentes soportes, siendo nuestra hipótesis que habrá una diferencia en la expresión de diferentes genes entre las fermentaciones sólidas y la líquida. Los resultados demostraron una mayor expresión de transcritos codificantes para hidrolasas en la fermentación sólida con poliuretano, así como una mayor actividad enzimática en éste. Concluimos que el uso de este soporte como un método de fermentación podrá traer muchas ventajas tanto en la investigación como en la producción de proteínas en la industria.

1. ANTECEDENTES

1.1 Producción de metabolitos y enzimas

Los metabolitos son los productos del metabolismo celular y sus funciones son diversas. Por siglos la humanidad ha sacado provecho de los microorganismos y sus metabolitos, ya sea en el pan o el queso y en los productos orientales como la salsa de soya. Con el reconocimiento de la biotecnología y el uso de los microorganismos se ha creado una industria donde los principales trabajadores son bacterias, levaduras y hongos (Punt y col., 2002).

El mercado con mejores expectativas en la industria de la fermentación es la producción de enzimas en donde los hongos filamentosos se usan para el 40% de esta producción (Romero y col., 2001; Punt y col., 2002; Rautio y col., 2006). La primer patente para una enzima microbiana purificada se hizo en 1894 por el japonés Jokichi Takamine, quien estableció compañías para la producción de enzimas a partir de hongos filamentosos siendo el principal tipo *Aspergillus* (Bennett, 2010).

1.2 Hongos filamentosos: *Aspergillus*

De forma taxonómica los hongos pertenecen al reino Fungi. La clasificación dentro de éste se basa en el tipo de estructuras que se forman en los ciclos sexuales o asexuales. Estos son: Myxomycota u hongos mucilaginosos, Eumycota u hongos verdaderos y Lichens u hongos simbiontes. Los hongos verdaderos se dividen en Ascomicetos, Basidiomicetos, Ficomietos y Deutoromicetos. El primero y el último son hongos filamentosos (Romero y col., 2001).

Los hongos filamentosos, también conocidos comúnmente como mohos, son organismos eucarióticos. Tienen una pared celular formada por polisacáridos, proteínas y quitina. Su estructura consta de un complejo llamado micelio que está constituido por filamentos, conocidos como hifas, que terminan en punta representando la región de crecimiento y el lugar en donde principalmente se secretan enzimas (Arenas, 2011).

La mayoría de los hongos filamentosos viven de materia orgánica muerta por lo que se conocen como saprófitos, este tipo de vida los ha dotado de una gran diversidad de enzimas hidrolíticas capaces de degradar una gran variedad de materiales de origen muy diverso. En los extremos de las hifas se lleva la asimilación de nutrientes así como la liberación de hidrolasas que sirven para degradar sustratos complejos del medio en el que se encuentran (Romero y col., 2001).

La reproducción se realiza por medio de esporas y puede ser sexuada (teleomorfa) o asexuada (anamorfa) y, aquellos que presentan ambas formas se conocen como holomorfos. La reproducción sexuada o perfecta se produce por la unión de dos núcleos, mientras que la asexuada o imperfecta, se da a partir de un micelio aéreo sin fusión de núcleos (Arenas, 2011).

Para poder vivir deben encontrar en su medio de cultivo lo necesario para su crecimiento y desarrollo: materias nitrogenadas como peptona, azúcares como glucosa o maltosa y un pH ácido. Muchos hongos necesitan vitaminas que suelen encontrarse en las impurezas de la peptona o el azúcar. Algunos elementos como cobre, manganeso, hierro y zinc se han identificado como estimulantes de crecimiento. La temperatura ideal para su desarrollo está entre 20-30°C (Arenas, 2011).

El género *Aspergillus* es el más abundante entre los hongos filamentosos, contiendo más de 250 especies (Archer y Turner, 2006; Meyer y col., 2010). Entre sus especies se han desarrollado modelos convenientes para el estudio de la biología, especies que causan severas enfermedades en humanos y especies importantes en la biotecnología (Archer y Dyer, 2004).

Fue descrito por primera vez en 1729 por el religioso Antonio Micheli, el cual le dio su nombre debido al parecido estructural al aspergillum (Figura 1) usado en la iglesia para dispersar agua bendita (Bennett, 2010; Gibbons y Rokas, 2013).

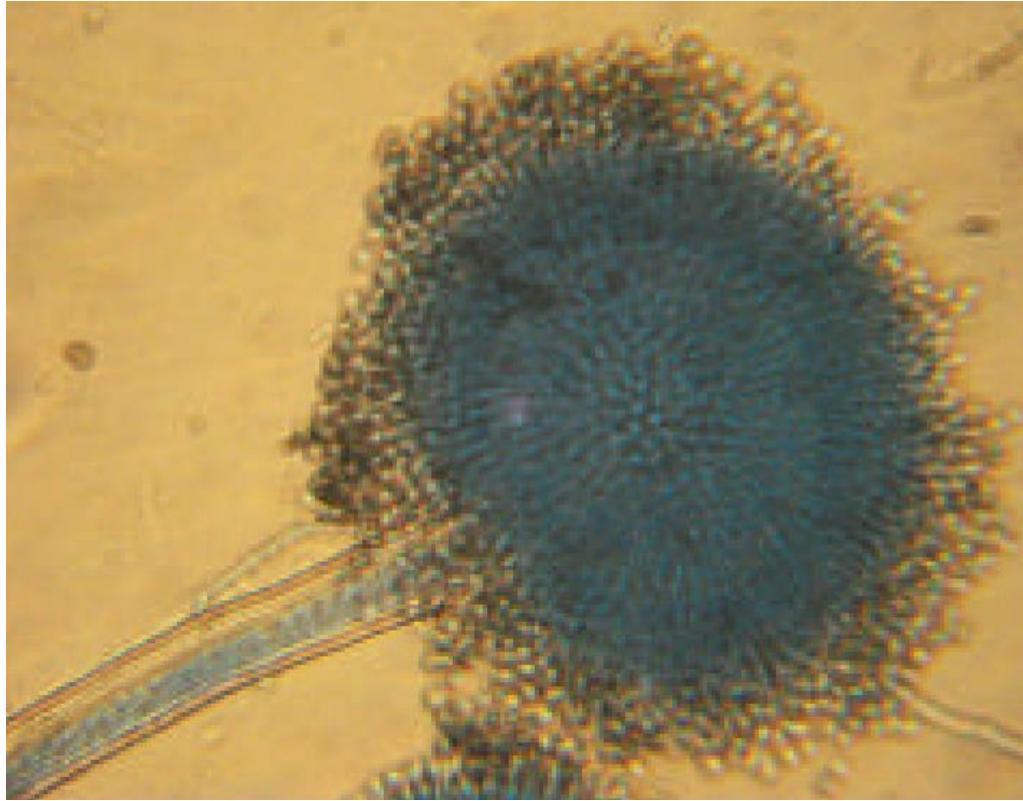


Figura 1. Estructura microscópica de *A. niger*. Dado como ejemplo de la forma de aspergillum de los *Aspergillus* (Gautam y col., 2011).

Las especies en este género pueden ser muy productivas como *Aspergillus niger*, considerado como una “fábrica” biotecnológica celular usada ampliamente en la industria; *Aspergillus nidulans*, que sirve como modelo para el estudio de la genética eucarionte y la biología celular; o las especies que sirven para producir bebidas y salsas como *Aspergillus oryzae*, usado en el sake, y *Aspergillus sojae* en la salsa de soya. Pero así como hay especies productoras, existen otras que causan grandes perjuicios como *Aspergillus fumigatus* que es el responsable del mayor número de muertes por hongos y el segundo más alto en infecciones humanas por hongos; *Aspergillus flavus* es una peste oportunista que contamina campos de cultivo con aflatoxinas, un potente carcinógeno, causando pérdidas y algunas muertes en animales y humanos; *Aspergillus sydowii* es un patógeno de corales el cuál amenaza con destruir el ecosistema marino (Meyer y col., 2011; Gibbons y Rokas, 2013).

Los *Aspergillus* crecen exclusivamente en forma de micelios y debido a sus características fisiológicas y genéticas han sido considerados como organismos ideales tanto para investigación como para la industria (Romero y col., 2001). Los *Aspergillus* secuenciados hasta la actualidad cuentan con 8 cromosomas con un tamaño de genoma de entre 28 y 40 Mb (Gibbons y Rokas, 2013).

Entre sus ventajas se encuentran su fácil manipulación, su capacidad para crecer en medios de bajo costo y su rápido crecimiento (Romero y col., 2001; Andersen y Nielsen, 2009; Bennett, 2010). Las ventajas que tienen sobre las levaduras o las bacterias, como su tipo de glicosilación, llevan a este género un paso más allá en la industria biotecnológica (Punt y col., 2002). Pueden cultivarse en un rango de temperaturas de entre 10 y 50°C, un pH de 2-11, salinidad de 0 hasta 34% , en una actividad de agua de 0.6 a 1 y bajo condiciones oligotróficas (contenido bajo de minerales) o ricas en nutrientes (Meyer y col., 2011).

Desde la pasada década *Aspergillus* ha tenido un periodo de descubrimientos que han resultado en nuevas herramientas y técnicas genéticas, como sistemas de transformación genética eficientes, herramientas genéticas de alto rendimiento y sistemas de expresión para la producción de proteínas (Meyer y col., 2011).

Su diversidad metabólica junto con su importancia en los estudios biológicos, tanto en organismos patógenos o útiles biotecnológicamente, hacen que su investigación continúe. Entre los grupos de *Aspergillus* con mayor interés en la industria y en la investigación se encuentra *Aspergillus niger*.

1.2.1 *Aspergillus Niger*

Aspergillus niger ha sido el sujeto de estudio y de uso industrial por décadas. Su importancia práctica la adquirió en 1919 cuando su habilidad de producir ácido cítrico fue explotada para la industria. Sin embargo, fue hasta los 60s que se volvió una fuente de producción de diferentes enzimas que se han establecido en el procesamiento de frutas, horneados y las industrias alimenticias (Schuster y col., 2002).

Aspergillus niger es un hongo filamentoso ubicuo en el ambiente. Se encuentra en el suelo y en la vegetación participando en el ciclo del carbono. No presenta ciclo sexual por lo que se le incluye en los hongos imperfectos. Su forma vegetativa es blancuzca y en su madurez produce esporas de color negro (Romero y col., 2001; Archer y Turner, 2006; Bennett, 2010). Es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas de 6-47°C siendo el óptimo 35-37°C. Su límite de actividad de agua (Aw) es 0.88, el cual es alto en comparación con otras especies de *Aspergillus* y su pH puede ser de 1.4 hasta 9.8 (Schuster y col., 2002; Gautam y col., 2011).

Tiene una amplia cantidad de enzimas hidrolíticas y oxidativas que sirven para romper la lignocelulosa de las plantas, además almacena xilanos, pectinas, almidón e inulina (Baker, 2006; Jacobs y col., 2009; Jørgensen y col., 2009). Tiene diferentes genes ya sea para proteinasas, glucosilhidrolasas, lipasas y pectinasas, lo que le da la capacidad de degradar los polímeros orgánicos disponibles en su medio ambiente (Archer y Turner, 2006).

En 2005 el genoma de la cepa de *A. niger* ATCC 1015, conocida por ser usada en la primera patente para la producción de ácido cítrico, fue secuenciado después de la aprobación del Departamento de Energía de E.E.U.U (DOE) en el Programa del Genoma Microbiano (MGP, por sus siglas en inglés) (Baker, 2006). Junto con este proyecto se lanzó otro proyecto del marcador de secuencia expresada, o EST por sus siglas en inglés, donde se hizo una biblioteca de *A. niger* creciendo en diferentes condiciones nutricionales (Baker, 2006). El tamaño de su genoma es de 35.5 a 38.5 Mb compuesto de 13 000 genes (Gautam y col., 2011).

Su red metabólica comprende 1190 reacciones bioquímicas únicas, si además se agregan las reacciones de isoenzimas, el total de reacciones llega a ser 2240, con un total de 52 complejos de enzimas. Hasta el 2008, la red llegaba a comprender el metabolismo central del carbono, vías catabólicas para 115 diferentes fuentes de carbono y 23 fuentes diferentes de nitrógeno y también vías anabólicas (Andersen y col., 2008; Gutiérrez-Correa y col., 2012).

A principios de la década de 1960 fue clasificado como GRAS (Generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas en inglés), es decir como organismo seguro, y fue aprobado por la FDA (Administración de comida y medicamentos, por sus siglas en inglés) para su uso en la producción de metabolitos en la industria alimentaria ya que no se registraron casos de intoxicaciones o enfermedades por *A. niger* (Punt y col., 2002; Schuster y col., 2002).

Su capacidad tan alta de secretar enzimas y su alta producción de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, lo ha convertido en un organismo modelo para el estudio de procesos como la producción de proteínas y del metabolismo.

Los principales productos industriales obtenidos por *A. niger* son:

- Ácido cítrico con una producción de hasta un millón de toneladas anuales (Baker, 2006). Es usado como acidificante en la comida y las bebidas, también se ha llegado a usar como citrato de hierro para preservar la sangre y en la industria cosmética se usa como buffer y antioxidante (Schuster y col., 2002; Archer y Turner, 2006; Bennett, 2010; Lu y col., 2010).
- Ácido glucónico: es usado como aditivo en aplicaciones de limpieza de metal así como terapia para las deficiencias de hierro y calcio (Romero y col., 2001; Bennett, 2010).
- Enzimas homólogas: las primeras enzimas producidas por este hongo fueron la pectinasa, proteasa y glucoamilasa. (Schuster y col., 2002).
 - Glucoamilasa: es usada en la industria de alcoholes y jarabes de glucosa.
 - Pectinasas: son usadas en la producción de vinos y jugos de frutas para reducir la viscosidad y mejorar la clarificación.
 - Hemicelulasas: son usadas en las panaderías para aumentar el volumen y darle una mejor estructura a las migas de pan.
 - Catalasas: son usadas en los kits de diagnóstico para la determinación de glucosa y para remover glucosa de alimentos.

- Enzimas heterólogas. Se ha usado como organismo genéticamente modificado para producir glucoamilasas y quimosina, así como Interleucina 6 e interfeirón (Punt y col., 2002; Andersen y col., 2008).
- En el laboratorio es utilizado como modelo de estudio del crecimiento y la secreción de enzimas (Andersen y col., 2008;). Es un organismo modelo para diferentes áreas en la investigación incluyendo los efectos de factores ambientales en la supresión o promoción de la exportación de enzimas, mecanismos críticos para el desarrollo de la fermentación y mecanismos que involucran el control de la morfología en hongos (Baker, 2006).

En la industria se ha desarrollado junto con *A. oryzae* como una fábrica celular para la secreción de proteínas heterólogas. Sus niveles de producción han sido desde apenas detectable hasta niveles comerciales, mejorando su producción con técnicas como la del acarreamiento de la proteína heteróloga con una proteína de la propia cepa (Archer y Turner, 2006). Otro mejoramiento ha sido el uso de promotores propios como el promotor de glucoamilasa *glaA*, que aunque no se entiende por completo su funcionamiento, ha ayudado a tener una mayor producción de proteínas cuando en el medio hay maltodextrosa, maltosa y glucosa (Schuster y col., 2002; Lu y col., 2010). Una ventaja intrínseca frente a bacterias o levaduras es que muestran una glicosilación parecida a la de mamíferos a diferencia de las bacterias y no hiperglicocilan como lo hacen las levaduras (Punt y col., 2002).

En las fermentaciones llevadas a cabo por la industria, la cantidad de biomasa de *A. niger* es muy grande y solía ser desechada, pero hasta años recientes el uso de la biomasa para otros procesos se ha estado desarrollando, tales como, la remoción de colorantes en aguas residuales, la absorción de elementos traza y en la producción de quitina, quitosano y glucosamina (Shahlaei y Pourhossein, 2013).

Debido a esta gran cantidad de productos y los descubrimientos en su genoma, es de esperar que *A. niger* tenga el potencial de ser aún más versátil como una plataforma para la producción de más y mejores productos en el futuro. Incluso ahora

existe el potencial de aumentar el campo de producción gracias a la ingeniería metabólica. Para que esto sea posible el conocimiento del genoma, su expresión y la integración de éstos con la red metabólica, así como la implementación de nuevos sistemas de cultivo, se vuelven herramientas necesarias para la mejora e innovación en la producción.

