

Tesis Doctoral

Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas

Ben Guerrero, Emiliano

2018

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ben Guerrero, Emiliano. (2018). Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6533_BenGuerrero

Cita tipo Chicago:

Ben Guerrero, Emiliano. "Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6533_BenGuerrero



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Emiliano Ben Guerrero

Director: Dra. Paola Mónica Talia

Consejero de estudios: Dr. H. Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología. CICVyA, INTA
Castelar.

Fecha de defensa: 5 de noviembre de 2018.

Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas

RESUMEN

Algunos insectos han desarrollado estrategias muy eficaces para utilizar sustratos lignocelulósicos como fuentes de energía. En termitas y algunos coleópteros, la digestión de la lignocelulosa es el resultado de la acción coordinada de enzimas endógenas y las de sus endosimbiontes junto con la digestión mecánica. Esta característica los convierte en un recurso óptimo para la búsqueda de nuevas enzimas lignocelulolíticas.

En este contexto, el objetivo general de este trabajo consistió en el estudio y prospección de la diversidad bacteriana, cultivable y no cultivable, presente en el intestino de termitas nativas y coleópteros, así como la caracterización de enzimas hidrolíticas y su utilización en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

Por un lado, se exploró la diversidad bacteriana de los endosimbiontes celulolíticos cultivables y se evaluó la actividad (hemi) celulolítica de bacterias cultivables y de los extractos intestinales de dos termitas nativas argentinas, con hábitos alimenticios diferentes, *Nasutitermes aquilinus* (madera) y *Cortaritermes fulviceps* (suelo). Se obtuvo información acerca de la microbiota asociada con capacidad de degradar celulosa en cada termita. A su vez, mediante espectrometría de masas, se logró identificar varios péptidos, posiblemente involucrados en la degradación de hemicelulosa, con similitud a xilanasas. Al centrarnos en estas especies neotropicales menos estudiadas, intentamos descubrir nuevas fuentes biológicas de enzimas con posibles aplicaciones en biocombustibles.

Además, se estudió de qué manera el microbioma del coleóptero *Anthonomus grandis* bohemian responde a cambios en la dieta y cómo se modifican las actividades hidrolíticas en el intestino de larvas alimentadas con diferentes sustratos lignocelulósicos. Para ello, se alimentaron larvas de *A. grandis* con tres dietas artificiales diferentes: harina de algodón, pasto elefante y rastrojo de maíz. Mediante secuenciación de nueva generación (NGS) de la región hipervariable V3-V4

del gen de ARN ribosomal 16S, se estudiaron los cambios en la estructura y diversidad bacteriana del intestino del insecto. A partir de estos estudios se observó que los cambios producidos en la dieta influyen en la composición de la comunidad microbiana presente en el intestino, pudiéndose identificar un *core* microbiano entre las tres dietas. Estos resultados sugieren que los cambios en la abundancia de la microbiota degradadora de celulosa influyen sobre la actividad celulolítica general.

A partir de datos provenientes del análisis metagenómico del intestino de la termita *N. aquilinus*, se seleccionaron seis genes codificantes para las enzimas glicosil hidrolasas más abundantes, pertenecientes a la familia 5. Dos de ellos, GH5CelA y GH5CelB, se expresaron en el sistema de *Escherichia coli* de manera soluble y las proteínas fueron purificadas a homogeneidad. Ambas enzimas presentaron actividad sobre los sustratos pNPC y β -glucano de cebada; GH5CelB mostró también actividad sobre Carboximetilcelulosa. La actividad enzimática óptima de ambas se detectó a temperaturas moderadas (entre 35 y 50 °C) y pH 5. Las enzimas mostraron diferencias en la cinética y el perfil de los productos de hidrólisis generados.

Los resultados de esta tesis contribuyen a la caracterización de los procesos celulolíticos de los insectos y a la identificación y caracterización de enzimas degradadoras de celulosa con potencial aplicación en la industria del bioetanol y otros procesos biotecnológicos.

Palabras claves: *Nasutitermes aquilinus* - *Cortaritermes fulviceps* - *Anthonomus grandis* boheman - Gen 16S ARNr - Actividades hidrolíticas - GH5 - Biomásas lignocelulósicas

Insect microbiome analysis: identification and characterization of glycosyl hydrolases

ABSTRACT

Some insects have developed very effective strategies to use lignocellulosic substrates as energy sources. In termites and some Coleoptera, oligocellulose digestion is the result of the coordinated action of endogenous enzymes and enzymes of their endosymbionts together with mechanical digestion. This characteristic makes them an optimal target for the search of new lignocellulolytic enzymes.

In this context, the general objective of this work consisted of the study and prospecting of the bacterial diversity, cultivable and non-culturable, present in the gut of native termites and Coleoptera by characterizing hydrolytic enzymes and their use in the hydrolysis of lignocellulosic biomass.

First, we explored the diversity of culturable cellulolytic bacterial endosymbionts and subsequently evaluated the (hemi) cellulolytic activity of culturable bacteria from gut extracts of two Argentinean native termites with different feeding habits, *Nasutitermes aquilinus* (wood) and *Cortaritermes fulviceps* (soil).

This approach helped us gather novel information about the microbiota associated with the ability to degrade cellulose in each of the tested termites. By focusing on these less studied neotropical species, we aimed to discover new biological sources of enzymes with possible applications in biofuels. Furthermore, mass spectrometry was used to identify several peptides, possibly involved in the degradation of hemicellulose, with similarity to xylanases.

In addition, we examined how the weevil *Anthonomus grandis* bohemian microbiome responds to changes in diet and how its cellulosic activities were modified by this microbiome. We performed a screening by next-generation sequencing (NGS) of bacterial communities present in the gut of *A. grandis* fed with three different lignocellulosic feedstocks (cottonseed meal, elephant grass, and corn

stover). We sequenced amplicons covering the V3-V4 region of the 16S rRNA genes and complemented this data with a characterization of hydrolytic activities for each of the three diets. From these studies, we observed that the changes produced in the diet influence the composition of the microbial community present in the gut. We were able to identify a microbial core among the three diets. These results would indicate that changes in the abundance of the cellulose degrading microbiota would influence the general cellulolytic activity.

Six genes encoding the most abundant glycosyl hydrolase enzymes, belonging to family 5, were selected from the metagenomic analysis of the gut of the termite *N. aquilinus*. Two of them, GH5CelA and GH5CelB, were expressed in *Escherichia coli* system in the soluble fraction and purified to homogeneity. Both enzymes showed activity on pNPC and barley β -glucan substrates but only GH5CelB showed activity on CMC. Both enzymes presented optimal activity at moderate temperatures (between 35 and 50 °C) and at pH 5. However, the kinetics and the hydrolysis products profiles of the enzymes differed.

The results on this thesis contribute to the characterization of the cellulolytic processes in insects and to the identification and characterization of cellulose degrading enzymes with potential application in the bioethanol industry and other biotechnological applications.

Key words: *Nasutitermes aquilinus* - *Cortaritermes fulviceps* - *Anthonomus grandis* boheman - 16S rRNA gene - Hydrolytic activities - GH5 - Lignocellulosic feedstocks

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional y por estar a mi lado durante todo este proceso.

A Paola por dirigir este trabajo de tesis.

A los integrantes de los grupos Bioenergía y Epidemiología Molecular y Evolución Viral por compartir buenos momentos de trabajo.

A TODOS los integrantes del Instituto de Biotecnología del INTA de Castelar.

A INTA por otorgarme la beca de formación para desarrollar mi trabajo de tesis y financiar los cursos y congresos que asistí.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por su excelente oferta académica que posibilitó mi formación de posgrado.

Publicaciones derivadas de este trabajo de Tesis

EFFECT OF DIFFERENT LIGNOCELLULOSIC DIETS ON BACTERIAL MICROBIOTA AND HYDROLYTIC ENZYME ACTIVITIES IN THE GUT OF THE COTTON BOLL WEEVIL (*Anthonomus grandis*). 2016. **Ben Guerrero, E.**, Soria, M., Salvador, R., Ceja-Navarro, J.A., Campos, E., Brodie, E. & Talia, P. *Front. Microbiol.* 7:2093.

PROSPECTION AND EVALUATION OF CELLULOLYTIC AND (HEMI) CELLULOLYTIC ENZYMES USING UNTREATED AND PRETREATED BIOMASS IN TWO ARGENTINEAN NATIVE TERMITES. 2015. **Ben Guerrero, E.**, Arneodo, J., Bombarda Campanha, R., Abrão de Oliveira, P., Veneziano Labate, M.T., Regiani Cataldi, T., Campos, E., Cataldi, A., Rodrigues, C.M. & Talia, M. *PLoS ONE* 10(8): e0136573.

Financiamiento

- Proyecto INTA **PNAIyAV-1130034** *“Procesos para la Transformación de Biomasa en Bioenergía y desarrollo de Bioinsumos”*. Módulo 2: *“Desarrollo de bioinsumos con fines agroindustriales”*. Coordinador de Módulo 2 Dra. Paola Talia. 2013- actual.
- Proyecto **PICT-2013-1454**. *“Identificación y caracterización de celulasas de termitas nativas para la obtención de bioetanol”*. Investigador Responsable: Dra. Paola Talia, Grupo responsable: Dr. Joel Arneodo. Duración 2014-2017.
- Proyecto **FO.AR # 6530**. *“Omics strategies for breeding, bioenergy and food industry”* Programa de cooperación bilateral del Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto, Argentina. Entre el Instituto de Biotecnología de INTA, Argentina y la Universidad de Pretoria, Sudáfrica. Responsables: Dra. Paola Talia (Argentina) y Dr. Don Cowan (Sudáfrica). Duración 2016-2019.
- Proyecto Programa de Cooperación Bilateral **MINCYT-DST** cooperación científico-tecnológico Argentino-Sudafricano: código SA/13/10. *“Prospección, identificación y caracterización de genes codificantes de celulasas para la obtención de bioetanol”*. Responsables: Dra. Paola Talia (Argentina) y Dra. Olubukola Babalola (Sudáfrica). Duración 2014-2017.
- Proyecto **INTA-EMBRAPA**: *“Identificación y evaluación de genes y microorganismos noveles para la conversión eficiente de residuos agroindustriales y pasturas en bioetanol”*. Responsables: Dra. Paola Talia (Argentina) y Brasileira Monica Caramez Triches Damaso (Brasil). Duración dic 2011- 2014.

Becas obtenidas:

- Beca de Práctica Profesional INTA (2012-2014) Lic. Emiliano Ben Guerrero
- Beca de Formación INTA (2014-2019) Lic. Emiliano Ben Guerrero

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA	15
INTRODUCCIÓN	19
I. Estado del arte del etanol lignocelulósico	19
I.1 Fuentes de biomasas lignocelulósicas	21
I.2 Estructura y composición de la lignocelulosa	23
I.2.1 Celulosa	23
I.2.2 Hemicelulosa	26
I.2.3 Lignina	27
I.2.4 Pectina	28
II. Enzimas lignocelulolíticas	29
II.1 Clasificación y características generales	29
II.2 Celulasas, hemicelulasas, pectinasas, lacasas y peroxidadas	30
II.2.1 Celulasas	30
II.2.2 Hemicelulasas	32
II.2.3 Pectinasas	33
II.2.4 Lacasas y peroxidadas	34
III. Mecanismos de degradación de la lignocelulosa	35
III.1 Degradación microbiana de la celulosa	35
III.2 El intestino de insectos como hábitat de microorganismos celulolíticos	38
III.2.1 Estructura y propiedades de los intestinos de insectos	38
III.2.2 Sistema digestivo en insectos	38
III.2.3 Estabilidad del intestino de insectos como hábitat microbiano	40
III.2.4 Condiciones fisicoquímicas en los intestinos de insectos	42
III.3 Sistemas celulolíticos en las termitas	44
III.3.1 Termitas inferiores	44
III.3.2 Termitas superiores	46
III.4 Sistemas celulolíticos en Coleoptera	48
IV. Enfoques ómicos aplicados a la prospección de nuevas enzimas celulolíticas	50
V. Aplicaciones potenciales en la industria de enzimas celulolíticas	52
V.1 Industria alimentaria	52
V.2 Industria textil y del lavado	52
V.3 Industria del vino	53
V.4 Industria del papel	53
V.5 Industria del bioetanol	53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	61
I. Muestreo	61
I.1 Hábitat y nutrición de las termitas nativas <i>Nasutitermes aquilinus</i> y <i>Cortaritermes Fulviceps</i>	61
I.2 <i>Anthonomus grandis</i> boheman	62
I.3 Disección de intestinos	62

II. Biomosas lignocelulósicas	62
II.1 Pretratamiento de biomosas	63
II.2 Determinación de la composición química de las biomosas lignocelulósicas	63
II.2.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	65
II.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	66
III. Dietas Artificiales	66
III.1 Preparación de las dietas artificiales utilizadas para la cría de <i>Anthonomus grandis</i> bohemán	66
IV. Condiciones de cultivo	67
V. Técnicas de biología molecular	67
V.1 Extracción de ADN genómico	67
V.2 Construcción de bibliotecas de clones cultivables mediante amplificación del gen ARN 16S ribosomal del intestino de termitas nativas	68
V.3 Construcción de las bibliotecas metagenómicas mediante amplificación de la región V3-V4 hipervariable del gen ARN 16S ribosomal del intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemán	68
V.4 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes codificantes para glicosil hidrolasas	69
V.5 Vectores de clonado y Expresión	70
V.6 Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> competentes químicas	71
V.7 Reacciones de ligado	71
V.8 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	71
V.9 Minipreparación de ADN plasmídico	72
V.10 Digestión con enzimas de restricción	72
V.11 Electroforesis en geles de agarosa	72
V.12 Purificación de fragmentos de ADN	72
V.13 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en el sistema heterólogo <i>Escherichia coli</i>	73
V.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida	73
V.15 Tinción con azul de <i>Coomassie</i>	74
V.16 <i>Western blot</i>	74
V.17 Electroforesis bidimensional	75
V.18 Espectrometría de masas	75
VI. Métodos enzimáticos	77
VI.1 Obtención de extractos enzimáticos	77
VI.1.1 Preparados enzimáticos de <i>Nasutitermes aquilinus</i> y <i>Cortaritermes fulviceps</i>	77
VI.1.2 Preparados enzimáticos intestinales de <i>Anthonomus grandis</i> bohemán	77
VI.2 Cuantificación de proteínas totales	77
VI.3 Ensayo cualitativo de actividad celulasa y hemicelulasa	77
VI.4 Cuantificación de azúcares reductores y curvas patrón	78
VI.4.1 Actividad endoglucanasa, xilanasa, pectinasa, β -glucanasa, exoglucanasa y laminarasa	78
VI.4.2 Actividad β -glucosidasa y celobiohidrolasa	79
VI.5 Cálculo de la actividad enzimática y actividad enzimática específica	79
VI.6 Detección de actividad enzimática por zimografía	80
VI.7 Caracterización de la actividad enzimática de enzimas purificadas: pH, temperatura y termoestabilidad	81
VI.8 Cinética enzimática	81
VI.9 Hidrólisis de biomasa lignocelulósica	81

VI.10 Cromatografía en capa delgada (TLC)	82
VII. Métodos bioinformáticos	82
VII.1 Análisis filogenéticos	82
VII.1.1 Construcción de árbol filogenético a partir secuencias del gen ARNr 16S obtenidos de bibliotecas de clones cultivables de <i>Nasutitermes aquilinus</i> y <i>Cortaritermes fulviceps</i>	82
VII.1.2 Análisis filogenético de endoglucanasas	83
VII.2 Análisis de secuencia e identificación taxonómica del gen ARNr 16S de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	83
VII.3 Estimación de la diversidad bacteriana	84
VII.4 Modelado molecular de endoglucanasas	85
VII.5 Métodos gráficos y estadísticos	85
VII.6 Número de acceso de las secuencias nucleotídicas	86
 RESULTADOS	 87
Parte I: Efecto de las dietas lignocelulósicas sobre la diversidad bacteriana y la actividad hidrolítica en el intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	88
I.1 Detección de la actividad celulolítica a lo largo del desarrollo de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	89
I.2 Actividad celulolítica y hemicelulolítica a través de las diferentes secciones del intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	89
I.3 Estudio de la diversidad bacteriana intestinal de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian..	91
I.4 Estimación de la diversidad bacteriana en el intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	92
I.4.1 Diversidad alfa	92
I.4.2 Diversidad beta	95
I.4.2.1 Estructura de la comunidad	95
I.4.2.2 Diversidad entre comunidades microbianas del intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	96
I.5 Caracterización de la actividad hidrolítica a través de las diferentes dietas.....	98
I.6 Composición química de la biomasa lignocelulósica	101
I.6.1 Caracterización de las dietas mediante Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)	101
I.7 Discusión	103
I.8 Conclusiones	111
 Parte II: Prospección y evaluación de enzimas (hemi) celulolíticas usando biomasas sin tratar y pretratadas en dos termitas nativas de Argentina	 113
II.1 Determinación de la composición de las biomasas: bagazo de caña de azúcar y pasto elefante	114
II.1.1 Caracterización por Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)	115
II.2 Efecto del pretratamiento y sacarificación sobre la morfología del bagazo de caña de azúcar y pasto elefante	116
II.3 Actividades celulolíticas y hemicelulolíticas de <i>Nasutitermes aquilinus</i> y <i>Cortaritermes fulviceps</i>	117
II.3.1 Evaluación enzimática cualitativa	117
II.3.2 Evaluación enzimática cuantitativa	118
II.4 Identificación de celulasas y hemicelulasas del intestino <i>Nasutitermes aquilinus</i> y <i>Cotaritermes fulviceps</i>	120

II.5 Diversidad bacteriana en cultivos de <i>Nasutitermes aquilinus</i> y <i>Cortaritermes fulviceps</i>	122
II.5.1 Curvas de rarefacción	122
II.5.2 Estimación de la riqueza y diversidad	123
II.5.3 Análisis filogenético	123
II.6 Identificación de proteínas del secretoma bacteriano involucrado en la hidrólisis de carboximetilcelulosa	125
II.7 Discusión	127
II.8 Conclusiones	134
Parte III: Clonado, expresión, purificación y caracterización bioquímica de celulasas del intestino de termitas	135
III.1 Análisis bioinformático de GH5CelA y GH5CelB	136
III.2 Expresión recombinante y caracterización bioquímica de las endoglucanasas GH5CelA y GH5CelB	139
III.3 Mecanismo de hidrólisis de rGH5CelA y rGH5CelB	143
III.4 Aplicación de rGH5CelA y rGH5CelB en la hidrólisis de biomasas lignocelulósicas pretratadas	144
III.5 Clasificación de rGH5CelA y rGH5CelB dentro de las subfamilias de las glicosil hidrolasas 5	145
III.6 Modelado molecular de GH5CelA y GH5CelB	147
III.7 Discusión	150
III.8 Conclusiones	157
CONCLUSIONES GENERALES	159
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
ANEXO	185

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Estado actual de la producción de biocombustibles de segunda generación en el mundo	21
Tabla 2.	Composición porcentual de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica.....	23
Figura 1.	Composición de las fibras de celulosa	25
Figura 2.	Estructura química de los componentes principales de la hemicelulosa ...	27
Figura 3.	Estructura química de la lignina	28
Figura 4.	Degradación enzimática de la celulosa	31
Figura 5.	Degradación enzimática de la hemicelulosa	32
Figura 6.	Modo de acción y estructura de las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs)	33
Figura 7.	Modelo esquemático de los mecanismos de hidrólisis de celulosa	37
Figura 8.	Descripción de las partes que componen el tracto intestinal de insectos..	38
Figura 9.	Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal de los insectos	41
Figura 10.	Sistema celulolítico en termitas inferiores	46
Figura 11.	Sistema celulolítico en termitas superiores	47
Figura 12.	Sistema digestivo endógeno de la termita superior	48
Figura 13.	Etapas de la producción de bioetanol de segunda generación	54
Figura M1.	Termitas nativas de Argentina	62
Figura M2.	Estadios del desarrollo de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	67
Tabla M1.	Asignación de bandas características de absorción infrarrojo de la pared vegetal	66
Tabla M2.	Composición dietas artificiales	67
Tabla M3	Genes codificantes para glicosil hidrolasas (GH) de la familia GH5	70
Tabla M4.	Cebadores utilizados para la amplificación de genes de interés	70
Figura M3.	Método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), reacción de oxidación de azúcares reductores	78
Figura I1.	Perfil de la actividad endoglucanasa de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian.....	89
Figura I2.	Sistema digestivo de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	90
Figura I3.	Actividad hidrolítica en el intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian	91
Figura I4.	Abundancia relativa de los phyla bacterianos presentes en el intestino de <i>Anthonomus grandis</i> alimentados con harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) y pasto elefante (PE)	92
Figura I5.	Curvas de rarefacción de las comunidades bacterianas del intestino de larvas de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian alimentadas con tres dietas artificiales	93
Tabla I1.	Estimación de riqueza e índices de diversidad para las muestras de intestino con diferentes dietas	94
Figura I6.	Representación gráfica del ordenamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) derivados de la comparación entre las comunidades bacterianas del intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian alimentados con diferentes dietas artificiales	96
Figura I7.	Diagrama de Venn para cada dieta artificial por triplicado y <i>core</i> general	97
Tabla I2.	OTUs compartidas presentes en el <i>core</i> microbiano de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian alimentado con tres dietas artificiales	97
Figura I8.	Abundancia relativa de los taxa bacterianos más abundantes en el intestino de <i>Anthonomus grandis</i> bohemian a lo largo de las dietas	