Las especies de *Aspergillus* son muy buenos candidatos para la producción de proteínas heterólogas y otros metabolitos, siendo *A. niger* y *A. oryzae* los principales productores. Sin embargo, en fermentaciones sumergidas se han visto bajos niveles de proteínas recombinantes ya sea por la secreción de proteasas o por la regulación en la secreción de proteínas. Los cultivos realizados en soportes sólidos han llegado a ser una alternativa para la mejora de la producción.

1.3 Producción en fermentación sólida: hallazgos y dificultades

La fermentación es una conversión biológica de sustratos complejos en compuestos simples por microorganismos como bacterias y hongos (Subramaniyam y Vimala, 2012).

La fermentación sumergida (SmF) es el cultivo de microorganismos dispersos de manera homogénea en un recipiente agitado y/o aireado. Los fermentadores industriales de este tipo pueden llegar a tener un volumen mayor a 10 mil litros. Dos limitantes de esta fermentación es que no es el tipo natural de los hongos y su transferencia de O₂, ya que debido al agua no puede llegar tan fácilmente a la célula (Romero y col., 2001; Viniegra-González y col., 2003; Mienda y col., 2011).

La fermentación en estado sólido (SSF) es el cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso humedecido por el medio líquido en contacto con una interfase aérea. Es utilizado desde el 300 a. C. en oriente para la comida fermentada (Gutiérrez-Correa y col., 2012; Bhargav y col., 2008).

Aunque muchos de los procesos actuales se basan en la fermentación sumergida (SmF), el uso de la fermentación en estado sólido ha demostrado un mejoramiento

en los niveles de enzimas secretadas aunque sus limitaciones hasta ahora son la dificultad de mezclado, el escalamiento, el control de temperatura y pH, así como la recuperación del producto (Punt y col., 2002; Papagianni, 2014).

La SSF se basa en la formación de biopelículas de los organismos, donde la adhesión, colonización y la presencia de matriz extracelular están presentes. La adhesión celular es una característica encontrada en casi cualquier tipo celular. No es un proceso al azar ya que es guiado por diferentes marcadores moleculares de superficie así como características estructurales especiales. Una vez que las células se adhieren a la superficie ocurren varios cambios moleculares, fisiológicos y morfológicos que terminan desarrollando una biopelícula (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

Es importante no confundir las biopelículas con la inmovilización, ya que la primera implica un proceso natural que afecta la cantidad y la calidad del producto buscado. Otra diferencia importante existe entre la misma fermentación en estado sólido, ya que por una parte puede usarse en sustratos sólidos y húmedos pero con ausencia de agua, mientras que, cuando se basa en biopelículas, la fermentación sólida tiene una presencia constante de agua (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

El modelo básico de crecimiento de los hongos en este sistema es una combinación de crecimiento apical con la generación de nuevas hifas por ramificación. Mientras que el crecimiento apical se lleva a cabo de manera lineal, la ramificación se lleva a cabo de manera exponencial y como resultado logra una alta velocidad de crecimiento y una gran capacidad de cubrir eficientemente la superficie de cultivo (Romero y col., 2001). Debido a que no se encuentran en medio líquido, las enzimas excretadas por las hifas no se diluyen y proveen de una manera más eficiente los nutrientes necesarios para el hongo (Romero y col., 2001; Viniegra-González y col., 2003; Papagianni, 2014).

Se ha visto que la SSF da características diferentes al cultivo en comparación con la SmF. Las diferencias son principalmente en el transporte de azúcares, la estructura

y la actividad enzimática (Romero y col., 2001; Punt y col., 2002; Viniegra-González y col., 2003; Gutiérrez-Correa y col., 2012; Subramaniam y Vimala, 2012). Papagianni encontró que la influencia de varios procesos modifica la morfología de los hongos entre el crecimiento en un cultivo sumergido y el adherido, como el micelio y la formación de pellets (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

Debido a los cambios observados entre fermentaciones, se cree que la adhesión celular es el paso inicial para activar la señalización y el mecanismo de expresión diferencial de genes ausentes en la fermentación sumergida. La productividad enzimática en ambos sistemas muestra respuestas diferentes, donde las biopelículas son más productivas y metabólicamente más eficientes. Esto puede explicar también la mayor productividad enzimática de biopelículas que se ha visto en *A. niger* (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

La estructura en que *A. niger* se forma a través de los soportes sólidos permite el paso de los fluidos lo que favorece la transferencia de nutrientes, lo cual explica porque hay un mayor índice de crecimiento en estas fermentaciones. El proceso de formación de las biopelículas se divide en 3 pasos: adhesión, la cual aumenta debido a la hidrofobicidad de las esporas de *A.niger*; el crecimiento inicial y la fase de desarrollo de la germinación de las esporas hasta la colonización de la superficie; y la fase de maduración donde la biomasa se incrementa y la formación de canales que permiten el flujo del medio es evidente. La adhesión de las esporas es debido a proteínas llamadas hidrofobinas, las cuales median la adhesión en los hongos filamentosos y probablemente provocan la generación de señales genéticas (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

Según Raimbault, el soporte donde se realice la fermentación sólida debe cumplir con: una matriz porosa que absorba de dos a tres veces su peso en agua, debe resistir la compresión y el mezclado, y debe estar libre de contaminantes y de inhibidores del crecimiento (Raimbault, 1998).

Hasta la fecha hay muy pocas publicaciones donde se hable sobre la biología molecular y la genómica funcional de las biopelículas, sin embargo resultados en otro tipo de fermentaciones sólidas pueden ser comparables con las biopelículas. En el caso de fermentaciones en estado sólido de *A. niger*, se ha visto material extracelular adherente en esporofitos e hifas maduras, lo que conlleva genes responsables activos (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

Diferentes enzimas han sido producidas por sistemas de biopelículas de *Aspergillus*. La producción de β -fructofuranosidasa por *Aspergillus japonicus* en cubos de fibras vegetales aumentó y fue capaz de sostenerse por 7 días en comparación con la SmF. De igual forma, se ha obtenido 3 veces el volumen de ilunasa producido en SmF por *A. niger* cultivado en piedras Pómez y 6 veces el nivel de amilasa en partículas de mazorca o en poliuretano (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

Hasta el momento las aplicaciones para la fermentación sólida han sido en la producción de ácido láctico por lactobacilos, ácido cítrico con *A. niger*, enzimas como amilasas, lipasas, pectinasas, xilanasas, fitasas y proteasas (Bhargav, 2008; Papagianni, 2014). También se han usado para la producción de compuestos bioactivos como antibióticos, pigmentos, agentes hipercolesterolémicos, y agentes antitumorales (Cuadro 1 y 1.1) (Subramaniyam y Vimala, 2012).

Algunas ventajas que existen en este tipo de fermentación son (Mienda y col., 2011):

- La baja disponibilidad de agua reduce las posibilidades de contaminación por bacterias o levaduras.
- Altos niveles de oxigenación.
- Condiciones similares al hábitat natural de los hongos.
- La inoculación con esporas facilita la dispersión uniforme en el medio.
- Requiere poca energía por lo que reduce costos de producción a nivel industrial.

Cuadro 1. Principales aplicaciones de la fermentación sólida en diferentes sectores económicos (Bhargav, 2008; Mienda y col., 2011).

Sector económico	Aplicación	Ejemplos
Fermentación industrial	Producción de enzimas	Amilasas, glucoamilasas, celulasas, proteasas, pectinasas, xilanasas
	Productos bioactivos	Micotoxinas, giberelinas, alcaloides, antibióticos, hormonas
	Producción de ácidos orgánicos	Ácido cítrico, ácido fumárico, ácido itatónico, ácido láctico
	Biocombustible	Producción de etanol
	Varios	Pigmentos, vitaminas
Industria agroalimentaria	Biotransformación de residuos de cosechas	Comida fermentada, enriquecimiento de proteína, producción de hongos comestibles
	Aditivos alimentarios	Compuestos aromáticos, grasas esenciales y ácidos orgánicos

Cuadro 1. Principales aplicaciones de la fermentación sólida en diferentes sectores económicos. Continuación.

Control ambiental	Biorremediación y biodegradación	Residuos cafeinados, pesticidas, policlorados, bifenoles
	Destoxificación de residuos agroindustriales	Pulpa de café, cáscaras de yuca, harina de canola

Mientras que las desventajas son (Mienda y col., 2011):

- Cuando el soporte es el sustrato puede requerir de pretratamiento.
- Hay dificultades en la determinación de biomasa.
- Es difícil monitorear parámetros como pH, sustrato, oxígeno, etc.
- Es muy difícil la agitación.
- Se necesita una mejor ingeniería en los biorreactores.
- Existe la posibilidad de contaminación por otros hongos.

Los soportes pueden ser naturales como el bagazo de caña o el salvado de trigo, e inertes como la amberlita y el poliuretano. En los soportes naturales es difícil evaluar la influencia de un solo factor debido a todos los sustratos complejos que contienen. En cambio la composición de un soporte inerte como el poliuretano lo hace ideal para el crecimiento de los hongos (Romero y col., 2001; Viniegra-González y col., 2003).

1.3.1 Poliuretano como sistema modelo

El método de fermentación del poliuretano (PUF) impregnado con un medio de cultivo líquido sintético, se basa en la simulación de la composición nutricional y en la

formación de las biopelículas por los hongos. La composición del medio de cultivo es un factor importante ya que influye sobre la diversidad y la calidad de las enzimas.

La composición del PUF lo convierte en un medio ideal para el cultivo de hongos filamentosos ya que permite el crecimiento sobre las trabéculas que se forman en la espuma. No atrapa el agua por lo que no disminuye la actividad de agua del medio de cultivo y no compete con el organismo por el agua libre. Así mismo por su porosidad permite la adhesión de las esporas y su desarrollo (Romero y col., 2001).

La espuma atrapa una gran cantidad de aire por lo que el hongo crece en un medio rico de oxígeno. Ya que los hongos no lo pueden degradar no influye en la inducción o secreción de enzimas o metabolitos y permite determinar de manera adecuada la biomasa producida.

En el 2001, Romero y colaboradores cultivaron *A. niger* en poliuretano estudiando las diferencias de producción de invertasa. Observaron las ventajas de trabajar con poliuretano ya que es un medio limpio que permite el estudio directo de la formación de la biomasa y la síntesis de hidrolasas. También comprobaron que la eficiencia de *A. niger* en este soporte es debido a que su morfología de crecimiento es igual a la del crecimiento en estado silvestre (Figura 2) (Romero y col., 2001).

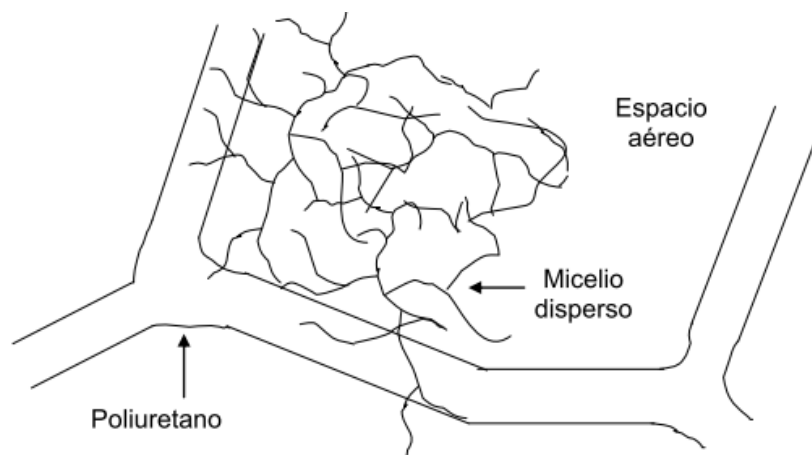


Figura 2. Esquema de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación sólida sobre poliuretano (modificado de Romero y col, 2001).

Se ha encontrado que *A. niger* cultivado en poliuretano dentro de un reactor para la producción de ácido cítrico, actuaba de mejor manera que en la fermentación sumergida, e incluso mejores resultados se obtuvieron cuando había un flujo constante de medio. También se ha logrado producir ácido glucónico en este soporte con buenos resultados comparados con la SmF (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

Aparte de *A. niger* se han usado otros hongos en la producción de metabolitos utilizando el poliuretano como soporte, estos son *Mortierella isabellina* para la producción de ácidos deshidroabiético, abiético e isopimarico, también *Penicillium chrysogenum* para producir penicilina y *Humicola lutea* para desarrollar fosfatasa ácida. Otro tipo de *Aspergillus*, *A. terreus*, produjo dos veces más concentración de ácido itacónico siendo cultivado en PUF con frascos agitados que en la SmF. Incluso se ha visto que biopelículas de *A. niger* o *A. terreus* obtenidas en poliuretano tenían una alta eficiencia en la remoción de metales pesados como cobre o níquel (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

1.4 Expresión diferencial de genes en los sistemas de cultivo

Los microorganismos usados en procesos biotecnológicos se encuentran en cambios ambientales constantes a los que llegan a adaptar su fisiología celular. Estas adaptaciones son gracias a sus capacidades de cambiar la expresión de sus genes según el medio en el que se encuentren.

En el laboratorio y la industria cambios pequeños en el medio como la recolección de muestras o una agitación deficiente resulta en gradientes de nutrientes, los cuales tienen un impacto en la fisiología celular.

El esquema actual de la regulación de genes en hongos está basado en tres elementos: gen regulador, el cual codifica para un producto que regula la transcripción del gen estructural; el promotor, que es un sitio de fijación al DNA para represores o activadores responsables de los niveles basales de la transcripción; y el gen estructural, que es la región de DNA que codifica para una macromolécula (Romero y col., 2001).

Hay dos tipos de regulaciones. La negativa, la cual se presenta en condiciones normales donde el represor está unido continuamente al promotor e impide la transcripción. Y la positiva, donde en presencia de un inductor se promueve la unión de factores de transcripción con el represor y permite la transcripción (Romero y col., 2001).

En el caso de los hongos filamentosos la regulación se realiza a diferentes niveles (Romero y col., 2001; Punt y col., 2002):

- En las secuencias promotoras en la región reguladora de cada uno de los genes.
- En las secuencias de DNA responsables del control por inducción, es decir, donde se unen los activadores o represores.
- Por retroalimentación de una ruta metabólica, en donde la regulación es debido a los genes activados involucrados en una ruta metabólica y que a su vez promueven la expresión de otros genes inducibles.
- En la regulación global por niveles de carbono, nitrógeno, fósforo y oxígeno, la cual es dependiente del medio en el que crece el hongo.

Debido a este tipo de regulaciones, según el tipo de organismo ya sea aerobio estricto, facultativo o anaerobio, la presencia del oxígeno tiene un rol clave en las actividades metabólicas del hongo. *A. niger* es un organismo aerobio estricto por lo que los niveles de oxígeno llegan a afectar su desempeño en la producción de las proteínas (Romero y col., 2001; Masuo y col., 2010), por lo que si afecta esta producción es de esperar que afecte la expresión de los genes en los diferentes tipos de fermentaciones.

La hipoxia (poco oxígeno) y la anoxia (ausencia de oxígeno) son estados de estrés aeróbico para los organismos que necesitan oxígeno. Se ha visto en análisis globales de transcripción que la hipoxia afecta la expresión de genes para la conservación de

la energía y el metabolismo del carbono como respuestas al estrés (Masuo y col., 2010).

Otro tipo de estrés es el denominado estrés de secreción, donde las proteínas, que pueden ser heterólogas, son mal plegadas o secretadas de manera ineficiente y causan un estrés a la célula. Las células eucariontes responden de varias formas al estrés de secreción. La forma más conocida es la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR) la cual se cree que modifica la actividad de la vía de secreción. En *A. niger* y *Trichoderma reesei* se ha visto que este fenómeno ocasiona la represión de genes codificantes para proteínas secretadas (Arvas y col., 2006).

También se ha comprobado que con fuentes de carbono distintas como maltosa o xilosa, donde el transcriptoma de *A. niger* muestra diferencias en la expresión de genes de las vías de secreción durante el crecimiento en maltosa indica que puede adaptar partes de su vía de secreción para manejar la cantidad de proteínas secretadas inducidas por un determinado ambiente (Jørgensen y col., 2009; Lu y col., 2010).