	artificiales	98
Figura I9.	Caracterización de la actividad enzimática de extractos de intestinos de <i>Anthonomus grandis</i> bohemán alimentados con tres dietas artificiales	100
Tabla I3.	Relación obtenida entre la intensidad de absorbancia del número de onda designado a los polímeros	102
Tabla II1.	Composición porcentual de las biomásas sin tratar y pretratadas (-P) bagazo de caña de azúcar (BCA) y pasto elefante (PE)	114
Tabla II2.	Relación obtenida entre la intensidad de absorbancia del número de onda designado a los polímeros	115
Figura II1.	Microscopía electrónica de barrido de las biomásas bagazo de caña de azúcar (BCA) y pasto elefante (PE) antes y después del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido y luego de la acción enzimática	117
Figura II2.	Ensayo cualitativo de actividad endoglucanasa y xilanasas	118
Figura II3.	Actividad enzimática en sobrenadantes libres de células	119
Figura II4.	Zimograma	120
Figura II5.	Gel monodimensional de los extractos de intestino (EI) y del secretoma bacteriano de <i>Nasutitermes aquilinus</i> cultivado en medio mínimo con carboximetilcelulosa (MM-CMC)	121
Figura II6.	Gel bidimensional del secretoma bacteriano de <i>Nasutitermes aquilinus</i> cultivado en medio mínimo con carboximetilcelulosa (MM-CMC)	121
Figura II7.	Diversidad bacteriana analizada por el gen ARNr 16S	122
Figura II8.	Curvas de rarefacción de las comunidades bacterianas cultivables de termitas en medio mínimo con carboximetilcelulosa (MM-CMC)	123
Tabla II3.	Índices de riqueza y diversidad calculados a partir de bibliotecas de clones del gen ARNr 16S	123
Figura II9.	Análisis filogenético de las bacterias cultivables crecidas en MM-CMC de <i>Nasutitermes aquilinus</i> y <i>Cortaritermes fulviceps</i> en base al gen ARNr 16S	124
Tabla II4.	Identificación de proteínas del secretoma de cultivo en carboximetilcelulosa de <i>Nasutitermes aquilinus</i> , mediante espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF	126
Figura III1.	Alineamiento múltiple de GH5CelA	137
Figura III1.	Alineamiento múltiple de GH5CelB	138
Figura III2.	Análisis de las proteínas recombinantes purificadas rGH5CelA y rGH5CelB	139
Tabla III1.	Especificidad de sustrato de rGH5CelA y rGH5CelB	140
Figura III3.	Perfil de actividad celobiohidrolasa de rGH5CelA y rGH5CelB	141
Figura III4.	Cinética enzimática de rGH5CelA y rGH5CelB	142
Figura III5.	Perfil de actividad endoglucanasa de rGH5CelB	143
Figura III6.	Análisis por TLC del patrón de hidrólisis de rGH5CelA y rGH5CelB	144
Figura III7.	Análisis filogenético de GH5CelA y GH5CelB	146
Figura III8.	Modelado molecular de GH5CelA y GH5CelB	149

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS ANEXAS

Tabla A1.	Soluciones, <i>buffers</i> y medio de cultivo	185
Tabla A2.	Distribución de OTUs compartidas a lo largo de las réplicas biológicas de <i>Anthonomus grandis</i> bohemán alimentado con las dietas artificiales lignocelulósicas	187
Tabla A3.	Lista de secuencias de ARNr 16S obtenidas de la bibliotecas de clones	

	CMC- <i>Nasutitermes aquilinus</i> (CMC-NA) y CMC- <i>Cortaritermes fulviceps</i> (CMC-FA)	188
Tabla A4.	Identificación de proteínas correspondientes a las bandas que presentaron actividad en los zimogramas, mediante espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF	193
Figura A1.	Espectros obtenidos mediante Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	192

ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA

AA	Enzimas auxiliares, por sus siglas en inglés
ACN	acetonitrilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
AF	ácido fórmico
AFEX	Explosión de fibra de amoníaco
APS	Persulfato de amonio
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ATFA	ácido trifluoroacético
AV	avicel
BCA	bagazo de caña de azúcar
BCA-P	bagazo de caña de azúcar pretratado con H ₂ SO ₄ diluido
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BG	β-glucanasa
B-G	β-glucosidasa
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BMCC	Celulosa bacteriana microcristalina, por sus siglas en inglés
°C	grados centígrados
CBH	celobiohidrolasa
CBM	dominios de unión a celulosa, por sus siglas en inglés
C/C	Carbonilo/Carbohidrato
CE	Carbohidrato esterasa
Cf	Concentración final
CF	<i>Cortartitermes fulviceps</i>
CHCA	ácido hidroxicinámico
CMC	carboximetilcelulosa
COS	celooligosacáridos
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
DNS	ácido 3,5 dinitrosalicílico, por sus siglas en inglés
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EC	extracto de cabeza
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EI	extracto de intestino entero
EG	endo-β-1,4-glucanasa
EMBRAPA	Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria
ES	Estadio larval
FDA	Fibra Detergente Ácido
FDN	Fibra Detergente Neutro
FT-IR	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier, por sus siglas en inglés
g	gramos
g	fuerza g
GH	glicosil hidrolasa
GT	Glicosil transferasa
h	hora
H ₂ O _b	agua bidestilada

HA	harina de algodón
HBI	intensidad de enlaces hidrógeno
(hemi) celulolítica	actividad hemicelulolítica y celulolítica
IEF	isoelectroenfoque
IMAC	cromatografía de afinidad por iones
IPG	gradiente inmovilizado de pH, por sus siglas en inglés
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, por sus siglas en inglés
kDa	kilo Dalton
l	litro
°L	Grado de lignificación
L/C	Lignina/Carbohidrato
LDA	Lignina detergente ácido
LOI	Índice de orden lateral, por sus siglas en inglés
LPMOs	Monooxigenasas líticas de polisacáridos, por sus siglas en inglés
m/z	relación masa/carga
M	concentración molar
μg	microgramo
μL	microlitro
mA	miliAmpere
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mM	concentración milimolar
MM	medio mínimo
NA	<i>Nasutitermes aquilinus</i>
NBT	cloruro de nitroblue tetrazolium
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
ng	nanogramo
nL	nanolitro
nm	nanómetro
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PASC	celulosa amorfa regenerada, por sus siglas en inglés
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés
PE	pasto elefante
PEC	actividad pectinasa
PE-P	pasto elefante pretratado con H ₂ SO ₄ diluído
PGasa	poligalacturonasa
PL	polisacárido liasa
PMG	polimetilgalacturona
pNP	p-nitrofenol
pNPC	4-nitrofenil-β-D-celobiósido
pNPG	4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido
% p/p	porcentaje de peso en peso
% p/v	porcentaje de peso en volumen
% v/v	porcentaje de volumen en volumen
R	extremos reducidos
RM	rastrojo de maíz

RM-P	rastrajo de maíz con H ₂ SO ₄ diluído
rpm	revoluciones por minuto
S	segundo
SAR	Secuenciación de alto rendimiento
SBS	Sitios de union secundarios, por sus siglas en inglés
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido, por sus siglas en inglés
SDS	dodecil sulfato de sodio
S/G	Siringilo/Guaiacilo
SN	sobrenadante de cultivo libre de células
t	tiempo
TAE	Tris Acetato EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
UI	unidades internacionales de actividad enzimática
V	volts
X-gal	5-bromo-4-cloro3-indolil-β-D-galactósido
XI	xilano

Introducción

Introducción

I. Estado del arte del etanol lignocelulósico

La biomasa lignocelulósica tiene un enorme potencial para contribuir a la demanda mundiales de energía, productos químicos y materiales de una manera renovable y sostenible. Dadas la necesidad creciente de combustibles de transporte líquidos, junto con un incremento en la preocupación por los efectos ambientales, se necesitan cada vez más fuentes de energías sostenibles y amigables con el medio ambiente, entre ellas los biocombustibles. Varios autores proponen la utilización de biomasa lignocelulósica como contribuyente primario en el corto o mediano plazo en la matriz energética (Payne et al., 2015), debido entre otros factores a que la misma es el biopolímero más abundante en la naturaleza y cuenta con los beneficios de ser económica, altamente renovable y tiene una amplia distribución geográfica (Tan et al., 2016; Saini et al., 2015).

La producción actual de biocombustibles se basa principalmente en la conversión del almidón proveniente de cultivos alimentarios como el maíz y la caña de azúcar (Liao et al., 2016), denominados biocombustibles de primera generación. Las principales desventajas de los biocombustibles de primera generación son el uso de cultivos para la alimentación y tierras cultivables para su producción. A mediados de la década del ochenta se se profundizaron las investigaciones en nueva generación de biocombustibles basados en el uso de biomazas no alimentarias, los cuales se denominaron biocombustibles de segunda generación (Lutzen et al., 1983). La utilización de biomasa a partir de residuos agrícolas, agroindustriales o cultivos no alimentarios se considera una forma sostenible de crear productos valiosos sin competir con los recursos alimentarios.

La conversión de biomasa lignocelulósica en bioproductos de alto valor agregado es difícil debido a su naturaleza recalcitrante. Uno de los principales pasos limitantes de la producción de biocombustibles es la conversión enzimática de la celulosa en azúcares (Himmel et al., 2007), y se lo considera el cuello de botella en la producción de biocombustibles (Viikari et al., 2012; Vanholme et al., 2013). Varias

formulaciones enzimáticas microbianas (por ejemplo, Celluclast[®], HTec2[®] Enzymes, Novozyme 188 y Cellic[®] Ctec de Novozymes, Accellerase[®] TRIO de Genencor, CMAX3[®] y 4[®] ambas de Dyadic) se aplican actualmente en industrias a nivel comercial para liberar azúcares fermentables de celulosa, hemicelulosa y pectina para hacer más eficiente la producción de bioetanol, biogás y biopolímeros (Gilbert et al., 2012; Liu et al., 2012, Batista-García et al., 2016). Sin embargo, la estructura global recalcitrante, cristalina y amorfa de la lignocelulosa dificulta el acceso de estas enzimas a sus sustratos diana (Liu et al., 2012). Por esta razón, se necesitan nuevas y mejores enzimas para hacer que la conversión de biomasa sea más efectiva y rentable. Una forma de encontrar estas nuevas actividades para la conversión de biomasa consiste en la prospección de ambientes microbianos que se especializan en la descomposición de la biomasa lignocelulósica. Estos ambientes son vistos como un "tesoro oculto de herramientas enzimáticas" (Gilbert et al., 2008). Por ejemplo, los microorganismos presentes en el intestino de insectos, compost y el rumen son excelentes degradadores de la biomasa lignocelulósica, y aprendiendo de éstos es posible mejorar la conversión actual de la biomasa a bioproductos.

El remplazo de los productos derivados del petróleo por los provenientes de biomasa representa un factor clave en el crecimiento de la industria química. Cada constituyente de la biomasa vegetal puede ser transformado en diversos bioproductos con valor agregado como: combustibles, alimentos, productos agroindustriales y fármacos, entre otros (Welker et al., 2015; Menon & Rao, 2012). Por analogía con las refinerías de petróleo, se ha desarrollado el concepto de biorrefinería para aludir a los procesos de conversión y los equipamientos necesarios para producir biocombustibles, químicos y energía a partir de la biomasa vegetal (Humbird et al., 2011).

La aplicación de las biorrefinerías se ha planteado como un medio para aumentar la viabilidad económica de la industria de los biocombustibles (Kamm & Kamm, 2004), sobre todo por la cogeneración de bioproductos de alto valor. Una alternativa, que valoriza aún más la biorrefinería es la utilización de subproductos o residuos generados durante la producción del biocombustible. Por ejemplo, los residuos ricos en lignina pueden ser quemados en la caldera o convertidos en productos con alto valor (Balat et al., 2008).

En la actualidad la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica permanece en la etapa de estudio de laboratorio, con varias plantas nuevas de demostración en construcción. Solo unos pocos países han podido establecer plantas a nivel comercial utilizando materiales lignocelulósicos como materia prima, entre ellos, Brasil, Estados Unidos e Italia (**Tabla 1**) (Bhatia et al., 2017). Aunque la producción de biocombustibles de segunda generación es más costosa que su generación a partir de petróleo crudo, se espera que los costos de producción disminuyan con los avances en la tecnología (Rosen, 2014).

Para llevar a un nivel comercial la producción biocombustible de segunda generación, será necesario superar ciertas limitaciones tecnológicas que requerirán de tiempo, extensa investigación e inversión (Bhatia et al., 2017).

Tabla.1 Estado actual de la producción de biocombustibles de segunda generación en el mundo.

País	Compania	Producto	Biomasa	Capacidad (L)	Estado
Brasil	GranBio	Etanol	Bagazo de caña de azúcar	82 millones	En operación desde 2014
Japón	BlueFire Renewables	Etanol	Paja de trigo y arroz	44,5 millones	En operación desde 2012
EUA	Coskata	Etanol	Residuos de la agricultura y urbanos	208 millones	En operación desde 2011
EUA	POET-DSM	Etanol	Residuo de cosecha de maíz	3,8 millones	En operación desde 2001
EUA	Verenium	Etanol	Madera blanda y pastos	5,3 millones	Planta demostrativa
Malasia	Pioneer Bio Industries Corp.	Etanol	Palmera Nipa	530 millones	En planificación
Canadá	Enerkem	Etanol	Residuos sólidos urbanos	38 millones	En operación desde 2017
Italia	Beta Renewables	Etanol	Paja de trigo	75 millones	En operación desde 2013

Fuente: Bhatia et al., 2017.

I.1 Fuentes de biomasa lignocelulósicas

Las fuentes principales de biomasa lignocelulósica incluyen: residuos agrícolas, agroindustriales y residuos forestales, cultivos energéticos y desechos municipales.

Los residuos agrícolas utilizados con fines energéticos, se obtienen principalmente de cultivos como el maíz, trigo, arroz y caña de azúcar. Estos residuos

incluyen el rastrojo de maíz (restos de tallos, chalas y mazorcas que quedan luego de la cosecha de los granos) y los tallos y hojas que permanecen en los suelos luego de la cosecha de caña de azúcar, trigo y arroz. Además, a partir del procesamiento de la caña de azúcar se obtienen el bagazo (materia que queda luego de que a la caña de azúcar se le extrae el jugo azucarado) y el residuo agrícola de cosecha (RAC) como subproducto de la industria azucarera. Por otro lado, la biomasa forestal incluye materiales leñosos provenientes principalmente de la tala o la poda de álamo, abedul, arce, sauce y roble (maderas duras), y de maderas blandas como pino, cedro, abeto, secuoya o ciprés. Otros residuos forestales como virutas de madera, aserrín y ramas de árboles en descomposición también se han utilizado como materias primas para la producción de bioetanol (Achinas & Euverink, 2016; Zabed et al., 2016).

Los cultivos energéticos utilizados exclusivamente como materia prima para la producción de bioetanol pueden ser plantas de ciclos C3 o C4. Los cultivos energéticos más comúnmente investigados para bioetanol incluyen miscanthus (*Miscanthus* spp., C4), switchgrass (*Panicum virgatum*, C4), hierba cinta (*Phalaris arundinacea*, C3), junco gigante (*Arundo donax*, C3), pasto elefante (*Pennisetum purpureum*, C4) y alfalfa (*Medicago sativa*, C3). En comparación con otras fuentes de biomasa lignocelulósicas, las gramíneas perennes C4 han demostrado ser más prometedoras ya que poseen una ruta fotosintética más eficiente que resulta en mayores niveles de producción de biomasa en regiones cálidas y templadas (Lewandowski et al., 2003; Zabed et al., 2016).

Los residuos sólidos municipales e industriales de utilidad son aquellos reciclables con alto contenido de celulosa como diarios y cartón, y restos de cáscaras de frutas y verduras (Achinas & Euverink, 2016; Zabed et al., 2016).

En Argentina y Brasil, el bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) presenta un elevado potencial como biomasa para la producción de biocombustibles. A su vez, las gramíneas perennes como el pasto Napier o pasto elefante, (*Pennisetum purpureum* Schumach) constituyen una fuente potencial para este fin en ambos países, debido principalmente a que puede cultivarse de forma sostenible, aplicarse a la producción local entre temporadas de cosecha y por su adaptabilidad en suelos marginales (Lima et al., 2014). Por otro lado, el rastrojo de maíz (rastrojo de *Zea mays*) representa una biomasa residual abundante en las

regiones productoras de maíz, el cual también puede utilizarse para la producción de bioetanol (Kim et al., 2009; Whitman et al., 2011).

I.2 Estructura y composición de la lignocelulosa

La lignocelulosa es el mayor componente de todas las paredes celulares vegetales. Está formado por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Además, contiene otros componentes menores tales como las pectinas, formando una estructura compleja.

La composición de la biomasa lignocelulósica es muy variable, dependiendo de la especie vegetal, de la parte de la planta, de la edad y estadio de crecimiento de la misma. La pared celular esta compuesta de un 40-55% de celulosa, 20-50% de hemicelulosa y 20-35% de lignina. En general, los árboles de madera blanda tienen un mayor contenido de lignina que los de madera dura, mientras que las gramíneas poseen mayor contenido de hemicelulosa (Bajpai, 2014). La composición reportada de diversas biomásas y de los residuos lignocelulósicos más utilizados se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición porcentual de diferentes tipos de biomásas lignocelulósicas

Material	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Maderas duras (<i>hardwoods</i>)	40-55	24-40	18-25
Maderas blandas (<i>softwoods</i>)	45-50	25-35	25-35
Rastrojo de maíz	38-40	28-30	7-21
Bagazo de caña de azúcar	32-48	19-24	23-32
Paja de trigo	30-39	39-50	15-17
Paja de arroz	39-42	20-32	13-14
Paja de cebada	37-38	26-37	16-19
<i>Switchgrass</i>	33-45	25-35	6-18
<i>Miscanthus</i>	38-42	21-23	18-21
Diarios	40-55	25-40	18-30
Residuos Sólidos municipales	33-49	9-16	10-14

Fuente: Sun & Cheng, 2002; Saini et al., 2015; Tan et al., 2016.

I.2.1 Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante del planeta. En la mayoría de los casos, las fibras de celulosa están inmersas en una matriz estructural de otros biopolímeros, principalmente hemicelulosa y lignina. Sin embargo, existen excepciones como las cápsulas de algodón en las que la celulosa está presente casi

en estado puro (Lynd et al., 2002).

Este polisacárido es sintetizado en forma de cadenas lineales de residuos de D-glucosa unidos por enlaces β -(1-4). Posteriormente se asocian 36 moléculas de celulosa individuales para formar las fibrillas elementales. Las microfibrillas de celulosa se forman al ubicarse varias fibrillas elementales de forma paralela entre sí, unidas inter e intramolecularmente por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals (Sorek et al., 2014). Finalmente, varias microfibrillas se ensamblan para formar las fibras de celulosa. El orden de las moléculas en las fibras de celulosa no es uniforme a lo largo de toda su estructura, ya que existen regiones de menor ordenamiento, regiones amorfas, así como regiones de alto grado de ordenamiento o cristalinas (Béguin & Aubert, 1994; Ovando & Waliszewski, 2005) (**Figura 1**).

La estructura e interacción de los componentes de la matriz varían con el tipo de pared celular y la madurez del cultivo (Buxton & Redfearn, 1997) y representan una limitación para la degradación de la biomasa vegetal. A su vez, la incorporación de hemicelulosa durante la formación de las paredes de las células vegetales es uno de los determinantes en los patrones de agregación de la celulosa, actuando como moderador de la estructura terciaria de la celulosa en la pared celular (Atalla et al., 1993).

En las plantas superiores, la mayor parte de las fibras de celulosa existen en forma cristalina (Šturcova et al., 2004; Festucci-Buselli et al., 2007). En la actualidad, existen distintos sustratos comerciales que se preparan a partir de celulosa nativa, de acuerdo a fines específicos para estudios particulares. Por ejemplo, la carboximetilcelulosa (CMC) es un tipo de celulosa soluble, generada por sustitución iónica con grupos carboximetilo. Por otro lado, el denominado Solka Floc (celulosa microfina) es preparado a partir del blanqueamiento de la pulpa de madera de abeto con dióxido de azufre. El Avicel es un tipo de celulosa microcristalina que se prepara a partir de la hidrólisis ácida parcial de fibras de pulpa de madera y luego de secado por *spray* para eliminar gran parte de la fase soluble. La celulosa bacteriana microcristalina (BMCC) se prepara a partir de celulosa bacteriana (producida por *Acetobacter xylium*) sometida a hidrólisis ácida parcial para remover la fracción amorfa de la celulosa. La celulosa de algodón se obtiene a partir del algodón natural, luego de removerle las impurezas como ceras, pigmentos y pectinas. A su vez, el

papel de filtro Whatman N°1 se produce a partir de fibras largas de la pulpa de algodón. Por otro lado, se puede obtener celulosa amorfa a partir de celulosa cristalina por medio de diferentes tratamiento como por ejemplo: ácido fosfórico, álcali, dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros. Un ejemplo de esto es el PASC (de sus siglas en inglés *Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) obtenido por distensión de las fibras con ácido fosfórico concentrado (Zhang & Lynd, 2004).

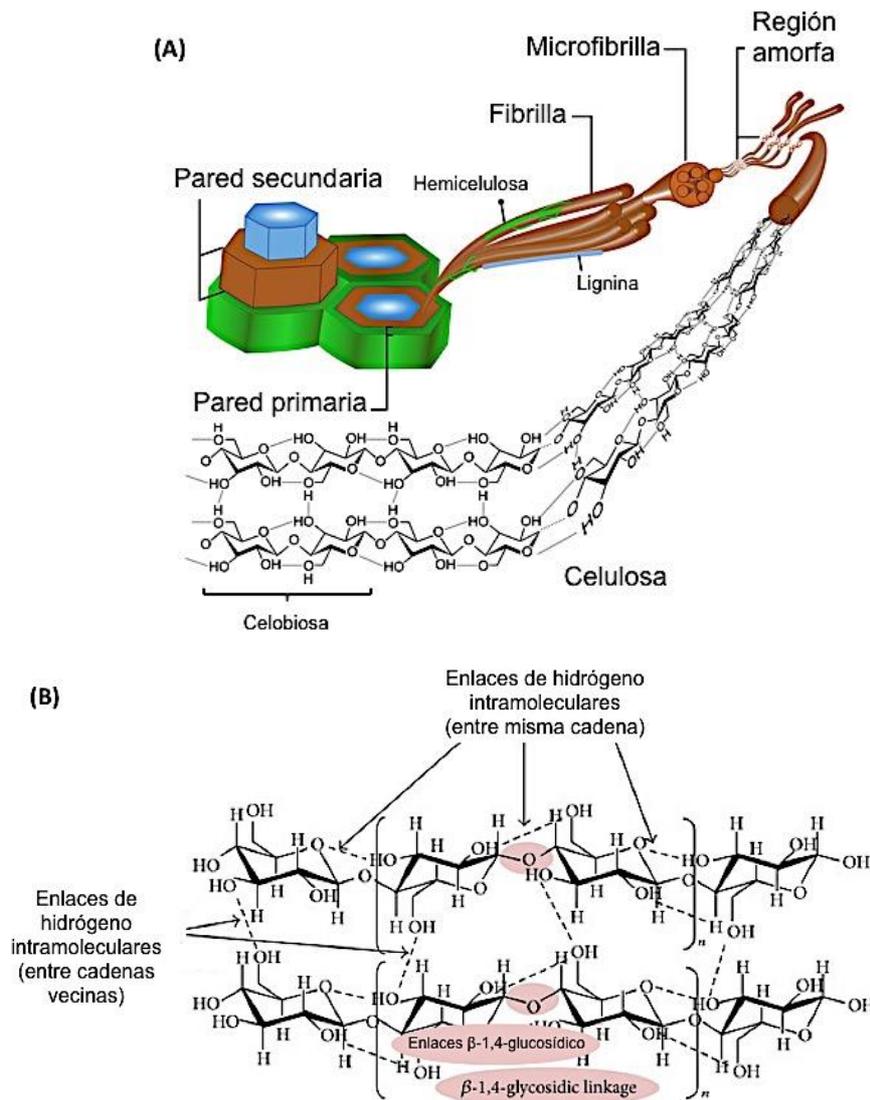


Figura 1. (A) Composición de las fibras de celulosa. Estructura molecular de las fibras de celulosa que forman parte de la pared vegetal. Las cadenas lineales de glucosa se agrupan en microfibrillas, que originan las fibras de celulosa, con regiones amorfas y cristalinas. **(B) Estructura de los puentes de hidrógeno inter- e intra-catenarios en la celulosa.** Modificado de Lee et al., 2014a.