Hay muy pocos reportes en biología molecular y genómica funcional de las fermentaciones sólidas de *Aspergillus*. A pesar de esto ya se han encontrado varios genes sobrerregulados en *Aspergillus oryzae* en la fermentación sólida, así como el transcriptoma de *A. niger* creciendo en telas de poliéster, donde se muestra una expresión en genes de enzimas lignocelulolíticas y genes reguladores (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

1.5 Estudio de la expresión diferencial: ciencias ómicas

La complejidad de la maquinaria celular es un reto para la investigación ya que su regulación puede ocurrir en niveles transcriptómicos, proteómicos o metabolómicos (Andersen y Nielsen, 2009). En los últimos años se han desarrollado las herramientas “ómicas” que buscan entender esta complejidad con el fin de lograr mejorar cepas relevantes en la industria.

1.5.1 Transcriptómica

El RNAm total de una célula en un dado momento constituye un transcriptoma. Una parte del transcriptoma forma el molde para la síntesis de proteínas. La transcriptómica se encarga de estudiar este RNAm total, es decir, la expresión de genes en un determinado momento.

Hasta hace 5 años, al menos 34 transcriptomas de *Aspergillus* fueron publicados usando microarreglos (Punt y col., 2002; Baker, 2006; Archer y Turner, 2006; Andersen y Nielsen, 2009).

En el 2006, el grupo de trabajo de Rautio desarrolló un método de análisis transcripcional llamado Análisis transcriptómico con captura de afinidad (TRAC por sus siglas en inglés) el cual puede realizar un análisis de hasta 96 muestras con diferentes blancos para un análisis de expresión. Esto fue realizado con la idea de que un análisis transcripcional de diferentes marcadores de genes, provee una forma de monitorear eventos fisiológicos provocados por un cambio en el medio de crecimiento del organismo. Se comprobó su uso con 30 marcadores de genes de *Trichoderma reesei*, donde relacionaron la expresión de estos genes con parámetros en el proceso de cultivo como tasas de crecimiento y disponibilidad de nutrientes (Rautio y col., 2006; Rautio y col., 2007). Con estos resultados se comprende que la transcriptómica puede proveer una imagen completa del estado fisiológico de un organismo ocasionado por parámetros externos en los procesos de producción.

En un estudio transcriptómico llevado a cabo en *A. niger* creciendo con maltosa o xilosa como fuentes de carbono, se vio que en el cultivo con maltosa había una sobrerregulación de la transcripción de 90 genes relacionados con las vías de secreción, sugiriendo que la regulación transcripcional de estas vías es un mecanismo fisiológico que ha evolucionado para permitir secretar las enzimas necesarias para degradar el sustrato (Jørgensen y col., 2009).

Los trabajos en transcriptómica de SSF de *A. niger* son limitados, sin embargo se han presentado trabajos interesantes, por ejemplo el equipo de Gutiérrez-Correa que

realizó una evaluación de la expresión de genes de una biopelícula de *A. niger* desarrollada en una tela de poliéster con lactosa como fuente de carbono; encontraron que diferentes genes codificantes para endoglucanasas, celobiohidrolasas y xilanasas eran expresados de manera diferencial comparados con la SmF (Gutiérrez-Correa y col., 2012).

La integración de herramientas “ómicas”, también conocida como biología de sistemas o análisis integral, no es fácil, sobre todo entre proteómica y transcriptómica debido al tiempo de la traducción y la estabilidad de las proteínas, lo que a veces resulta en relaciones no similares o invertidas entre los niveles de RNAm y proteicos que terminan por confundir más al investigador (Rautio y col., 2007; Jacobs y col., 2009; Brink-Jensen y col., 2013). Sin embargo, una vez que se entiendan los factores relacionados, la relación entre proteómica y transcriptómica puede crear las bases para el mejoramiento de cepas.

El equipo de Jacobs logró relacionar el proteoma con el transcriptoma para poder mejorar una cepa de *A. niger* y producir una mayor cantidad de β -glucorinadasa. Correlacionaron las respuestas proteómicas y transcriptómicas en el mismo nivel y en las mismas vías funcionales (Jacobs y col., 2009). En el trabajo de Andersen y colaboradores en el 2008, lograron integrar datos de la literatura para crear una plataforma donde se analiza el genoma y el metaboloma y se integra la información con la literatura de *A. niger*, promoviendo la inclusión de características, las cuales pueden ser desconocidas en los análisis, y pueden revelar los errores que puede haber en el conocimiento del metabolismo. Este modelo permite ligar las reacciones, los genes y los artículos científicos, representando una base de datos del metabolismo de *A. niger* (Andersen y col., 2008).

Las técnicas del estudio de la transcriptómica son qRT-PCR, microarreglos y secuenciación. Gracias al avance en la secuenciación masiva ahora es más accesible hacer un análisis transcripcional de todo el transcriptoma, se conozca el genoma del organismo o no.

1.5.2 Secuenciación

La secuenciación comenzó gracias a la secuenciación de proteínas durante la década de 1945-1955 con la secuenciación de insulina por Frederick Sanger. Sanger abrió las puertas de la secuenciación al campo del código genético aunque no se logró completamente hasta la década de los 70s (Hagen, 2001). La secuenciación estuvo limitada en los 90s por esta técnica basada en la capilaridad. No fue hasta el desarrollo del proyecto del genoma humano que se desarrolló lo que ahora se conocen como técnicas de secuenciación de segunda generación o NGS (Next Generation Sequencing) (Shendure y Ji, 2008).

Las principales plataformas de la secuenciación de segunda generación son: Roche/454 sequencing, Illumina Genome Analyzer (anteriormente conocido como Solexa) y ABI/SOLiD. Aunque su metodología es diferente, todas buscan amplificar hebras de una biblioteca de fragmentos y llevar a cabo reacciones de secuenciación en las hebras amplificadas (Mardis, 2008). Debido a que en este estudio se utilizará el Illumina HiSeq, me enfocaré sólo en explicar éste.

Algo que distingue a la plataforma de Illumina HiSeq, es su forma de preparar la biblioteca en donde hace la amplificación de fragmentos, la cual se conoce como amplificación de base sólida. Consiste en primers sentido y antisentido que están adheridos covalentemente a una superficie, los fragmentos de DNA pueden hibridar con estos primers universales (Metzker, 2010). Durante la amplificación se forman puentes ya que se secuencian de un primer sentido a un primer antisentido.

El Illumina HiSeq, se basa en la secuenciación por síntesis en donde los 4 nucleótidos son agregados simultáneamente a los canales de la placa junto con la DNA polimerasa. Los nucleótidos cargan una base con una etiqueta fluorescente y el grupo 3'-OH está bloqueado químicamente para que sólo haya una incorporación por evento. Se toma la imagen en cada incorporación de nucleótidos. El grupo 3' bloqueado es removido después del lavado para la siguiente incorporación (Mardis, 2008).

Actualmente la plataforma de Illumina es la más utilizada en el mercado y su mayor error son las sustituciones (Metzker, 2010).

La secuenciación masiva produce una inmensa cantidad de datos por lo que es necesario una herramienta eficiente que ayude a analizarlos. La bioinformática se encarga de esto.

1.5.3 Bioinformática

Con estas nuevas herramientas el verdadero reto es saber interpretar y usar toda la información que se obtiene, como Jacobs menciona “la selección efectiva de información es la clave para un mejoramiento exitoso de la cepa” (Jacobs y col., 2009).

El origen de la bioinformática aunque se cree que es reciente inició en los años 60s con la química Margaret Oakley Dayhoff. Ella empezó un programa de lenguaje FORTRAN para determinar las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Los programas deducían las posibles secuencias al sobrelapar las digestiones parciales de la proteína. Ella estableció el *Atlas of Protein Sequence and Structure*, el cual sirvió para establecer *Atlas* como la primer base de datos de la biología molecular (Hagen, 2001).

Dada la gran cantidad de información que se obtenía en la investigación biológica, el uso de las computadoras fue aumentando, lo que generó la nueva ciencia denominada Bioinformática.

La bioinformática es definida por Gerstein como la aplicación de técnicas computacionales para entender y organizar la información asociada a las macromoléculas biológicas. Hay 3 propósitos principales en la bioinformática: organizar la información de manera que los investigadores puedan acceder a ella, desarrollar herramientas y recursos para la ayuda en los análisis de esta información y usar las herramientas para analizar los datos e interpretar los resultados (Gerstein y col., 2001).

En el caso del transcriptoma, la bioinformática permite la anotación y la cuantificación de todos los genes y sus isoformas de determinadas muestras.

RNA-seq se refiere a todos los procedimientos experimentales acoplados a la secuenciación de RNA. En teoría se puede usar para mapear completamente el transcriptoma de todas las células en cualquier estado. En la realidad son necesarias herramientas experimentales y computacionales poderosas para lograrlo (Garber, 2011).

El análisis bioinformático de un transcriptoma se basa de manera general en el alineamiento del transcriptoma o el ensamblaje en unidades de transcripción y en la cuantificación de la expresión. Existen diferentes herramientas bioinformáticas para lograr estos propósitos, el uso de ellas depende del tipo de material biológico de estudio así como las metas del estudio (Garber, 2011).

En nuestro caso, al ser un organismo eucariote, utilizamos un protocolo denominado Tuxedo-tools. Este protocolo consiste en 4 programas: Bowtie, el cual indexa el genoma para un mapeo rápido (Trapnell y col, 2012), Tophat, el cual mapea las secuencias permitiendo intrones dentro del RNA a un genoma utilizando Bowtie (Trapnell y col, 2012); el paquete Cufflinks consiste a su vez en 4 programas: Cufflinks, ensambla transcritos, Cuffcompare, compara los transcritos a las anotaciones, Cuffmerge, que tiene la capacidad de mezclar dos ensamblajes y Cuffdiff que puede encontrar la expresión diferencial, así como uso de promotores. Para poder visualizar estos datos en gráficas, la última herramienta se llama CummeRbund (Trapnell y col, 2012).

Con el fin de interpretar los resultados de la secuenciación masiva el uso de la bioinformática es imprescindible en estos estudios.

Actualmente en el estudio de las fermentaciones sólidas hay una “black box” o vacío de información en lo que respecta a la bioquímica de los microorganismos en estos procesos. La búsqueda de la información que llene este vacío logrará mejorar los procesos y expandir las aplicaciones de este tipo de fermentación.

2. HIPÓTESIS

Existe una diferencia en la expresión de transcritos, determinados por secuenciación masiva, en las fermentaciones sólidas y la fermentación sumergida.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Analizar la expresión genética (transcriptoma) de *Aspergillus niger* en un sistema modelo de fermentación sólida.

3.2 Específicos

- Evaluar la producción enzimática de *A. niger* en tres sistemas de fermentación: sólida en salvado de trigo, sólida en poliuretano y sumergida.
- Evaluar la expresión de RNA mensajeros de *A. niger* en tres sistemas de fermentaciones distintas (cultivo sumergido, fermentación sólida y cultivo inmovilizado sobre poliuretano), a través de análisis transcriptómico.
- Diseñar los perfiles de expresión de *A. niger* en tres sistemas de fermentaciones distintas (cultivo sumergido, fermentación sólida y cultivo inmovilizado sobre poliuretano), con el uso de programas bioinformáticos.
- Identificar los RNAm expresados diferencialmente por *A niger* en tres sistemas de fermentaciones distintas (cultivo sumergido, fermentación sólida y cultivo inmovilizado sobre poliuretano).

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

Microorganismos: se utilizó la cepa silvestre de *A. niger* N402 almacenada en el laboratorio, la cual está conservada por medio de deshidratación.

Medios de cultivo: se utilizará el medio de cultivo mínimo para *A. niger*. Con sales 50x (NaNO₃, KCl, MgSO₄), buffer de fosfatos 1 M (K₂HPO₄, KH₂PO₄), elementos traza (Na₂B₄O₇, CuSO₄, FeCl₃, MnSO₄, NaMoO₄, ZnSO₄) y como fuente de carbono se utilizará almidón (10%) con un pH de 6.4. Se esterilizó por autoclave a 15 psi por 15 minutos.

Preparación del poliuretano: se cortó en cubos de 5 mm por lado y se lavó 3 veces con agua hirviendo. El poliuretano ya lavado se escurrió y se secó en un horno a 70°C durante toda la noche. A matraces de 250 mL se les agregó 1 gr de poliuretano seco.

Obtención y preparación del salvado: el salvado se obtuvo en El Molino en el Mercado de La Cruz. No se le hicieron lavados. A cada matraz se le agregaron 10 gr de salvado.

Para la extracción de RNA no se hizo uso de ningún kit comercial. Fue necesario nitrógeno líquido y TRIzol. Para el RT-PCR se utilizó el kit de Qiagen OneStep.

Los equipos necesarios para los experimentos fueron: autoclave, incubadora, estufa, balanza, centrifuga refrigerada, NanoDrop, Cámara y equipo de electroforesis y Termociclador.

4.2 Métodos

Obtención de la cepa: Los cultivos se reactivaron en viales de 10 mL de PDA. De éstos, se inoculó en matraces de 125 mL con PDA y se dejaron en crecimiento al menos por 72 horas.

Recuperación de esporas: de los matraces de PDA se recuperaron las esporas al levantarlas con Tween 20. Se hizo conteo de esporas en la Cámara de Neubauer, con un aumento de 40x.

Inoculación del medio: con una concentración final de esporas de 2×10^7 /gr carbono se inocularon los medios ya estériles.

Fermentación sumergida: como punto de comparación se utilizará la fermentación líquida en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad, llenos con 25 mL de medio ya inoculado. Se cultivarán a 30°C a 150 r.p.m., durante 0, 24, 48 y 72 horas hasta saber la hora del punto fisiológico antes de la esporulación.

Fermentación sólida con poliuretano: 25 mL de medio inoculado se mezclaron con 1 gr de poliuretano estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se siguió el mismo tipo de incubación que en la fermentación sumergida pero sin agitación y por el mismo tiempo. Se estuvo agitando manualmente cada 12 horas para mantener homogeneidad.

Fermentación sólida con salvado de trigo: 25 mL de medio inoculado se mezclaron con 10 gr de salvado de trigo estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se incubaron a 30°C sin agitación por el mismo tiempo que las otras dos fermentaciones. También se agitaron cada 12 horas.

Determinación de la biomasa en fermentación líquida: Los cultivos de fermentación líquida se retiraron en los tiempos adecuados (0, 24, 48 y 72 horas) y se filtraron a través de papel filtro Whatman No.1. La biomasa retenida se lavó con 100 mL de agua destilada y dejó secando a 70°C por una noche. El papel filtro seco fue pesado.

Determinación de la biomasa de fermentación sólida: El poliuretano utilizado para el crecimiento del hongo se extrajo del matraz y se presionó para obtener el extracto de fermentación sólida en un embudo con una tela no absorbente. Se lavó dos veces con 100 mL de agua destilada, se exprimió y se secó a 70°C por una noche para determinar la fracción de peso seco perteneciente a la biomasa. El salvado de

trigo recibió el mismo tratamiento pero con un total de 250 mL de agua destilada durante los lavados.

Análisis de la actividad enzimática: se realizó un análisis de la actividad de la glucoamilasa por medio del método de DNS en los 3 tipos de fermentaciones.

Extracción de RNA: una vez obtenido el tiempo estimado de crecimiento de las tres fermentaciones, se crecieron los cultivos del mismo modo anterior pero se extrajeron a las 0 y 40 horas, para salvado y poliuretano, y 48 horas, para líquido. Las biomásas obtenidas se filtraron igual que en el procedimiento anterior y se congelaron con nitrógeno líquido y se trituraron. Se utilizó el protocolo de TRIzol para la extracción pero se modificaron unos pasos, gracias a la ayuda del Dr Cruz, como el tiempo de centrifugación y los lavados.

Obtención de secuencias: las muestras de RNA se mandaron al Langebio donde se utilizó el CHIP agilent RNA nano para ver la integridad del RNA. Al comprobar la integridad se secuenciaron las muestras con el equipo HiSeq2000.

Cuadro 2. Componentes y concentraciones en el kit de Qiagen OneStep para RT-PCR.