I.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero formado por cadenas lineales de pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa) o hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa) con ramificaciones de diversos tipos de azúcares (Chen, 2014). Las cadenas individuales de las hemicelulosas son más cortas que las de celulosa y normalmente están formadas entre 100 y 200 residuos (Collins et al., 2005). Otros azúcares como α -L-ramnosa y α -L-fucosa pueden estar presentes en pequeñas cantidades y los grupos hidroxilo de los azúcares pueden estar parcialmente substituidos por grupos acetilo (Gírio et al., 2010). Los componentes de la hemicelulosa más relevantes son los xilanos y los glucomananos, siendo los primeros los más abundantes (**Figura 2**). El xilano es un heteropolisacárido complejo con un esqueleto de β -1,4-xilosa rica en cadenas laterales de arabinosa, mientras que los glucomananos consisten en una columna vertebral lineal de unidades β -D-glucopiranósidos y β -D-manopiranósidos, unidos por enlaces glucosídicos β -(1,4), parcialmente acetilados en C2 o C3 y substituidos por unidades de α -D-galactopiranósido unidas a la glucosa y manosa mediante enlaces α -(1,6).

Los xilanos son los componentes principales de la hemicelulosa de las paredes celulares secundarias de maderas duras y plantas herbáceas, alcanzando hasta un 50% en algunos tejidos de cereales y pastos. Asimismo, los mananos, como glucomananos y galactoglucomananos son los componentes mayoritarios de las maderas blandas, estando presentes en maderas duras en cantidades menores (Gírio et al., 2010).

La hemicelulosa se puede unir a las microfibrillas de celulosa mediante enlaces de hidrógeno, formando una protección que impide el contacto entre microfibrillas y produciendo una red cohesiva.

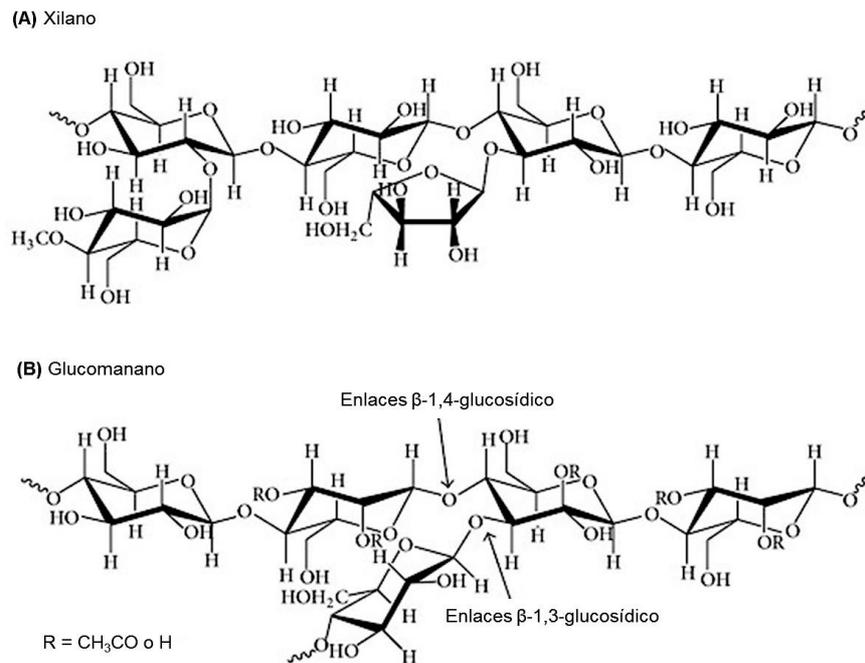


Figura 2. Estructura química de los componentes principales de la hemicelulosa (Lee et al., 2014a).

1.2.3 Lignina

La lignina es el tercer componente principal de las plantas vasculares. En general, las ligninas son copolímeros heterogéneos que derivan principalmente de tres unidades monoméricas de fenilpropano (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico (unidad p-hidroxifenilo), alcohol coniferílico (unidad guayacilo) y alcohol sinapílico (unidad siringilo) (Lee et al., 2014a) (**Figura 3**). Los tres principales monolignoles se forman en el citoplasma, teniendo a la fenilalanina como intermediario clave. Los monolignoles se generan mediante reacciones de desaminación, hidroxilación, reducción y metilación catalizadas por diversas enzimas. Estos monolignoles interactúan en la pared celular, a través de reacciones de oxidación catalizadas por peroxidasas (intermedios radicalarios) para formar finalmente los polímeros de lignina (Liu et al., 2011a).

Los porcentajes de distribución de los principales monolignoles dependen del tipo de planta. El monolignol más abundante en las maderas blandas es el alcohol coniferílico, que puede llegar a superar el 95% del total de monolignoles presentes, mientras que en las maderas duras coexisten fundamentalmente los alcoholes coniferílico y sinapílico. En el caso de plantas del tipo herbáceas, puede haber proporciones similares de los tres monolignoles principales (Upton & Kasko, 2016).

La lignina aporta soporte mecánico a tallos y hojas y da rigidez y fuerza a las paredes vegetales. Existe evidencia que muestra que la lignina junto con otros componentes de la pared celular proveen resistencia a enfermedades, insectos, bajas temperaturas y otras formas de estrés biótico o abiótico (Buxton & Redfearn, 1997). Se ha reportado que un aumento en el contenido de lignina, su composición, hidrofobicidad y las interacciones con otros componentes de la matriz repercuten en una menor degradación de los tejidos vegetales (Grabber, 2005).

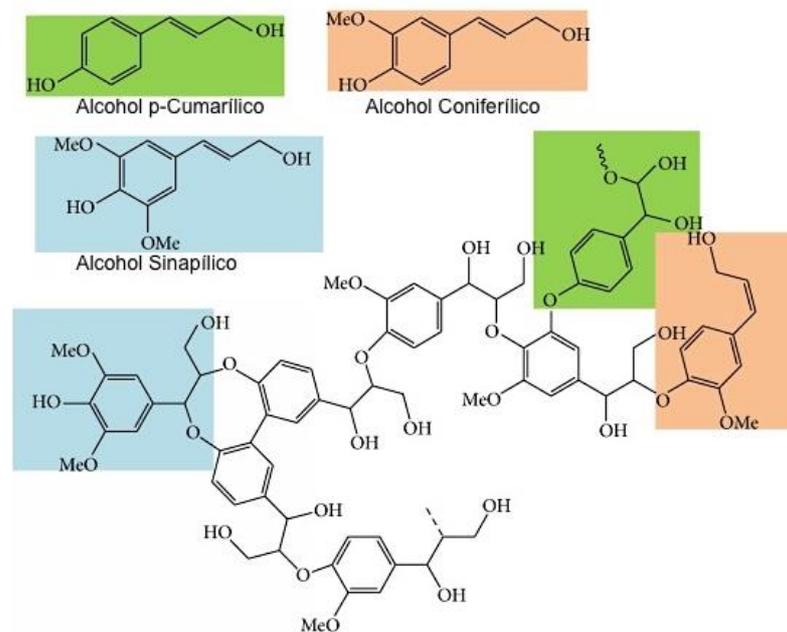


Figura 3. Estructura química de la lignina (alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico). Lee et al., 2014a.

1.2.4 Pectina

La pectina es un polímero heterogéneo soluble en agua, que se intercala en la matriz de celulosa-hemicelulosa de las células vegetales, principalmente en la pared celular primaria y en la laminilla media, favoreciendo la adhesión celular. Estos polímeros pueden a su vez quelar calcio y formar geles viscosos y elásticos (Sorek et al., 2014). La cadena primaria consiste en unidades de α -D-galacturonato unidas mediante enlaces α -(1-4), con un 2-4% de unidades de L-ramnosa unidas por medio de enlaces β -(1-2) y β -(1-4) a las unidades de galacturonato. Las cadenas laterales de arabinanos, galactanos, arabinogalactanos, xilosa o fucosa están conectados a la cadena principal a través de sus átomos C1 y C2 (Jayani et al., 2005). Las pectinas son

abundantes en los residuos, como la pulpa de la remolacha azucarera, los residuos de cítricos, el orujo de manzana y la pulpa de papa, que podrían utilizarse como materia prima para la producción de biocombustibles (Sorek et al., 2014).

II. Enzimas lignocelulolíticas

II.1 Clasificación y características generales

Según la clasificación de enzimas de la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), basada en la especificidad de sustrato, las enzimas celulolíticas se agrupan junto con las hemicelulasas y otras polisacaridasas en *O*-glicosil hidrolasas (GH) bajo el sistema de enumeración de la *Enzyme Commission* (EC), que se basa en las actividades enzimáticas (EC 3.2.1.x) (Lynd et al., 2002). Esta clasificación ha resultado ineficiente debido a la diversidad estructural y al gran número de sustratos que poseen estas enzimas, por lo que surgió una clasificación alternativa, en la cual las GH se agrupan en familias definidas en base a su similitud en la secuencia de aminoácidos (Lombard et al., 2014). Esta clasificación en familias es complementaria a la determinada por la IUBMB porque refleja las características estructurales de la enzima y porque el rango de sustratos rara vez es determinado en forma completa. La base de datos CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*, <http://www.cazy.org/>) describe los dominios catalíticos y de unión a carbohidratos (CBM) de las enzimas implicadas en la degradación, modificación o creación de enlaces glicosídicos. Es así que se encuentran, además de las GH, las glicosil transferasas (GT), las polisacárido liasas (PL), las carbohidrato esterasas (CE) y diversas enzimas auxiliares (AA), como las enzimas degradadoras de lignina y las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO, *lytic polysaccharide mono-oxygenases*) (Levasseur et al., 2013).

Actualmente existen 153 familias de GH en la base de datos CAZy, revisado el 25 de agosto de 2018. Algunas de las familias se han dividido en subfamilias basadas en el análisis filogenéticos con el propósito de facilitar la anotación funcional de las enzimas (Lombard et al., 2014). Las subfamilias son en su mayoría monoespecíficas (las enzimas tienen la misma especificidad de sustrato). Algunas de las familias de GH se agrupan en 17 clanes (definidos en base a similitud en la estructura

tridimensional). Algunas familias contienen enzimas con diferente especificidad de sustrato, por ejemplo la familia GH5 incluye enzimas capaces de degradar celulosa, xilanos, arabinoglucanos, mananos, liquenanos, entre muchos otros sustratos. Esto sugiere una evolución divergente de una estructura básica del sitio activo para acomodar diferentes sustratos. Al mismo tiempo, se encuentran endoglucanasas en varias familias sugiriendo evolución convergente de diferentes estructuras capaces de interactuar con el mismo sustrato.

En algunas celulasas y hemicelulasas libres, la unión a los sustratos está mediada por módulos de unión a carbohidratos (CBM, *carbohydrate-binding module*), los que han sido clasificados en 83 familias CBM de acuerdo a su homología de secuencia de aminoácidos. La unión a la superficie de la celulosa mediante el CBM posiblemente facilita la hidrólisis de la celulosa, ya que permite la proximidad del dominio catalítico al sustrato. La presencia de los CBMs es particularmente importante para la iniciación y la procesividad de las exoglucanasas. A nivel funcional, los CBMs han sido divididos en tres grandes categorías: tipo A, que se unen a la superficie de polisacáridos insolubles, CBM tipo B, que se unen a cadenas de glucanos solubles, y los tipo C, los cuales unen pequeños sacáridos (Boraston et al., 2004).

II.2 Celulasas, hemicelulasas, pectinasas, lacasas y peroxidadas

II.2.1 Celulasas

La degradación eficiente de la celulosa requiere de la acción conjunta de tres tipos de enzimas (**Figura 4**): endoglucanasas (1,4- β -D-glucanasas, EC 3.2.1.4), exoglucanasas (celulosa 1,4- β -D-celobiosidasas EC 3.2.1.91 y 1,4- β -D-glucanoglucanohidrolasas, celodextrinasas, EC3.2.1.74) y las β -glucosidasas (β -glucosidasas, EC 3.2.1.21), las cuales actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa. Se ha propuesto como modelo de acción que las endoglucanasas atacan las regiones amorfas de las fibras de celulosa generando nuevos extremos reductores y no reductores en la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes. Las exoglucanasas degradan de forma procesiva las cadenas de celulosa, tanto desde los extremos reductores como desde los no reductores, liberando celobiosa o glucosas (Lynd et al., 2002). Las unidades de celobiosa y

celooligosacáridos de cadena corta son convertidas a glucosa por la acción de las β -glucosidasas (**Figura 4**).

Se han descrito endoglucanasas en las familias GH5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 74 y 124. Por su parte, las celodextrinasas se agrupan en las familias GH1, 3, 5 y 9 y celobiohidrolasas en las GH5, 6 y 9. Las β -glucosidasas forman parte de las familias GH1, 3, 5, 9, 30 y 116.

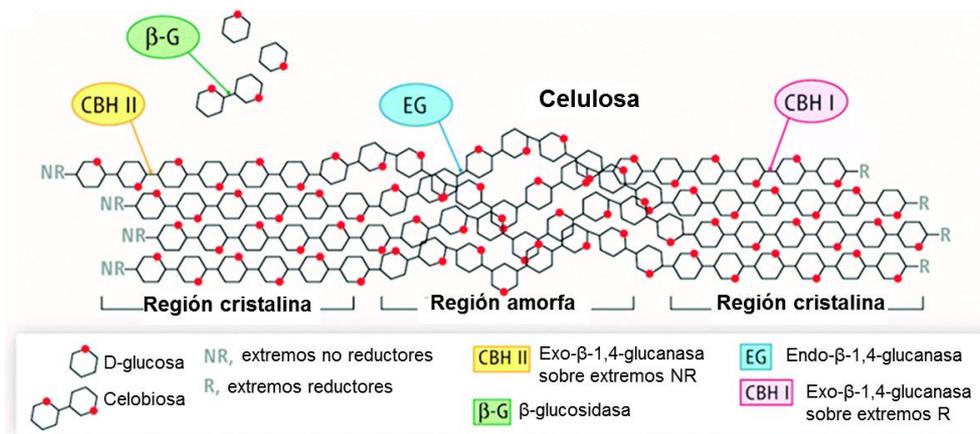


Figura 4. Degradación enzimática de la celulosa. Las endoglucanasas (EG) clivan internamente las cadenas de celulosa, generando extremos reductores (R), en los cuáles actúan las celobiohidrolasas (CBH). Las β -glucosidasas (β -G) hidrolizan la celobiosas y la celobiosas oxidada generadas por CBHs, liberando glucosa. Modificado de Berlin, 2013.

Recientes descubrimientos agregaron otra enzima al mecanismo de degradación de la celulosa, las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) (Vaaje-Kolstad et al., 2010; Forsberg et al., 2011; Horn et al., 2012). Las LPMOs son enzimas que dependen de cobre y rompen los enlaces glicosídicos de manera oxidativa (Johansen, 2016) y, por lo tanto, requieren de oxígeno para funcionar como un agente reductor. Las LPMOs atacan las regiones cristalinas de la celulosa, haciéndola más accesible para las endoglucanasas y las celobiohidrolasas (Kostylev & Wilson, 2012) (**Figura 5**). Debido a que la suplementación con LPMOs ejerce un fuerte efecto en combinación con otras GH, estas se pueden utilizar para mejorar la degradación enzimática de las biomásas recalcitrantes. Hasta el momento sólo se han descrito cinco familias de LPMOs, AA9, AA10, AA11, AA13 y AA14, en la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy).

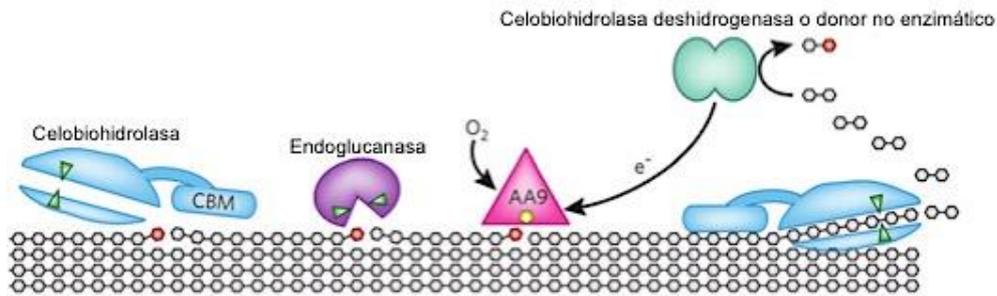


Figura 5. Modo de acción y estructura de las LPMOs celulolíticas. Sistema de degradación enzimática fúngica de la celulosa. Los ataques iniciales de la LPMO AA9 generan regiones parcialmente amorfas con extremos reductores que se convierten en puntos de unión de enzimas hidrolíticas, como la celobiohidrolasa y endoglucanasa. Dutta & Wu, 2014.

II.2.2 Hemicelulasas

Debido a la variedad de componentes de la hemicelulosa y su compleja organización, su degradación requiere de la acción de varias enzimas. Las hemicelulasas son un grupo de diversas proteínas modulares con dominios catalíticos y accesorios, estos últimos principalmente involucrados en la interacción con el sustrato o con otras enzimas. Los dominios catalíticos pueden ser GH, los cuales hidrolizan enlaces glicosídicos, o carbohidrato esterasas (CE), los que hidrolizan las uniones éster de los grupos laterales acetato o de ácido ferúlico (**Figura 6**) (Shallom & Shoham, 2003).

Las xilanasas (EC 3.2.1.8) clivan los enlaces β -1,4 en la cadena del xilano, generando xilooligosacáridos como producto de hidrólisis. Aunque la mayoría de las xilanasas conocidas pertenecen a las familias GH10 y GH11, existen representantes de estas enzimas en las familias GH5, 8, 26, 30, 43 y 51. Por otro lado, las β -xilosidasas (β -1,4-xilosidasas EC 3.2.1.37) actúan sobre xilooligómeros de cadena corta y xilobiosa, liberando xilosa, y pertenecen a las familias GH1, 3, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 y 120 (Couturier & Berrin, 2013).

Las β -mananasas (endo- β -1,4-mananasas EC 3.2.1.78) hidrolizan la hemicelulosa de tipo manano o glucomanano, liberando oligómeros cortos de β -1,4-mananos, pertenecientes a las familias GH5, GH26 y GH113. Las manosidasas (β -manosidasas EC 3.2.1.25) por su parte liberan manosa y manooligosacáridos de los extremos no reductores originados por las mananasas y se incluyen en las familias GH1, GH2 y GH5. Las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) y α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) son

enzimas de relevancia en la hidrólisis de gluco y galactomananos, respectivamente (Malgas et al., 2015).

Las α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55) y las α -L-arabinanasas (EC 3.2.1.99) degradan la fracción de hemicelulosa compuesta por arabinofuranósidos, los xilooligómeros y los arabinanos, y se encuentran en las familias GH3, 43, 51, 54 y 62. A su vez, las α -D-glucuronidas clivan los enlaces 1,2-glicosídicos del ácido 4-O-metil-D-glucurónico presente en las cadenas laterales de los xilanos. Estas enzimas están exclusivamente presentes en las familias GH4 y GH67.

Las esterasas hemicelulolíticas incluyen las xilano esterasas (EC 3.1.1.72) que rompen las sustituciones acetyl en los motivos xilosa, y las feruloil esterasas (EC 3.1.1.73), que hidrolizan los enlaces éster entre la arabinosa y el ácido felúrico. Este tipo de enlace está implicado en el entrecruzamiento entre el xilano y la lignina.

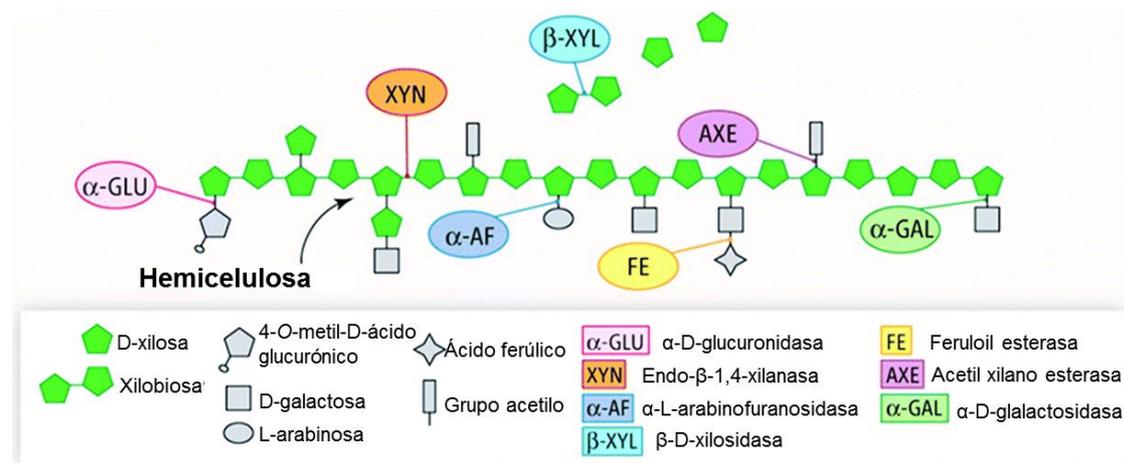


Figura 6. Degradación enzimática de la hemicelulosa. Modificado de Berlin, 2013.