Componentes	Volumen (50 uL)	Volumen (25 uL)
Buffer 5x	10 uL	5 uL
dNTP mix	2 uL	1 uL
Primers	6 uL	3 uL
Enzyme mix	2 uL	1 uL
RNA	1 uL	0.5 uL
Agua estéril	29 uL	14.5 uL

Bioinformática: se descargaron dos archivos de la página [http:// fungi.ensembl.org](http://fungi.ensembl.org), de los cuales uno contenía el genoma y el otro las anotaciones. Los archivos recibidos del Langebio se encontraban en formato .fastq los cuales fueron analizados para ver su calidad por el programa FASTQC. Los resultados obtenidos fueron analizados con el protocolo Tuxedo-tools, donde se indexó el genoma de *Aspergillus niger ATCC1015* con Bowtie2, las secuencias se mapearon al genoma con el programa Tophat, con el cual también se hicieron las anotaciones de los genes obtenidos. Los genes diferenciales se obtuvieron con el programa Cuffdiff y para obtener los genes con un valor confiable de expresión se utilizó el parámetro de fold change ≥ 2 . Para graficar los resultados obtenidos se utilizaron las herramientas de cummeRbund. En el anexo 1, se muestran los comandos usados para realizar el análisis.

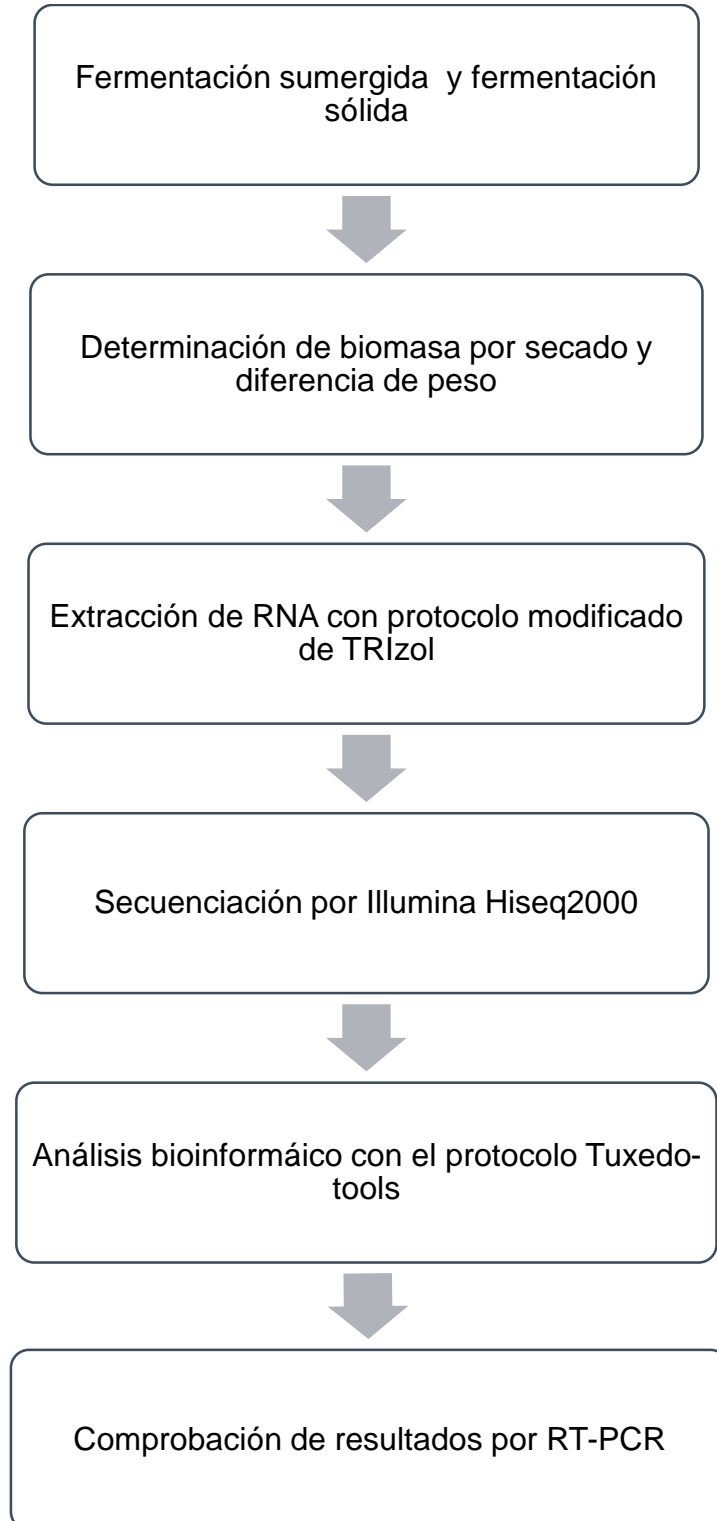
Cuadro 3. Programa de corrida de RT-PCR.

	Tiempo	Temperatura
Retrotranscripción	30 min	55°C
Activación	15 min	95°C
3 step (35x)		
Desnaturalización	45 s	94°C
Alineamiento	45 s	60°C
Extensión	1 min 30 s	72°C
Extensión final	10 min	72°C

RT-PCR: se usó el kit de Qiagen OneStep RT-PCR con los genes de tubulina, xilanasasa B, invertasa y glucoamilasa. Se hizo un gradiente de tubulina para poder hacer un análisis semicuantitativo. Se siguió el protocolo del kit (Cuadro 2) con el programa indicado en el Cuadro 3. Las reacciones se hicieron a 25 uL.

4.3 Diseño experimental

Cuadro 4. Diagrama de flujo del diseño experimental.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Crecimiento y determinación de biomasa

Aspergillus niger se cultivó usando medio mínimo con almidón como fuente de carbono y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno; los oligoelementos se añadieron con la formulación de Hutner. Los cultivos se hicieron con 25 mL de medio de cultivo en todos los casos; para fermentación sumergida se usaron matraces Erlenmeyer de 125 mL y de 250 mL para la fermentación sólida en poliuretano y en salvado de trigo. Los matraces para la fermentación sólida en poliuretano contenían 1 gr de poliuretano mientras que para la fermentación sólida en salvado de trigo contenían 10 gr de salvado de trigo.

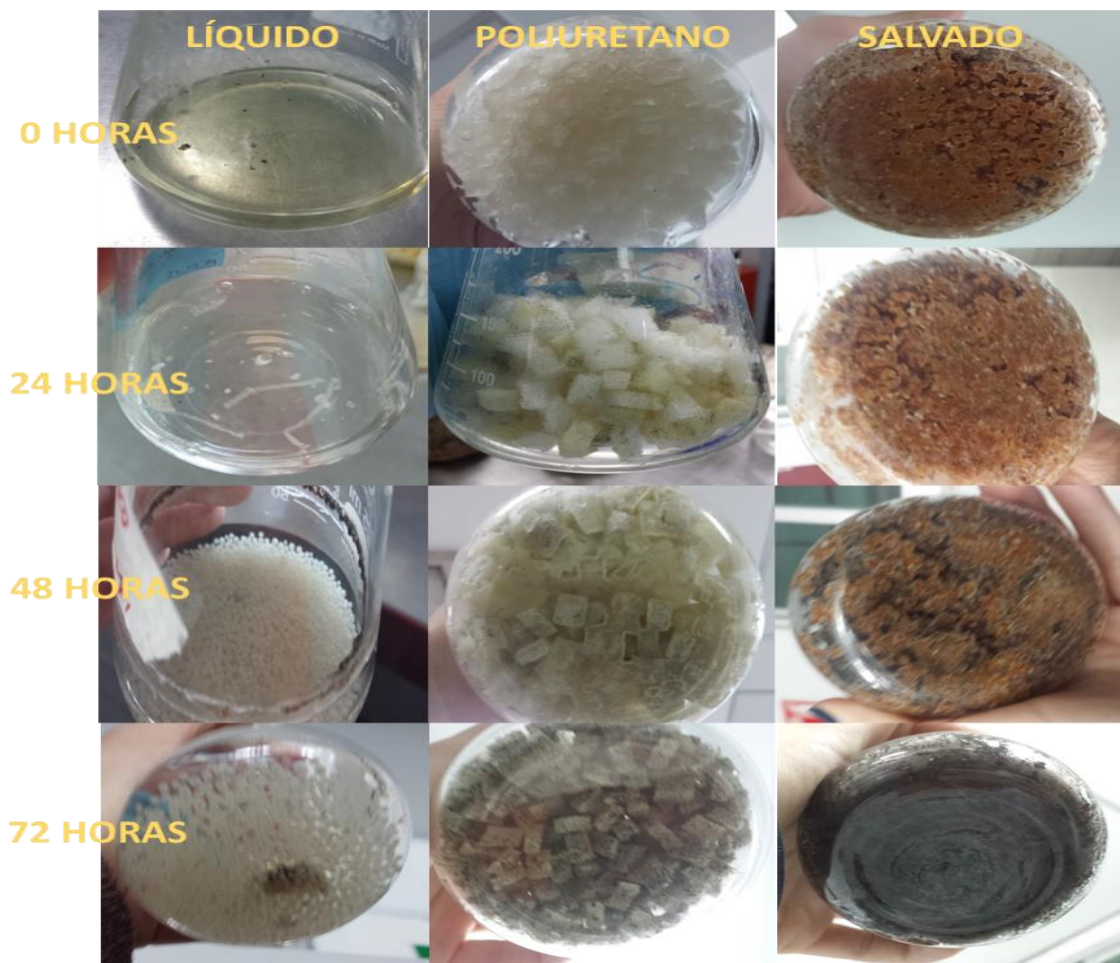


Figura 3. Fotografías del crecimiento. En las 3 fermentaciones como se indica en la izquierda, a las 0, 24, 48 y 72 horas.

En las primeras pruebas no se obtuvo crecimiento por lo que el pH se modificó de 5.4 a 6.4, con lo que se obtuvo crecimiento. Para aumentar el crecimiento, el almidón se aumentó de 10 g/L a 100 g/L en base a las referencias de crecimiento en fermentación sólida. Una vez hechas estas modificaciones se consiguió un crecimiento suficiente para la extracción de RNA.

Los cultivos de todos los sistemas de fermentaciones se incubaron a 30°C durante 0, 24, 48 y 72 horas, los matraces para la fermentación sumergida se agitaron a 150 rpm. En todos los casos se tomaron fotografías antes de cosechar cada muestra y estas se muestran en la Figura 3 donde puede observarse que en la fermentación sumergida se obtuvo un crecimiento en forma de pellet con esporulación entre las 48 y 72 horas; mientras que en las fermentaciones sólidas en poliuretano y en salvado de trigo se observó un crecimiento micelar disperso. El tiempo de crecimiento entre las fermentaciones sólidas fue parecido con la esporulación cercana a las 42 horas de incubación, concordando con lo reportado por Romero y colaboradores quienes reportan este tiempo como el momento en que se obtiene la biomasa máxima en la fermentación sólida y se da inicio la esporulación (Romero y col. 2001). Algo que se observó únicamente en el cultivo de fermentación sólida en salvado de trigo fue la aparición de mucilago a las 48 horas, el cual puede ser resultado de la degradación del almidón y otros carbohidratos complejos que se encontraban en el salvado de trigo.

La determinación de biomasa se realizó por duplicado para los tres sistemas de fermentaciones. Las muestras se filtraron con papel filtro Whatman #1 previamente secado y con peso conocido, el retenido de cada muestra se dejó secando toda la noche a 70°C y se pesó; la cantidad de biomasa producida se calculó por diferencia de peso entre el papel filtro más el retenido y el peso del papel filtro solo. El líquido filtrado se guardó para el análisis de la actividad enzimática. En el Cuadro 5 se pueden ver los promedios de los pesos, mientras que en la Figura 4 se observa la gráfica donde se hace la comparación entre la formación de biomasa durante 0, 24, 48 y 72 horas en cada fermentación.

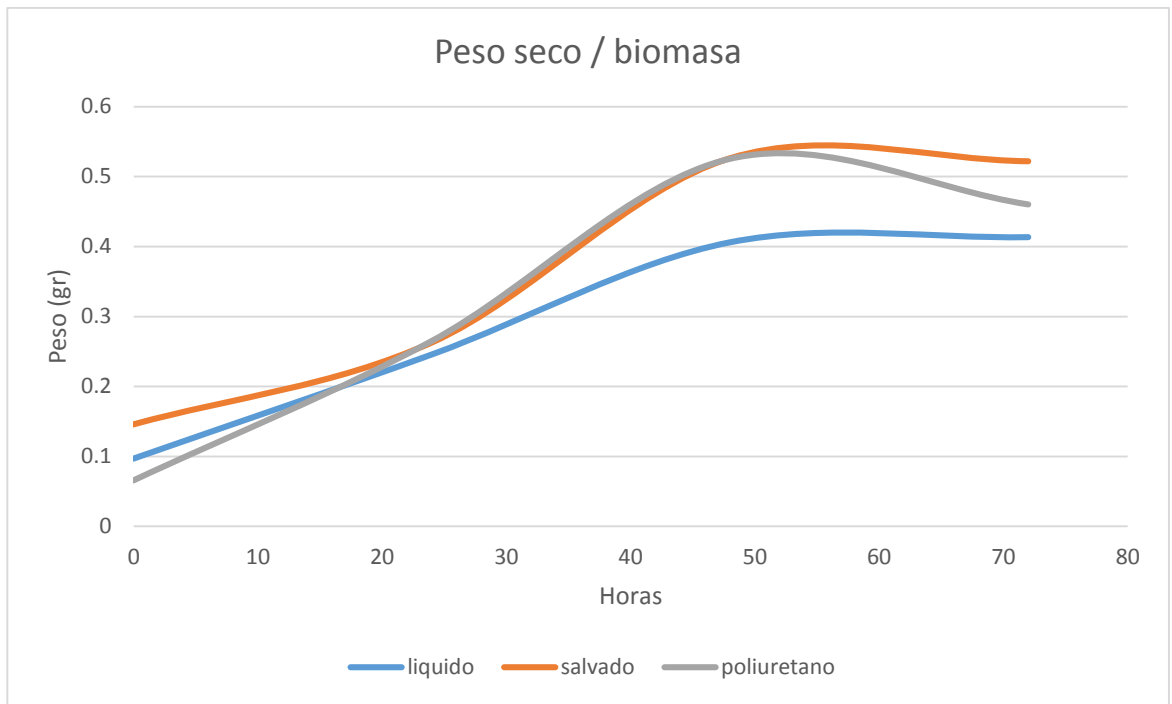


Figura 4. Gráfica de la biomasa obtenida con el peso seco durante el tiempo de crecimiento hasta las 72 horas.

La biomasa obtenida fue mayor en la fermentación sólida en salvado de trigo como se esperaba debido a la mayor cantidad de nutrientes presentes en el medio mas el soporte, a continuación se encontró el crecimiento en poliuretano y por último la fermentación sumergida; la mayor acumulación de biomasa en las fermentaciones sólidas se atribuye a la mayor disponibilidad de oxígeno, en especial en la fermentación sólida en poliuretano (Romero y col., 2001). Se puede notar una disminución en el peso de la biomasa de la fermentación sólida en poliuretano después de las 48 horas, esto es debido al inicio de la esporulación.

Cuadro 5. Biomasa obtenida de cada fermentación cada 24 horas.

HORAS	Liquido (gr)	Salvado (gr)	Poliuretano (gr)
0	0.096825	0.14565	0.0658
24	0.24565	0.26275	0.2651
48	0.406	0.52645	0.5256
72	0.413375	0.52215	0.46035

La diferencia en los resultados de biomasa se han atribuido al tipo de crecimiento que tiene *A. niger* en la fermentación sólida donde crece como micelio disperso que tiene intercambio con una mayor cantidad de oxígeno a diferencia del crecimiento en fermentación sumergida donde, como se muestra en la Figura 3, el tipo de crecimiento de *A. niger* es en forma de pellet. El crecimiento en forma de pellets sumergidos en agua limita la cantidad de oxígeno al que tiene acceso el hongo y por lo tanto su capacidad de crecimiento. En la Figura 5 obtenida de la tesis doctoral del Dr. Romero, se observa que a las 12 horas del cultivo hay un crecimiento en forma de micelio disperso y a las 24 horas ya se empieza a ver un compactamiento en el micelio que parece ser el centro del crecimiento para etapas posteriores. Conforme va creciendo el micelio, en la orilla se nota menos compacto mientras que en el centro se puede ver de un color oscuro. Al crecer en forma de pellet, el hongo crea un centro anaerobio, dando como resultado que sólo haya crecimiento aeróbico en la periferia del pellet, provocando la activación de otras rutas metabólicas que disminuyen el rendimiento de la biomasa y la producción de proteínas (Romero y col, 2001).

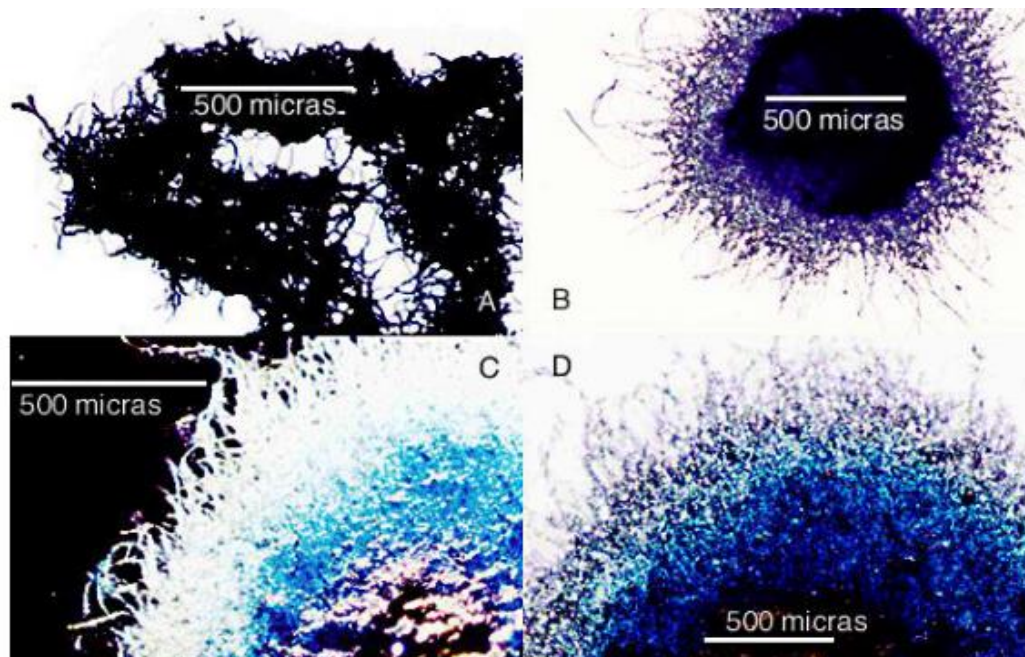


Figura 5. Microfotografías del crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación sumergida. Cultivos con 100 g/l de sacarosa inicial; A) A 12 horas de crecimiento (100x), B) A 24 horas de crecimiento (100x), C) 48 horas de crecimiento (100x), D) 60 horas de crecimiento (100x). (Microfotografía obtenida de Romero y col., 2001).

En la Figura 6, obtenida de la tesis doctoral del Dr. Romero, se observa el crecimiento de *A. niger* sobre poliuretano; en las primeras horas de crecimiento se observa el poliuretano antes del crecimiento del micelio, con las trabéculas limpias. Mientras va pasando el tiempo y el micelio va creciendo, *Aspergillus niger* forma puentes entre las trabéculas y se ancla al poliuretano. A las 36 horas, se empiezan a formar redes de micelio en el espacio entre las trabéculas y a las 42 horas el micelio ya ocupa todo el espacio disponible en el poliuretano, lo que provoca el inicio de un ambiente anareobio y que, junto con el agotamiento del almidón, induce la esporulación (Romero y col, 2001).

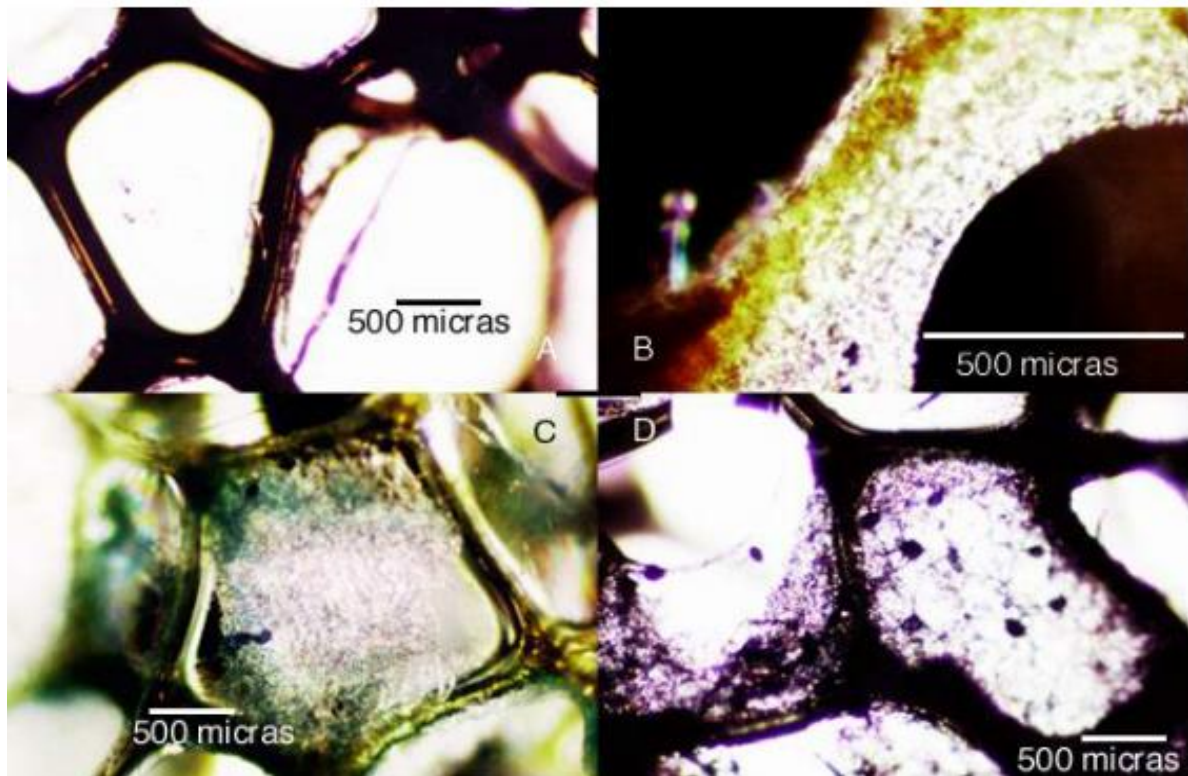


Figura 6. Microfotografías del crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación sólida en poliuretano. Cultivos con 100 g/l de sacarosa inicial; A) A 12 horas de crecimiento (100x), B) A 24 horas de crecimiento (400x), C) 48 horas de crecimiento (100x), D) 60 horas de crecimiento (100x). (Microfotografía obtenida de Romero y col., 2001).

Los tiempos de esporulación y el tipo de crecimiento que se obtuvieron fueron similares a los obtenidos por Romero y colaboradores (Romero y col., 2001), lo que soporta los resultados obtenidos en el crecimiento. Por estos resultados se decidió

utilizar muestras de las fermentaciones sólidas en salvado de trigo y en poliuretano a las 40 horas y de fermentación sumergida a las 48 horas para evitar la esporulación y poder realizar la extracción con la mayor cantidad de biomasa posible.

5.2 Ensayo de la actividad enzimática

Una vez obtenidos los resultados de la biomasa se comparó la producción de la glucoamilasa y la relación entre el crecimiento y la actividad de cada tipo de fermentación. Se realizó el análisis de la actividad enzimática por duplicado de cada muestra de las fermentaciones cada 24 horas desde las 0 horas hasta las 72 horas. Para realizar el ensayo se utilizaron los líquidos filtrados de las mismas muestras de las fermentaciones usadas para el análisis de biomasa.

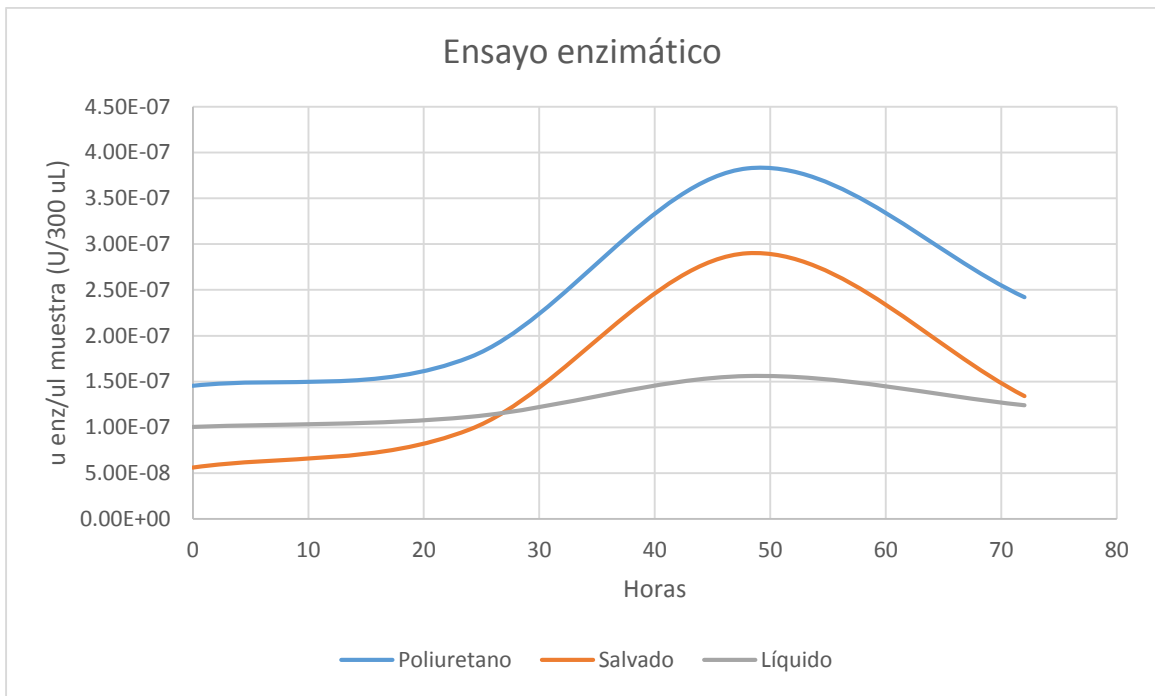


Figura 7. Ensayo de la actividad enzimática. La actividad enzimática está dada en unidad de actividad enzimática por uL de muestra (U/uL).

De cada líquido filtrado se tomaron 300 uL de cada hora (0, 24, 48 y 72 horas), y se utilizó el método para el análisis de actividad enzimática con DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) el cual reacciona con los azúcares reductores liberados por la glucoamilasa. Para comprobar la producción de glucoamilasa, se usó la absorbancia de los azúcares reductores con el DNS y la curva patrón de glucosa para saber la

concentración de azúcares libres y determinar la actividad enzimática de los líquidos filtrados. Los resultados se reportaron como unidad de actividad enzimática por uL de muestra.

Al comparar las Figuras 4 y 7, es fácil notar que parece existir una relación entre la acumulación de biomasa y la producción enzimática, ya que en todos los casos se alcanza el valor máximo de producción enzimática y valores de biomasa a las 48 horas en los 3 sistemas de fermentaciones; esta misma correlación entre biomasa y producción enzimática está reportada por Romero y colaboradores en relación a la biomasa de fermentación sumergida y fermentación sólida en poliuretano y la producción de invertasa (Romero y col., 2001).

Se observó que la actividad de glucoamilasa es mayor en las fermentaciones sólidas que en la fermentación sumergida, siendo la fermentación sólida en poliuretano la que tuvo una producción de glucoamilasa mayor, a continuación se encontró la producción de glucoamilasa de la fermentación sólida en salvado de trigo y por último de la fermentación sumergida; la diferencia de producción de glucoamilasa en las fermentaciones sólidas puede atribuirse a la diversificación de la producción enzimática por *A. niger* relacionada al rompimiento de la pared celular del salvado de trigo (Jørgensen y col., 2009).

5.3 Extracción de RNA

Las muestras de las fermentaciones para extracción se sacaron según la hora establecida anteriormente (fermentaciones sólidas a 42 hrs, fermentación sumergida a 48 hrs). La primera extracción de RNA se hizo con la fermentación de salvado de trigo de 42 horas siguiendo el protocolo desarrollado por el Dr. Cruz en base a la extracción con TRIzol. Como se ve en la Figura 8, no se obtuvo RNA de las primeras muestras, por lo que se modificó el protocolo aumentando el tiempo y la velocidad de centrifugación así como el número de lavados con cloroformo-isoamílico y fenol-cloroformo-isoamílico. Las muestras de fermentación sólida en poliuretano se lavaron dos veces (una con cada solvente), las muestras de fermentación sumergida sólo se lavaron una vez con cloroformo-isoamílico y las muestras de fermentación sólida en

salvado de trigo se lavaron dos o tres veces (dos veces con cloroformo y una con fenol). Todas las muestras fueron lavadas dos veces con etanol en la última etapa de extracción, lo cual provocó que las extracciones de RNA tuvieran un mayor rendimiento.

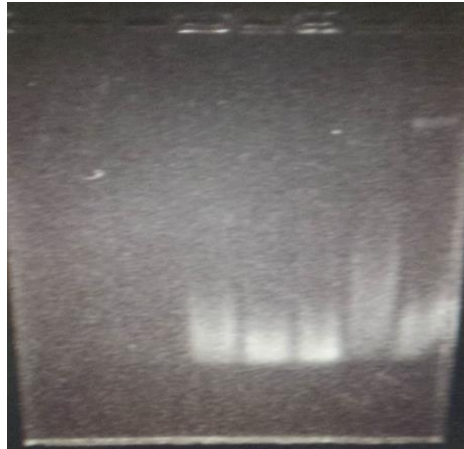


Figura 8. Extracción de RNA de la fermentación sólida en salvado de trigo. Los 5 pozos son extracción de la fermentación de salvado hecha en Amazcala con el Dr. Cruz.

En Figura 9 se muestra una combinación de geles de las extracciones de RNA. A la izquierda de la imagen se observa el gel de electroforesis de una extracción de fermentación sólida en salvado de trigo, donde se puede ver la gran cantidad de contaminación que hay a pesar de los múltiples lavados, esto se le atribuye a la presencia del salvado de trigo, ya que contiene muchos azúcares que pueden contaminar durante todo el proceso de extracción de RNA. En el lado derecho de la imagen se puede ver el gel de corrida de la extracción de RNA de la fermentación sumergida, donde a comparación de las fermentaciones sólidas, el brillo de las bandas es mucho mayor, lo que concuerda con la concentración obtenida en el Nanodrop (arriba de 1000 ng/uL). Pero, a diferencia de las otras extracciones de RNA, la extracción de RNA de la fermentación sólida en poliuretano, como se ve en la imagen de en medio de la Figura 7, resultó en un gel de electroforesis claro con 4 bandas de visibles de RNA, dos de las cuales se suponen pertenecen a RNAr, esto es debido a que el poliuretano es inerte y no tiene otras sustancias que puedan

afectar la extracción de RNA, al mismo tiempo que permite obtener un mayor cantidad de biomasa de la cual iniciar la extracción.

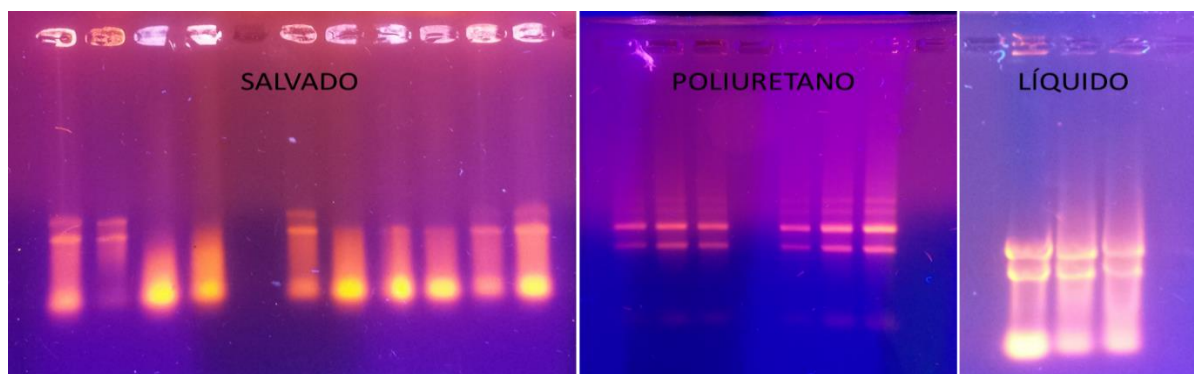


Figura 9. Geles de electroforesis de las extracciones de RNA.