II.2.3 Pectinasas

Las pectinasas son un grupo de enzimas que catalizan la degradación o modificación de sustancias pécticas. Las enzimas pectinolíticas se pueden dividir en tres grupos amplios:

(i) Protopectinasas: degradan la protopectina (pectina insoluble del tejido vegetal que se encuentra en las frutas inmaduras) y dan lugar a pectina soluble altamente polimerizada (Jayani et al., 2005).

(ii) Pectin esterasas (E.C.3.1.1.11), a menudo denominadas pectinmetilesterasas, son esterasas de ácido carboxílico y pertenecen al grupo de las enzimas hidrolasas. Catalizan la desesterificación de la pectina mediante la eliminación de ésteres metoxílicos formando ácido péctico y metanol. Este grupo de enzimas actúa preferentemente sobre grupos metil éster de unidades de galacturonato próximas a unidades de galacturonato no esterificadas (Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005).

(iii) Depolimerasas: catalizan la escisión hidrolítica de los enlaces α -(1-4) glucosídicos en los restos de ácido D-galacturónico de las sustancias pécticas. Estas se dividen en hidrolasas y liasas.

Dentro de las hidrolasa se encuentran las poligalacturonasas (PGasas), que son enzimas pectinolíticas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -1,4-glucosídicos en ácido péctico (ácido poligalacturónico). Las PGasas implicadas en la hidrólisis son endo-PGasa (E.C. 3.2.1.15) y exo-PGasa (E.C. 3.2.1.67). Además se encuentran las polimetilgalacturonasas (PMG) del tipo endo-PMG y Exo-PMG (Jayani et al., 2005).

Las pectin liasas o transeliminadas actúan rompiendo el doble enlace entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido galacturónico, hidrolizando el enlace glucosídico en las pectinas de alto metoxilo. Las liasas se pueden clasificar en los siguientes tipos en función del patrón de acción y del sustrato sobre el que actúan: endopoligalacturonato liasas (EndoPGL, E.C. 4.2.2.2); exopolisacturonato liasas (ExoPGL, E.C. 4.2.2.9); endopolimetilgalacturonato liasas (EndoPMGL, E.C. 4.2.2.10) y exopolymethylgalacturonate liasas (ExoPMGL) (Jayani et al., 2005).

II.2.4 Lacasas y peroxidasas

Dada la estructura química de la lignina, formada por unidades de fenilpropanoides, sólo un grupo reducido de peroxidasas altamente especializadas es capaz de degradar este tipo de compuestos. Es así como el peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente oxida al polímero de lignina en una reacción catalizada por peroxidasas altamente especializadas (Martínez et al., 2009). Las enzimas lignolíticas oxidativas se clasifican en dos grupos: fenol oxidasas y hemo peroxidasas. Las enzimas fenol oxidasas incluyen a lacasas (EC 1.10.3.2) o *p*-difenol diogixen oxidoreductasas (EC 1.11.1.14), mientras que las hemo peroxidasas incluyen a lignina

peroxidasas (EC 1.11.1.13), peroxidasas versátiles (EC 1.11.1.16) y peroxidasas del tipo dyP (EC 1.11.1.19). También están implicadas en la degradación de la lignina algunas enzimas accesorias como la aril-alcohol oxidasas (EC 1.1.3.7), glioxal oxidasas (EC 1.2.3.5) y glucosa-oxidasa (EC 1.1.3.4), que generan el peróxido de hidrógeno requerido por las peroxidasas. La delignificación de la biomasa lignocelulósica es un paso importante en la bioconversión de lignocelulosa a etanol y este proceso sigue siendo un desafío en la valorización de biomasa (Falade et al., 2017).

III. Mecanismos de degradación de la lignocelulosa

III.1 Degradación microbiana de la celulosa

Los microorganismos utilizan diferentes estrategias para la degradación de la celulosa. Los mecanismos más conocidos son los denominados enzimas liberadas y celulosomas. Todos estos mecanismos tienen en común la translocación de las celulasas sobre la membrana celular externa, ya que los microorganismos son incapaces de transportar moléculas grandes como la celulosa a la célula (Wilson, 2011).

El primer mecanismo de enzimas libres secretadas (**Figura 7A**), es utilizado principalmente por microorganismos aerobios (Wilson, 2011). Las celulasas individuales libres son secretadas en el ambiente rico en celulosa, donde degradan la celulosa en azúcares simples que pueden ser luego absorbidos y utilizados por los microorganismos. Al lado del dominio catalítico, algunas celulasas contienen un CBM, para unir la enzima a la celulosa y pueden contener dominios adicionales (Wilson, 2008).

Los celulosomas son complejos multienzimáticos capaces de degradar la celulosa de forma muy eficiente (**Figura 7B**). Estos son producidos principalmente por bacterias anaerobias, principalmente por especies de *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Acetivibrio* y *Bacteroides*. Se ha reportado que varios hongos anaerobios son capaces de secretar complejos del tipo celulosoma (Doi & Kosugi, 2004). Una característica central de los celulosomas es la presencia de una subunidad no catalítica de andamiaje o *scaffolding* (Bayer et al., 2004), encargada de varias funciones, como la incorporación de enzimas al complejo por interacciones específicas cohesina-

doquerina. El anclaje del complejo a la membrana celular y la orientación del complejo hacia el sustrato celulósico, ocurre mediante dominios de unión a celulosa (CBM) (Doi & Kosugi, 2004). La función de los módulos de cohesina es la unión a módulos de doquerina presentes en unidades catalíticas u otras unidades de *scaffolding*. La interacción cohesina-doquerina es fundamental para la formación del celulosoma.

A su vez, para que los diferentes componentes del celulosoma interactúen con los diferentes sustratos, las enzimas celulosomales poseen varios tipos de CBMs de diferentes familias, los cuales exhiben especificidad para los diferentes sustratos. Cuando el celulosoma está unido a la superficie celular, el mismo CBM guía a la célula completa hacia el sustrato (Bayer et al., 2004).

Tanto las enzimas libres (no celulosomales) como las que forman el complejo enzimático, poseen dominios catalíticos similares, frecuentemente pertenecientes a las mismas familias GH. La diferencia entre ellas es que las enzimas libres suelen poseer un módulo de unión a sustrato el cual en las enzimas celulosomales es sustituido por un módulo doquerina (Bayer et al., 2004). El espectro de enzimas asociadas a los celulosomas incluye numerosas endo y exoglucanasas, muchas de las cuales suelen ser procesivas. Otras enzimas degradadoras de polisacáridos, como hemicelulasas, quitinasas y liasas de pectina también se pueden asociar a celulosomas. Más allá de las diferencias en los sistemas celulolíticos de los hongos filamentosos y las bacterias, las celulasas celulosomales de las familias GH5, 9 y 48 son especialmente prevalentes, aunque existen miembros que contienen los módulos de doquerina en al menos 20 familias adicionales (Bayer et al., 2004).

Recientemente se describió un posible modelo de utilización de celulosa en hongos anaeróbicos, frecuentemente aislados del tracto digestivo de herbívoros (*Neocallimastix* sp. y *Orpinomyces* sp.) mediante la formación de complejos similares a los celulosomas (**Figura 7C**), pero que no se anclan a la pared celular fúngica, sino que son secretados (Haitjema et al., 2014).

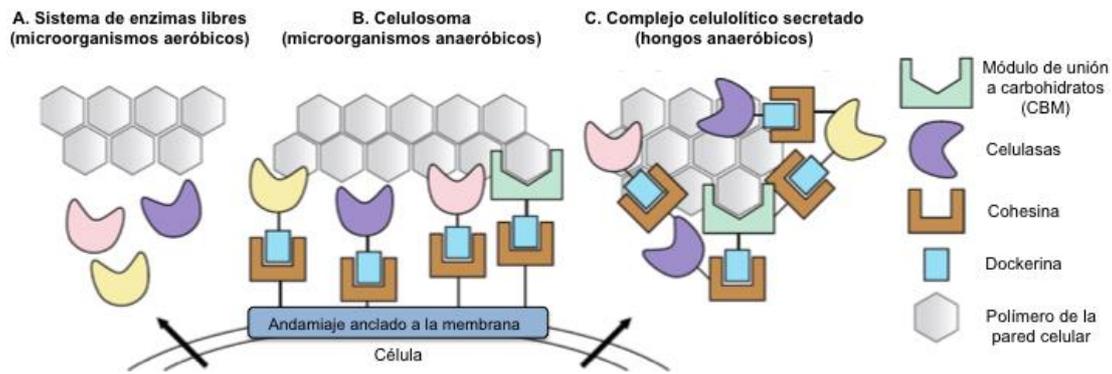


Figura 7. Modelo esquemático de los mecanismos de hidrólisis de celulosa. Los microorganismos aeróbicos secretan las enzimas al medio extracelular (A), mientras que los anaeróbicos forman complejos multienzimáticos llamados celulosomas (B). En hongos anaeróbicos (C) se postula la formación de complejos enzimáticos que son secretados al medio extracelular. Modificado de Haitjema et al., 2014.

En la naturaleza, gran variedad de microorganismos poseen enzimas capaces de hidrolizar la biomasa lignocelulósica. Estos se multiplican en varios ambientes y bajo diferentes condiciones de oxígeno, temperatura, salinidad, entre otras.

Tradicionalmente, las bacterias, los hongos y las plantas han sido el foco principal de investigación sobre las celulasas y hemicelulasas debido a sus conocidas actividades celulolíticas y a su facilidad de cultivo y manipulación (Watanabe & Tokuda, 2001). En los últimos años, la actividad celulolítica endógena reportada en artrópodos y moluscos aumentó el interés en estas especies como posibles fuentes de enzimas degradadoras de lignocelulosa (Watanabe & Tokuda, 2001; Oppert et al., 2010). Los insectos son reconocidos como degradadores eficientes de la biomasa lignocelulósica, generalmente consumen productos de papel, madera, productos alimenticios amiláceos, harina y cartón. Los primeros trabajos con celulasas de intestino de insectos se centraron en la presencia de bacterias simbióticas como únicos productores de las mismas. Sin embargo, el descubrimiento de una celulasa endógena en el intestino de la termita inferior *Leucotermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae) dio lugar a investigaciones encaminadas a identificar celulasas endógenas de insectos (Yokoe, 1964). En la actualidad, se conoce que algunas especies de insectos pertenecientes a varios órdenes taxonómicos expresan genes de celulasas endógenas, incluidos Isoptera, Hymenoptera, Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera y Blattodea (Watanabe & Tokuda, 2010). Los insectos son candidatos atractivos y potenciales como biorreactores naturales altamente eficientes, a partir

de los cuales se buscan nuevas enzimas celulolíticas. El número de nuevas celulasas y hemicelulasas, así como los genes codificantes asociados, de una variedad de insectos que se alimentan de celulosa se han actualizado continuamente en los últimos años (Puchet et al., 2014; Valencia et al, 2013; Zhang et al., 2018).

III.2 El intestino de insectos como hábitat de microorganismos celulolíticos

III.2.1 Estructura y propiedades de los intestinos de insectos

El sistema digestivo de los insectos normalmente consiste en un tubo continuo que se extiende desde la boca al ano. La estructura básica del tracto digestivo es similar en todos los insectos, aunque poseen diversas modificaciones asociadas con la adaptación a los diferentes modos de alimentación, generalmente es más corto en especies carnívoras y más largo en insectos fitófagos. En general, el tubo digestivo consta de tres regiones primarias: el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior (**Figura 8**). Cada una de estas regiones está dedicada a procesos específicos: el intestino anterior está dedicado a la ingesta y almacenamiento de alimentos, el filtrado y la digestión parcial; el intestino medio es el sitio primario de digestión y absorción; finalmente, en el intestino posterior, se completa la absorción y se forman las heces (Stefanini, 2018).