5.4 Análisis de muestras para secuenciación

En la Figura 10 se observa el gel corrido por el LANGEBIO de las muestras de extracción de RNA que se enviaron para el análisis de integridad. Se mandaron 2 muestras de extracción de RNA de fermentación sumergida (LIQ2 y UAQ1), 4 muestras de extracción de fermentación sólida en salvado de trigo (S1.1B*, S1.2B*, S2.1B' y UAQ2) y 5 muestras de extracción de RNA de fermentación sólida en poliuretano (P1.1C, P1.2C, P2.2C, UAQ3 y P2.1C).

Las muestras con las iniciales “UAQ” se enviaron un mes antes que el resto de las muestras. La muestra LIQ2 se obtuvo en la primer ronda de extracción de RNA de la fermentación sumergida. El resto de las muestras se obtuvieron de la misma ronda de extracciones de RNA. Las muestras S1.1B* y S1.2B* se extrajeron del mismo matraz de fermentación sólida en salvado de trigo y se realizaron 3 lavados con solventes en ellas, en el caso de la muestra S2.1B' se hizo de otro matraz de fermentación sólida en salvado de trigo y sólo se realizaron 2 lavados con solventes en ella. En el caso de las extracciones hechas en la fermentación sólida en poliuretano las muestras P1.1C y P1.2C se tomaron del mismo matraz así como las muestras P2.1C y P2.2C se tomaron de otro. Las concentraciones de RNA fueron superiores siempre en la fermentación sumergida con valores mayores a los 1000 ng/uL con una relación de 260/280 de absorbancia mayor a 1.7, las muestras de

extracciones de RNA de las fermentaciones en salvado de trigo eran cercanas a los 1000 ng/uL pero en casi todos los casos tenían una relación 260/280 de absorbancia por debajo de 1. En el caso de la concentración de RNA de las extracciones hechas en las fermentaciones sólidas en poliuretano se encontraba entre 200 a 400 ng/uL, con una relación 260/280 de absorbancia mayor a 1 pero que pocas veces alcanzaba 1.8. La ventaja aparente en la extracción de RNA en la fermentación sumergida se atribuye a que no tuvo lavados extras en los que se pudiera perder RNA ni tampoco la acumulación de solventes con los lavados hechos.

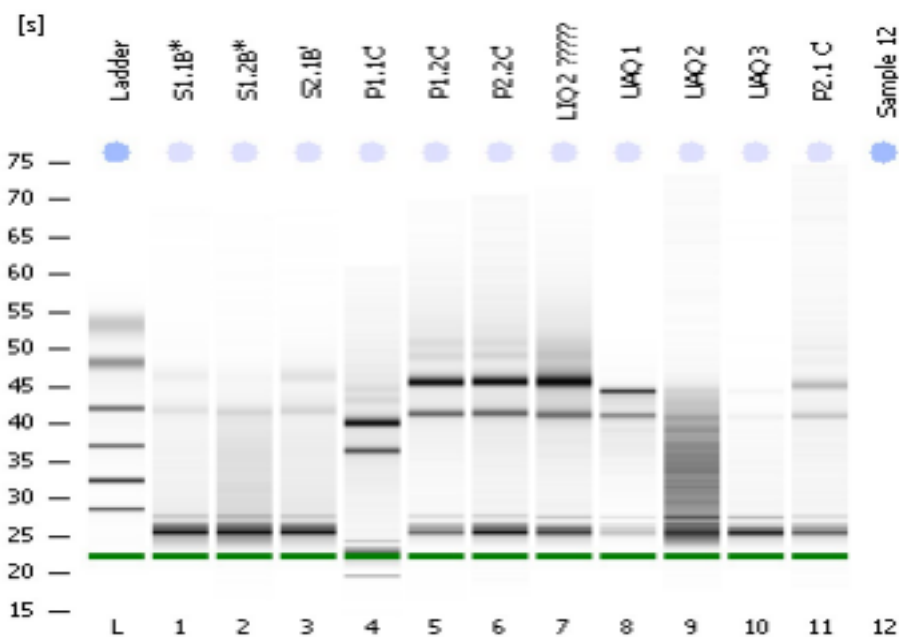


Figura 10. Gel de electroforesis de las muestras enviadas a análisis de integridad del RNA. Las muestras de salvado son: S1.1B*, S1.2B*, S2.1B' y UAQ2; las de poliuretano son: P1.1C, P1.2C, P2.2C, UAQ3 y P2.1C; las de líquido son: LIQ2 y UAQ1. La muestra 12 fue un control negativo.

La integridad de las muestras de extracción de RNA se analizó por el LANGEBIO por medio del CHIP agilent RNA nano para verificar la integridad del RNA (RIN). En la Figura 11 se puede ver el análisis de todas las muestras y sus respectivas gráficas. Para que las muestras sean aptas para la secuenciación deben tener un valor de RIN mínimo de 7; desafortunadamente ninguna de las muestras de RNA de la fermentación sólida en salvado de trigo alcanzó ese valor. Esto pudo ocurrir por la contaminación debida a la presencia de azúcares residuales del salvado de trigo así

como la dificultad que se tuvo para la extracción de RNA. También es probable que en el tiempo de transporte del laboratorio en Querétaro al LANGEBIO en Irapuato, así como el tiempo de espera que hubo para el análisis, hayan permitido la degradación del RNA de las muestras. Algo que podría aumentar la eficiencia en la extracción son los kit de extracción de RNA de plantas como los utilizados por de Souza (de Souza y col., 2011).

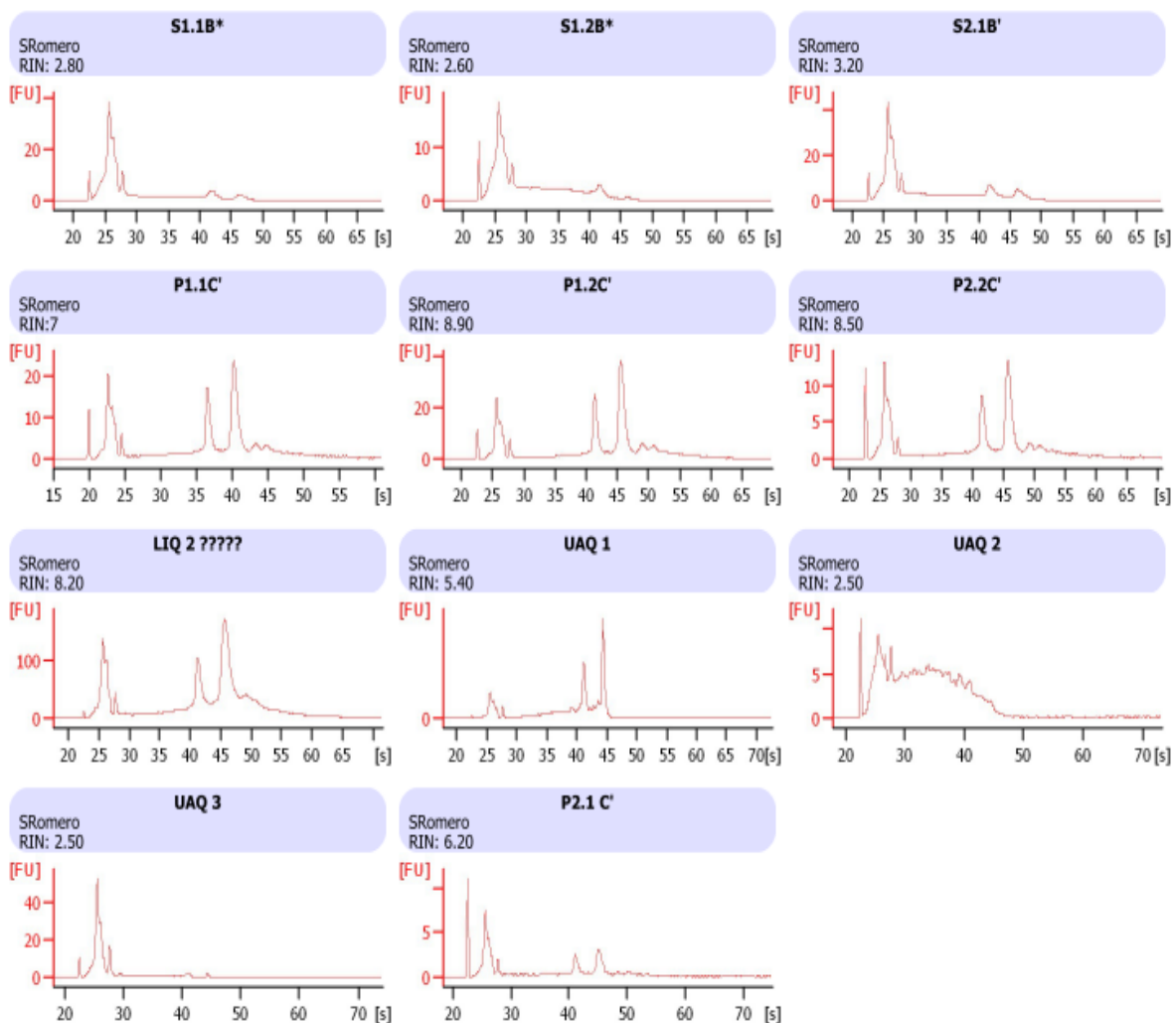


Figura 11. Valor de integridad del RNA. Las muestras de salvado son: S1.1B*, S1.2B*, S2.1B' y UAQ2; las de poliuretano son: P1.1C, P1.2C, P2.2C, UAQ3 y P2.1C; las de líquido son: LIQ2 y UAQ1.

En las gráficas de la Figura 11 se pueden ver los picos entre los valores 40 y 50, los cuales indican el valor del área de los fragmentos 18s y 28s. Al hacer una relación

de los valores de área de los fragmentos se puede sacar el RIN (Número de integridad del RNA, por sus siglas en inglés) de cada muestra de extracción de RNA. En la parte azul de cada gráfica viene el valor de RIN de la extracción de RNA. Como se puede ver sólo 4 muestras alcanzan el valor requerido de ≥ 7 , de éstas, 3 son de la fermentación sólida en poliuretano y una de fermentación sumergida. Dados estos resultados, se tomó la decisión de seleccionar las muestras P1.2C (fermentación sólida en poliuretano, RIN=8.90), P2.2C (fermentación sólida en poliuretano, RIN=8.50) y LIQ2 (fermentación sumergida, RIN=8.20).

5.5 Obtención de secuencias

En el Cuadro 6 se muestran las concentraciones y el RIN (Figura 12) que tuvieron las muestras de extracción de RNA seleccionadas al momento de secuenciarse. La reducción de la integridad pudo ser debida al tiempo que estuvieron guardadas, pues se secuenciaron cerca de 4 meses después de ser entregadas.

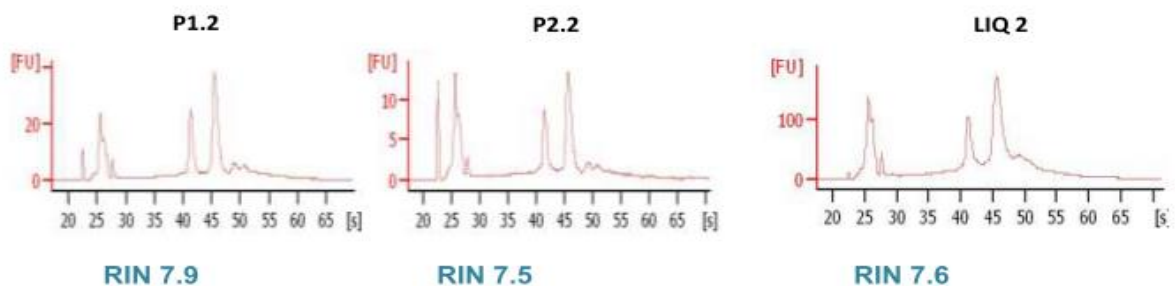


Figura 12. Integridad de las muestras al momento de secuenciarse.

Las muestras seleccionadas se secuenciaron con el Illumina HiSeq2000 en formato de pares (paired-ends) por el Área de Secuenciación por Síntesis en el LANGEBIO. El paired end significa que las lecturas se hicieron de ambos lados de la secuencia con el fin de aumentar la precisión del alineamiento.

Los resultados de la secuenciación tuvieron un total de 25 gb compresos debido a que se usaron 2 partes de líneas para las corridas. El total de la corrida en la primera línea fue de 84, 097, 088 lecturas pareadas, mientras que en la segunda fueron sólo 47, 754, 024 (Cuadro 7).

Cuadro 6. Concentración e integridad del RIN de las muestras antes de secuenciarse.

# Muestra	Nombre	Concentración (ng/uL)	RIN
1	P1.2	253.6	7.9
2	P2.2	133.5	7.5
3	LIQ2	11987	7.6

5.6 Análisis bioinformático

Para poder interpretar la cantidad de información obtenida durante la secuenciación es importante tener conocimiento de bioinformática.

Al recibir la información, se descomprimieron los archivos para poder abrirlos y usarlos con el comando gunzip. Los archivos venían divididos en las partes de líneas usadas, y éstas estaban divididas por muestras. Cada muestra tenía entre 4 y 9 documentos por cada lectura del paired end (Read1 y Read2), para analizarlas se juntaron todas las lecturas con terminación Read1 de cada muestra, igual que con Read2, con el comando cat (Cuadro 7).

Cuadro 7. Total de fragmentos secuenciados por muestra en cada línea.

# Muestra	Nombre	Línea 1	Línea 2
1	P1.2	32,400,153	17,754,849
2	P2.2	28,400,458	16,897,362
3	LIQ2	23,296,477	13,101,822

Una vez unidas todas las lecturas con su similar, se utilizó un programa llamado FastQC, el cual ayuda a saber la calidad de la secuenciación en cada lectura. En la

Figura 13 se puede ver la calidad del primer par de lecturas de cada muestra de la línea 1 comparada con la línea 2. A pesar de que la calidad se ve casi igual entre las dos líneas, la varianza del lado derecho, es decir, al final de la secuencia, en los resultados de la línea 2, es mayor, lo que significa que hay una mayor cantidad de secuencias con el final de mala calidad, esto es tanto por la calidad del RNA como por la acumulación de errores al final de las secuencias durante el proceso de la preparación de la biblioteca (PCR). Debido a estos resultados así como al número de lecturas obtenidas, se tomó la decisión de continuar los análisis sólo con la secuenciación de la línea 1.

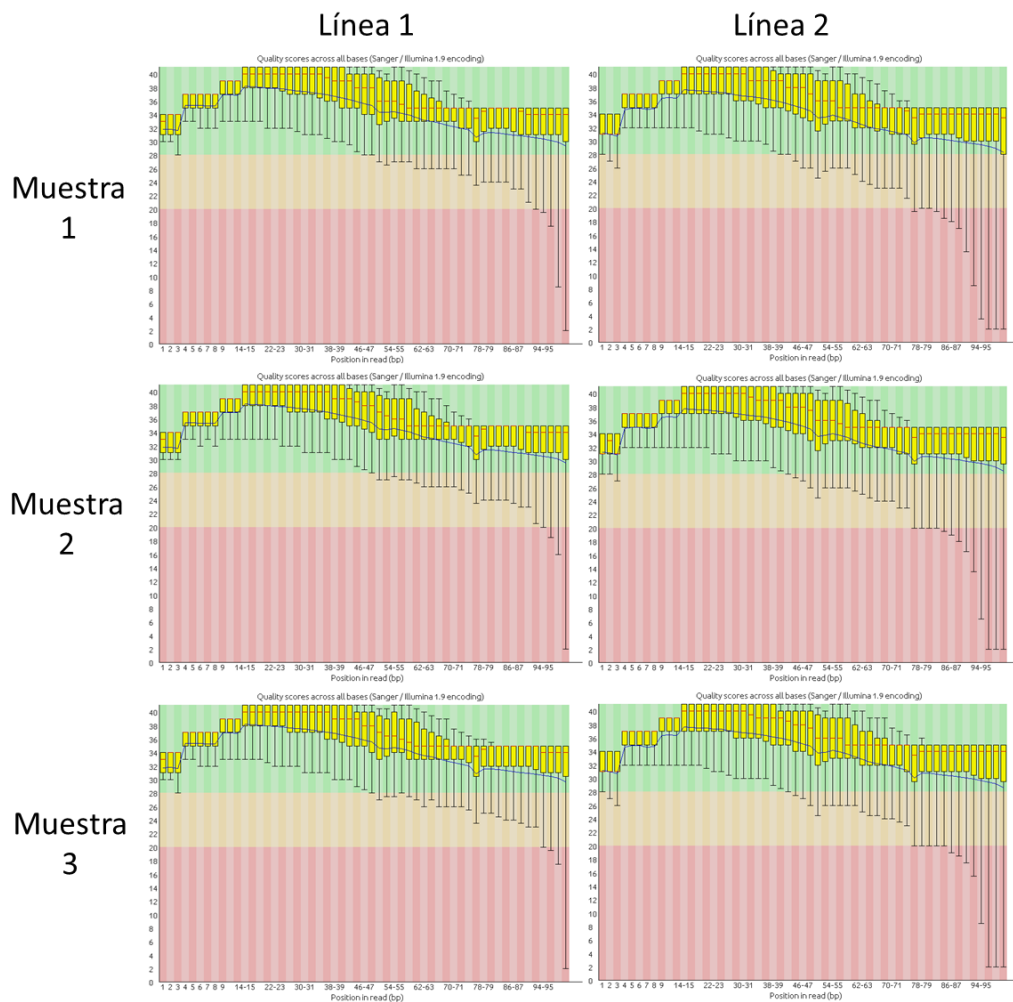


Figura 13. Resultados de calidad de las secuencias. Se muestran sólo los resultados del par 1 de las lecturas de ambas líneas. Muestra 1: P1.2; muestra 2: P2.2; muestra 3: LIQ2.

El genoma fue descargado de la página <http://www.fungi.ensembl.org>. Se prosiguió con la generación del índice para Bowtie2 para el mapeo del genoma (el índice acomoda el genoma de una forma ordenada y compacta para el mapeo). El genoma que se utilizó como referencia fue el de la cepa *A. niger* ATCC 1015; esto por dos razones: la primera fue debido al mayor número de alineamientos con nuestra secuenciación en comparación con la otra cepa disponible, *A. niger* CADRIS (con porcentajes de eficiencia de 94.5-95.5% y 83.5-86.5% respectivamente), y la segunda fue por la mayor cercanía filogenética con la cepa de trabajo, *A. niger* N402.

Una vez indexado el genoma se continuó con el mapeo, alineamiento y anotación de los resultados de RNA-seq usando como molde el genoma descargado. Se utilizó el programa Tophat que sirve para mapear secuencias de eucariotes donde existen *splicing*. Este procedimiento se hizo para cada muestra secuenciada. Al terminar este punto, se pudo hacer la comparación de genes entre muestras.

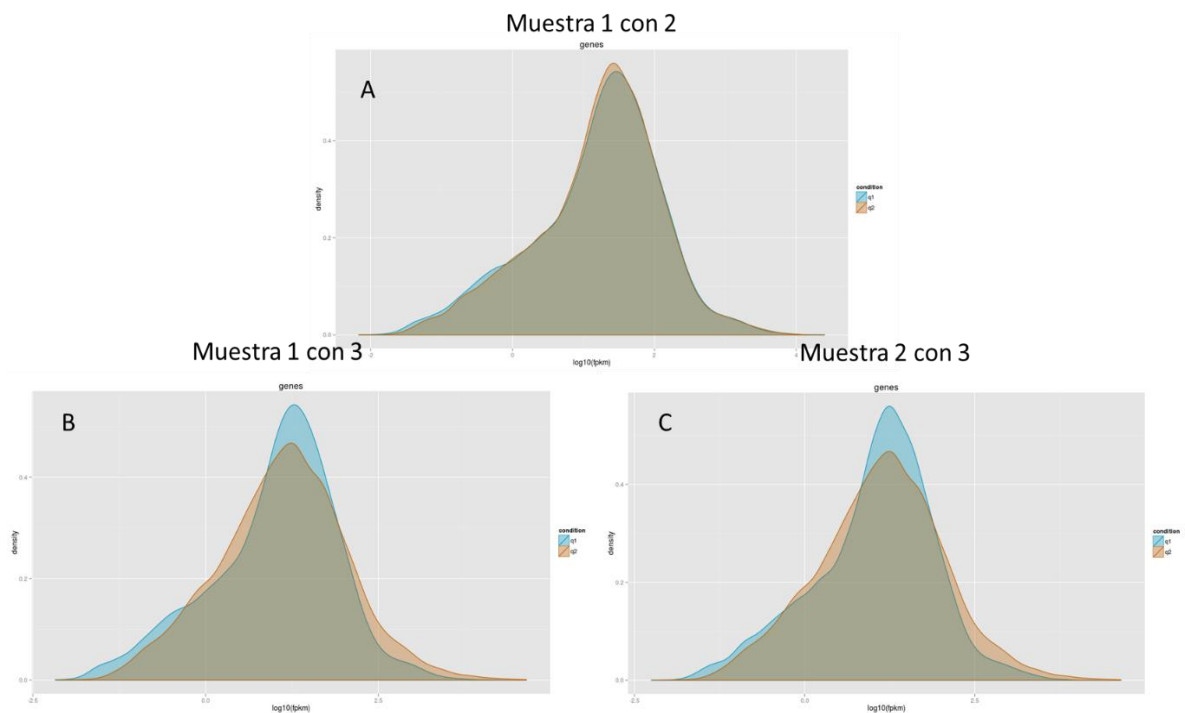


Figura 14. Gráficas de densidad de las comparaciones. Se obtuvieron con el programa cummeRbund de R. En la gráfica A y B, el pico de color azul es la muestra 1 (P1.2), la muestra 2 (P2.2) es naranja en la A y azul en la C; en las gráficas B y C el pico naranja es la muestra 3 (LIQ2).

Para poder comparar los resultados de secuenciación de las muestras secuenciadas y ver la expresión diferencial, se utilizó el programa Cuffdiff. Se comparó entre todas las muestras secuenciadas, 1 con 2, 1 con 3 y 2 con 3. Al comparar las muestras 1 y 2, las cuales ambas son de la fermentación sólida en poliuretano, se observó que no había genes diferenciales ya que no se observa una diferencia en la población (gráficas de densidad); en cambio en las comparaciones entre 1 con 3 y 2 con 3, se pudo observar la diferencia entre las muestras, siendo estas comparaciones casi iguales (Figura 14).

Cuando se compararon las muestras 1 con la 3 se obtuvieron más de 3400 genes diferenciales (Figura 15), teniendo el mismo resultado la comparación entre 2 y 3; para futuros análisis se utilizó la comparación entre 1 y 3 dado que las lecturas de RNA-seq de la muestra 1 eran mayores a las de la muestra 2. Cabe mencionar que las diferencias no se basaron en el p-value estadístico, ya que al no tener réplicas este valor era incorrecto, por lo que la selección de genes diferenciales entre la fermentación sólida en poliuretano y la fermentación sumergida se basó en el cambio proporcional (“fold change” o FC) $\geq 2x$. Los valores positivos del FC se daban donde existía una mayor expresión de los genes en la fermentación líquida y los valores negativos se daban cuando había una mayor expresión de genes en la fermentación sólida en poliuretano. En el uso del FC, se considera que un valor positivo significa sobreexpresión de genes, mientras que un valor negativo es igual a una represión teniendo en cuenta la muestra líquida como referencia. En este caso se tomó en cuenta a la fermentación sólida en poliuretano como nuestro control, ya que la comparación se hizo como 1 con 3 y no viceversa. Por lo que cuando un valor es positivo, decimos que hubo una sobreexpresión de genes en la fermentación sumergida en comparación con la sólida; en cambio, cuando es negativo el valor, decimos que hay una represión de genes en la fermentación líquida en comparación con la sólida, cuando en realidad es que esos genes son sobreexpresados en la fermentación sólida en poliuretano de *Aspergillus niger*.

En la Figura 15, se observa un MA-plot de la comparación de las muestras 1 con la 3 usando el fold change como base. En el eje de las “x” se encuentra el promedio de

la expresión de ambas muestras, mientras que el eje de las “y” es el valor de fold change de cada gen. Cada punto es un gen, y si el punto se encuentra con un valor positivo en el fold change tiene una sobreexpresión en la fermentación sumergida, mientras que si es negativo la sobreexpresión es en la fermentación sólida en poliuretano. Mientras más cercano a la izquierda este el punto menor es su expresión. Entre más separados los puntos son genes con mayor diferencia en su expresión. Los genes que se toman como diferenciales están por encima del foldchange ≥ 2 , los cuales son cerca de 3500 genes. La mayoría de los genes diferenciales encontrados se encuentran como no categorizados, lo cual se puede ver de dos formas; una, para motivos de esta tesis no es muy bueno ya que no podemos concluir las ventajas en esta expresión y la otra es la apertura de posibilidades para investigar las propiedades y características de estos genes los cuales pueden ser un indicio de las ventajas de la fermentación sólida (en específico en poliuretano) sobre la sumergida.

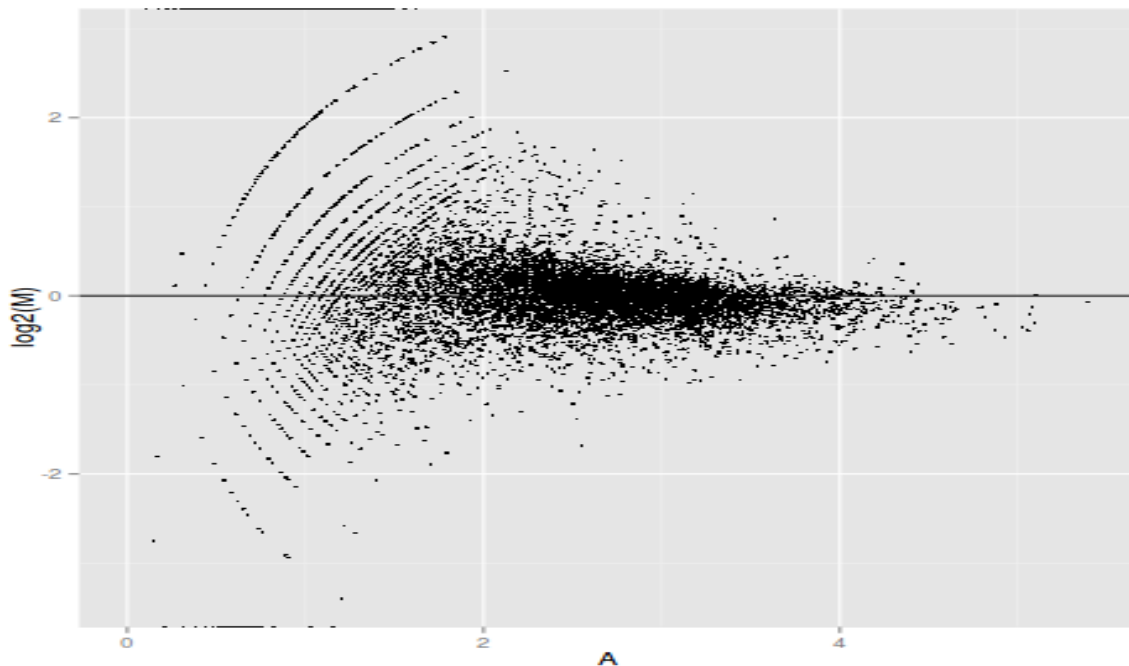


Figura 15. MA-plot de la expresión diferencial de genes entre la muestra 1 (poliuretano) y la 2 (líquido). En el eje de las x se encuentran el promedio de los genes expresados de ambas muestras; en el eje y, se encuentran los valores dados por el fold-change.

Una vez separados los genes diferenciales por FC, se buscaron los genes que estuvieran caracterizados y que han sido investigados anteriormente enfocándose en hidrolasas, de las cuales se encontraron 11 en total, en donde la fermentación sólida en poliuretano tuvo una mayor expresión en 8 genes. Dado el interés del grupo en la amilasa y la xilanasas, se tomaron en cuenta a pesar de no alcanzar el valor de ≥ 2 para el FC (tuvieron un valor mayor a 1.5). En el Anexo 2 se muestra la tabla de estos genes con la expresión de cada muestra así como sus respectivos valores de fold change. En la Figura 16, se muestran 2 tablas, en donde se ven las hidrolasas expresadas en ambas fermentaciones secuenciadas; hay dos gráficas para poder notar las diferencias entre las hidrolasas con menor expresión.

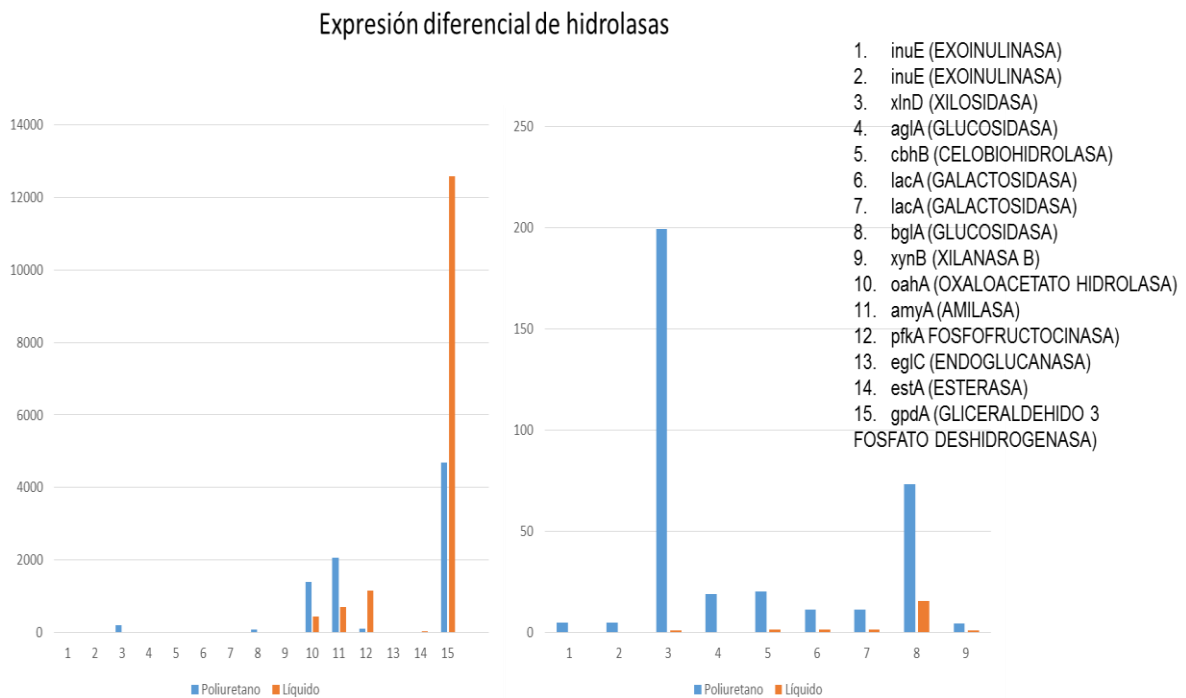


Figura 16. Expresión diferencial de hidrolasas en las fermentaciones. 1, inuE (EXOINULINASA); 2, inuE (EXOINULINASA); 3, xlnD (XILOSIDASA); 4, aglA (GLUCOSIDASA); 5, cbhB (CELOBIOHIDROLASA); 6, lacA (GALACTOSIDASA); 7, lacA (GALACTOSIDASA); 8, bglA (GLUCOSIDASA); 9, xynB (XILANASA B); 10, oahA (OXALOACETATO HIDROLASA); 11, amyA (AMILASA); 12, pfkA (FOSFOFRUCTOCINASA); 13, eglC (ENDOGLUCANASA); 14, estA (ESTERASA); 15, gpdA (GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DESHIDROGENASA). Azul es poliuretano, naranja es líquida.

5.7 Comprobación de resultados de la secuenciación por medio de RT-PCR

En la Figura 17 se muestra el primer intento (hasta el momento de la escritura del presente trabajo) de RT-PCR. Se intentó hacer los gradientes de tubulina, pero en las muestras de la fermentación sólida en poliuretano no salieron completos y en el caso de la fermentación sumergida no amplificaron. Aunque no se tuvieron los resultados deseados en la RT-PCR, cabe destacar la amplificación de los transcritos de *xynB* y *glaA*, así como la falta de amplificación de la invertasa. Estos resultados nos confirman parcialmente los resultados de la secuenciación ya que no se encontró la expresión de invertasa en ninguna de las muestras secuenciadas, pero si se encontraron *xynB* en las tres muestras.

Con la comprobación de los resultados de la secuenciación con el RT-PCR podemos argumentar que los datos de la secuenciación son correctos y confiables.

Los genes sobreexpresados de hidrolasas en la fermentación sólida en poliuretano fueron *inuE* (EXOINULINASA), *xlnD* (XILOSIDASA), *aglA* (GLUCOSIDASA), *cbhB* (CELOBIOHIDROLASA), *lacA* (GALACTOSIDASA), *bglA* (GLUCOSIDASA), *xynB* (XILANASA B), *oahA* (OXALOACETATO HIDROLASA) y *amyA* (AMILASA). Se sabe que *A. niger* responde a la disponibilidad de nutrientes al modificar la secreción de hidrolasas (Jørgensen y col., 2009), aunque en nuestro caso no vemos la secreción de proteínas, podemos inferir que al haber una alta expresión de estos transcritos, la expresión de proteínas puede ser proporcional. Otro dato es que en presencia de almidón se ha visto una expresión diferencial de enzimas degradadoras de polisacáridos (Archer y col., 2012). Con estas dos ideas podemos concluir que los nutrientes del medio se encuentran en mayor disponibilidad en la fermentación sólida en poliuretano que en la sumergida.

En 2012, Archer también vio que el crecimiento de *A. niger* en trigo provocaba una sobreexpresión de enzimas degradadoras de pared celular como celobiohidrolasas, xilanasas y xilano esterasas las cuales llegaban a ser hasta un 20% del RNA total, así como hidrofobinas (alta expresión obtenida en la secuenciación de la fermentación sólida en poliuretano) las cuales están relacionadas con la interacción

del micelio con superficies sólidas (Archer y col., 2012). También se ha visto una mayor expresión de celulasas y xilanasas en el crecimiento de *A. niger* en el bagazo (de Souza y col., 2011). Es posible que creciendo en un soporte sólido, a pesar de ser sintético, *A. niger*, con los nutrientes adecuados, pueda expresar las mismas enzimas que produce creciendo en desechos naturales.

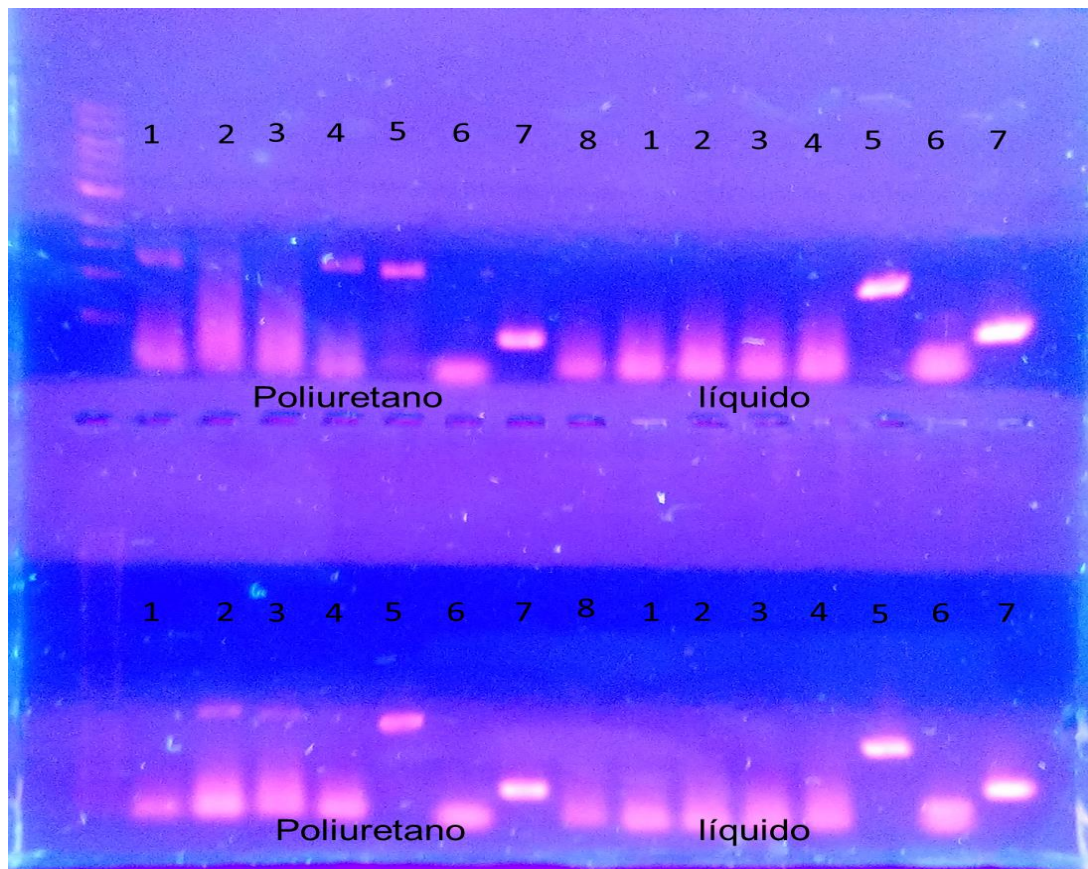


Figura 17. Gel de electroforesis de RT-PCR. El primer carril es el marcador de peso molecular. 1: tubulina (1), 2: tubulina (1/2), 3: tubulina (1/4), 4: tubulina (1/8). 5: *xynB*, 6: invertasa, 7: *glaA*. 8: control negativo.

Hubo una sobreexpresión de glucoamilasa en la fermentación sólida en poliuretano, la cual no se tomó en cuenta en análisis anteriores ya que el valor de fold change no alcanzó los parámetros establecidos, pero es importante hacer notar este dato dado que se sabe que en una sobreexpresión de glucoamilasas, las enzimas de la vía de secreción muestran una mayor actividad, lo que provocaría una mayor cantidad de enzimas secretadas (Jørgensen y col., 2009).

6. CONCLUSIONES

La fermentación sólida tiene claras ventajas sobre la fermentación sumergida, tanto en este estudio como en los mencionados anteriormente; a pesar de esta clara ventaja, las fermentaciones sumergidas son las más usadas tanto en la industria como en el área de investigación.

La fermentación sólida de hongos filamentosos se ha limitado al área de desechos. Lo que se trató de hacer en este trabajo fue dar a conocer la posibilidad de usar el poliuretano como un soporte inerte con todas las ventajas que tienen los soportes sólidos naturales, pero sin sustancias indeseadas, lo cual aumentaría la pureza en las enzimas producidas y aventajaría su estudio en el área de investigación.

A pesar de que en los experimentos no se pudo secuenciar las extracciones de la fermentación sólida en salvado de trigo, los resultados de la secuenciación del RNA obtenido en la fermentación sólida en poliuretano, junto con la comparación de otros artículos ya mencionados, crea la idea de que puede haber un parecido en la expresión de transcritos con las fermentaciones en soportes naturales y de desechos al uso del poliuretano.

Es necesario completar este análisis transcriptómico con un análisis proteómico, ya que la relación que puedan tener estos dos puede comprobar el uso que se le puede dar a la fermentación sólida en poliuretano. Incluso aunque los valores entre la expresión de proteínas y la de transcritos difiriera, se podría investigar esta relación para encontrar controles postraduccionales que modulen la secreción o la expresión de las proteínas.

El uso de los datos obtenidos por RNA-seq es casi ilimitado, ya que la información obtenida puede derivar en diferentes investigaciones, como isoformas o controles transcripcionales. Me da gusto decir que este estudio es una puerta para más estudios en el futuro y que pueda abrir la posibilidad del uso de la fermentación en poliuretano hacia la industria.

7. REFERENCIAS

- Andersen** MR, Nielsen J. Current status of systems biology in *Aspergilli*. *Fungal Genetics and Biology* **2009**; 46: S180-S190.
- Andersen** MK, Nielsen ML, Nielsen J. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Molecular Systems Biology* **2008**; 4: 1-13.
- Archer** DB, Dyer PS. From genomics to post-genomics in *Aspergillus*. *Current Opinion in Microbiology* **2004**; 7: 499-504.
- Archer** DB, Turner G. Genomics of protein secretion and hyphal growth in *Aspergillus*. En: Brown AJP, Ed. *The mycota, Fungal Genomics*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, **2006**; vol. 13: 75-96.
- Arenas** R. *Micología médica*. 4ta ed. México, D.F.: McGraw-Hill, **2011**: 17-30
- Arvas** M, Pakula T, Lanthaler K, Saloheimo M, Valkonen M, Suortti T, Robson G, Penttilä M. Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMed Central Genomics* **2006**; 7: 32-50.
- Baker** SE. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Med Mycology* **2006**; 44: S17-S21.
- Bennett** JW. An Overview of the Genus *Aspergillus*. En: Machida M, Gomi K, Ed. *Aspergillus Molecular biology and genomics*. Japan: Caister Academic Press, **2010**: 1-17
- Bhargav** S, Panda BP, Ali M, Javed S. Solid-state fermentation: an overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2008**; 22(1): 49–70.
- Brink-Jensen** K, Bak S, Jørgensen K, Ekstrøm CT. Integrative analysis of metabolomics and transcriptomics data: a unified model framework to identify underlying system pathways. *PLoS ONE* **2013**; 8(9): 1-8
- Garber** M, Grabherr MG, Guttman M, Trapnell C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods* **2011**; 8: 469–477

Gautam AK, Sharma S, Avasthi S, Bhadauria R. Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*. An important spoilage fungi. Res J Microbiol **2011**; 6(3): 270-280

Gerstein M, Luscombe NM, Greenbaum D. What is bioinformatics? An introduction and overview. Yearbook of Medical Bioinformatics **2001**: 83-100

Gibbons JG, Rokas A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. Trends in Microbiology **2013**; 21(1): 14-22

Gutiérrez-Correa M, Ludeña Y, Ramage G, Villena GK. Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. Appl Biochem Biotechnol **2012**; 167: 1235-1253.

Hagen JE. The origins of bioinformatics. Nature Reviews **2001**; 1: 231-236

Jacobs DI, Olsthoorn MMA, Maillet I, Akeroyd M, Breestraat S, Donkers S, van der Hoeven RAM, van den Hondel CAMJJ, Kooistra R, Lapointe T, Menke H, Meulenbergh R, Misset M, Müller WH, van Peij NNME, Ram A, Rodriguez S, Roelofs MS, Roubos JA, van Tilborg MWEM, Verkleij AJ, Pel HJ, Stam H, Sagt CMJ. Effective lead selection for improved protein production in *Aspergillus niger* based on integrated genomics. Fungal Genetics and Biology **2009**; 46: S141-S152.

Jørgensen TR, Goosen T, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ, Iversen JLL. Transcriptomic comparison of *Aspergillus niger* growing on two different sugars reveals coordinated regulation of the secretory pathway. BioMed Central Genomics **2009**; 10: 44-60.

Lu X, Sun J, Nimitz M, Wissing J, Zeng AP, Rinas U. Research The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. Microbial Cell Factories **2010**; 9: 23-36.

Mardis ER. Next generation sequencing methods. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. **2008**; 9: 387-402

Masuo S, Terabayashi Y, Shimizu M, Fujii T, Kitazume T, Takaya N. Global gene expression analysis of *Aspergillus nidulans* reveals metabolic shift and transcription suppression under hypoxia. Mol Genet Genomics **2010**; 284: 415-424.

Metzker M. Sequencing technologies, the next generation. Nature Reviews **2010**; 11: 31-46

Meyer V, Wu B, Ram AFJ. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnol Lett* **2011**; 33: 469-476

Mienda BS, Idi A, Umar A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications - an overview. *Research in Biotechnology* **2011**; 2(6): 21-26.

Papagianni M. Recent advances in solid-state fermentation applications for the food industry. *Current Biochemical Engineering* **2014**; 1: 2-8.

Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *TRENDS in Biotechnology* **2002**; 20: 200-206

Raimbault M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* **1998**; 1(3): 1-15.

Rautio JJ, Bailey M, Kivioja T, Söderlund H, Penttilä M, Saloheimo M. Physiological evaluation of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* in production processes by marker gene expression analysis. *BioMed Central Biotechnology* **2007**; 7: 28-44

Rautio JJ, Smit BA, Wiebe M, Penttilä M, Saloheimo M. Transcriptional monitoring of steady state and effects of anaerobic phases in chemostat cultures of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BioMed Central Genomics* **2006**; 7: 247-263.

Romero S, Viniegra G, Farrés A, Augur C. Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida. Tesis doctoral. UAM **2001**.

Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, van Dijck PWM. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**; 59:426-435

Shahlaei M, Pourhossein A. Biomass of *Aspergillus niger*. Uses and applications. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences* **2013**; 2(1): 83-89

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **2008**; 26: 1135-1145

de Souza WR, de Gouvea PF, Savoldi M, Malavazi I, de Souza Bernardes LA, Goldman MHS, de Vries RP, de Castro Oliveira JV, Goldman GH. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels* **2011**; 4(40)

Subramaniyam R, Vimala R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Sciences and Nature* **2012**; 3(3): 480-486.

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* **2012**; 7(3): 562-578

Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G, Augur C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* **2003**; 13: 157–167

ANEXO 1: comandos utilizados para llevar a cabo el análisis de RNA-seq

[1] *gunzip *.gz*

[2] *cat files_sample_1_1*.fastq > sample_1_reads_1.fastq*

[3] *cat files_sample_1_2*.fastq > sample_1_reads_2.fastq*

[4] *cat files_sample_2_1*.fastq > sample_2_reads_1.fastq*

[5] *cat files_sample_2_2*.fastq > sample_2_reads_2.fastq*

[6] *cat files_sample_3_1*.fastq > sample_3_reads_1.fastq*

[7] *cat files_sample_3_2*.fastq > sample_3_reads_2.fastq*

[8] *bowtie2-build aniger.fasta aniger*

[9] *tophat -o sample_1.tophat -p 10 -u -b aniger.fasta -G aniger.gtf aniger
sample_1_reads_1.fastq sample_1_reads_2.fastq*

[10] *tophat -o sample_2.tophat -p 10 -u -b aniger.fasta -G aniger.gtf aniger
sample_2_reads_1.fastq sample_2_reads_2.fastq*

[11] *tophat -o sample_3.tophat -p 10 -u -b aniger.fasta -G aniger.gtf aniger
sample_3_reads_1.fastq sample_3_reads_2.fastq*

[12] *ln -s sample_1.tophat/accepted_hits,bam sample_1.bam*

[13] *ln -s sample_2.tophat/accepted_hits,bam sample_2.bam*

[14] *ln -s sample_3.tophat/accepted_hits,bam sample_3.bam*

[15] *cuffdiff -o diff_1-2 -p 10 -u -b aniger.fasta aniger.gtf sample_1.bam sample_2.bam*

[16] *cuffdiff -o diff_1-3 -p 10 -u -b aniger.fasta aniger.gtf sample_1.bam sample_3.bam*

[17] *cuffdiff -o diff_2-3 -p 10 -u -b aniger.fasta aniger.gtf sample_2.bam sample_3.bam*

ANEXO 2: tabla de las hidrolasas expresadas en la fermentación sólida y sumergida. El orden esta por la cantidad de expresion de acuerdo a la fermentación sólida.

número en la Figura	gene	Poliuretano	Líquido	log2-fold_change
15	gpdA (<u>GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DESHIDROGENASA</u>)	4694.14	12572.7	1.42136
11	amyA (<u>AMILASA</u>)	2072.89	713.169	-1.53933
10	oahA (<u>OXALOACETATO HIDROLASA</u>)	1385.02	435.724	-1.66843
3	xlnD (<u>XILOSIDASA</u>)	199.548	1.10411	-7.4977
12	pfkA (P- <u>FRUCTOCINASA</u>)	114.266	1160.59	3.34439
8	bglA (<u>GLUCOSIDASA</u>)	73.5285	15.5371	-2.24258
5	cbhB (<u>CELOBIOHIDROLASA</u>)	20.157	1.54443	-3.70613
4	aglA (<u>GLUCOSIDASA</u>)	18.9644	0.33883	-5.80658
6	lacA (<u>GALACTOSIDASA</u>)	11.4046	1.58094	-2.85076
7	lacA (<u>GALACTOSIDASA</u>)	11.4046	1.58094	-2.85076
1	inuE (<u>EXOINULINASA</u>)	5.12853	0.05169	-6.63233
2	inuE (<u>EXOINULINASA</u>)	5.12853	0.05169	-6.63233
14	estA (<u>ESTERASA</u>)	4.81862	29.1261	2.59562
9	xynB (<u>XILANASA B</u>)	4.41733	1.11565	-1.98529
13	eglC (<u>ENDOGLUCANASA</u>)	2.30795	16.9325	2.87512