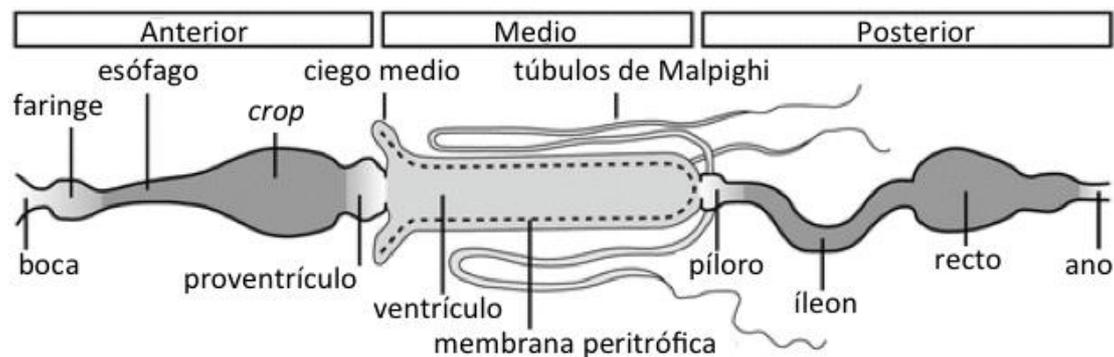


Figura 8. Descripción de las partes que componen el tracto intestinal de insectos. El intestino anterior y el intestino posterior están recubiertos por una capa de cutícula (línea negra gruesa), y el intestino medio segrega una matriz peritrófica (línea punteada).

III.2.2 Sistema digestivo en insectos

En insectos las glándulas salivales se encuentran localizadas en la parte superior del canal y producen la saliva, un líquido acuoso rico en enzimas necesarias para el procesamiento inicial de los alimentos (Gillott, 2005a). Las enzimas presentes

en la saliva varían ampliamente entre diferentes especies de insectos, de acuerdo con sus hábitos de alimentación (Gillott, 2005a). Una vez ingerido, el alimento ingresa al intestino anterior, donde se somete a un procesamiento inicial. El intestino anterior abarca la faringe, el esófago y el *crop* y está revestido con una cutícula que se desprende en cada muda (Chapman, 1998). La función del proventrículo, ubicado entre el *crop* y el intestino, varía en los diferentes insectos. Puede actuar como una válvula, regulando el paso de los alimentos desde el intestino anterior al intestino medio, como un filtro, reteniendo los componentes sólidos de los alimentos, o como un molino, rompiendo los alimentos en piezas más pequeñas (Chapman, 1998). Se ha demostrado que esta estructura particular desempeña un papel en la regulación de la progresión de microorganismos al intestino posterior de algunos insectos. En los insectos sociales, el *crop* actúa como un órgano de almacenamiento de alimentos, un recurso disponible tanto para el individuo como para otros adultos o larvas, que se alimentan mediante trofalaxis. Generalmente, el pH del intestino anterior es similar al del alimento ingerido, pero en algunos insectos es <7 debido a la presencia de microorganismos digestivos o por el alimento regurgitado desde el intestino medio (Gillott, 2005b).

El intestino medio es el sitio primario de digestión y absorción en muchos insectos. A diferencia del intestino anterior, el intestino medio no se encuentra recubierto de una capa de cutícula, sino por una matriz peritrófica compuesta de proteínas y quitina que se reemplaza continuamente a medida que se desprende. La matriz peritrófica divide el intestino medio en el espacio endo y ectoperitrófico, y los microorganismos generalmente se limitan a la primera, evitando su contacto directo con el epitelio del intestino medio. La matriz peritrófica cumple una variedad de funciones que incluyen: 1) proporcionar una barrera que protege el epitelio del daño mecánico de las partículas de alimentos, de la exposición a grandes moléculas de toxinas presentes en los alimentos, y de la invasión microbiana, 2) concentrar alimentos y enzimas digestivas (Gillott, 2005b). En algunos casos, la matriz peritrófica empaqueta el bolo alimenticio no digerido a medida que se mueve a través del tracto digestivo (Watanabe & Tokuda, 2010; Engel & Moran, 2013a). El pH del intestino medio varía según la especie de insecto y la región del intestino (Stefanini, 2018).

El intestino posterior se encuentra recubierto por una capa de cutícula, al igual que el intestino anterior, pero ésta es más delgada debido a la función de absorción que desempeña esta porción del intestino. Los órganos excretores de los insectos son los túbulos de Malpighi, estructuras dedicadas a la absorción de solutos, agua y desechos de la hemolinfa, que ingresan al intestino a la altura de la primera parte del intestino posterior y a la producción de ácido úrico (Beyenbach et al., 2010). El intestino posterior está compuesto de tres regiones: píloro, íleon y recto. El píloro puede estar rodeado por un músculo circular que es el encargado de regular el movimiento de los alimentos digeridos desde el intestino medio hacia el intestino posterior (Chapman, 1998). En general, el íleon tiene la función de transferir la comida al recto, pero en algunos insectos puede ocurrir la absorción de agua y iones. En algunas especies, la producción y la excreción de desechos nitrogenados ocurren en el íleon. En muchos insectos que degradan madera (por ejemplo, ciertas especies de termitas y escarabajos), el íleon se dilata para formar una bolsa de fermentación que contiene bacterias o protozoos que digieren las partículas de madera (Gillott, 2005b). El recto está involucrado en la absorción de agua, iones y pequeñas moléculas orgánicas, así como en la producción de heces. Debido a la presencia de ácido úrico, el pH del intestino posterior es típicamente 7.

El diseño básico de los intestinos de insectos muestran muchas modificaciones que reflejan las adaptaciones a nichos especializados y hábitos alimenticios. Muchas de estas especializaciones evolucionaron para albergar los microorganismos intestinales en regiones específicas del intestino.

En el caso de las termitas, presentan estructuras más especializadas del intestino posterior, así como el colon anterior o *paunch*, desarrollado de forma prominente. Por lo tanto, el intestino posterior de las termitas consiste en el íleon (P1), la válvula entérica (P2), el paunch (P3), el colon (P4, esta región se subdivide en algunos casos en P4a y P4b), y el recto (P5) (Watanabe & Tokuda, 2010).

III.2.3 Estabilidad del intestino de insectos como hábitat microbiano

Desde la perspectiva de la colonización microbiana, los intestinos de insectos a menudo se presentan como ambientes inestables (**Figura 9**). Los insectos mudan numerosas veces durante el desarrollo de las larvas, desprendiendo el revestimiento

exoesquelético del intestino anterior y el intestino posterior cada vez y, por lo tanto, perturbando o eliminando severamente cualquier población microbiana adherida. El intestino medio produce y desecha repetidamente la matriz peritrófica y junto con ella los microorganismos asociados, la mayoría de los cuales no cruzan al espacio adyacente a las células epiteliales del intestino medio. En los insectos holometábolos con distintas fases de desarrollo (etapas larvarias, pupa y adulto), se produce una remodelación radical del intestino y otros órganos durante la metamorfosis, con la eliminación de todo el intestino y el contenido de las larvas como un meconio que está envuelto en la matriz peritrófica de la etapa pupal. En un estudio sobre la persistencia de microorganismos intestinales durante el desarrollo en varias especies de mosquitos se observó que la metamorfosis resulta en la eliminación completa o casi completa de las bacterias intestinales, dando origen a adultos que no contienen bacterias en sus intestinos (Moll et al., 2001). Sin embargo, muchos intestinos presentan criptas especializadas o *paunches* que promueven la persistencia microbiana. En los insectos que no mudan, una vez que alcanzan la etapa adulta, seguido de la muda final, la pared del intestino anterior o del intestino posterior proporciona una superficie estable para la colonización.

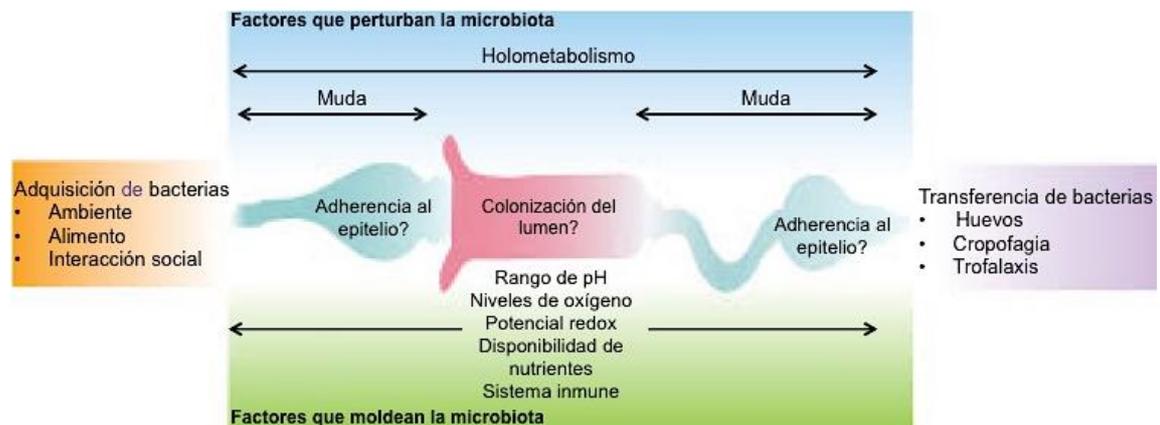


Figura 9. Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal de los insectos. Modificado de Engel & Moran, 2013a.

El ciclo de vida básico de los insectos también presenta desafíos potenciales para la transmisión de microorganismos entre generaciones. En la mayoría de los insectos, las hembras abandonan los huevos después de depositarlos y el único comportamiento social implica el apareamiento de los adultos. Como resultado, las

oportunidades para la transferencia directa de simbioses intestinales entre organismos de la misma especie son más limitadas en la mayoría de los insectos en comparación con los mamíferos y las aves, que tienen un contacto extendido entre padres e hijos. Sin embargo, algunas especies de insectos, incluyendo las cucarachas, termitas, hormigas y algunas avispas y abejas, muestran un comportamiento gregario o social, que incluye la trofalaxis oral o coprofagia, que puede permitir la transmisión social directa o indirecta, promoviendo así la evolución de simbioses especializados dependientes del huésped (Hongoh et al., 2005, 2006; Martinson et al., 2012). Además, las hembras a veces muestran mecanismos sofisticados para inocular huevos o la prole con los simbioses microbianos, lo que permite asociaciones a largo plazo (Hosokawa et al., 2007; Kuechler et al., 2012).

En algunos grupos de escarabajos existe una transmisión específica de los endosimbioses asociados con el intestino por la madre. Los gorgojos del grano (género *Sitophilus*) contienen endosimbioses verdaderos que se transmiten a través de los huevos y viven en el citosol de las células del intestino anterior y en los adultos migran a las células epiteliales del intestino medio, aparentemente utilizando sistemas de secreción bacteriana de tipo III para la invasión celular (Dale et al., 2002). Por otro lado, los endosimbioses del escarabajo de la caña (Chrysomelidae: Donaciinae) también son transmitidos verticalmente, pero éstos residen en la luz intestinal, dominando la comunidad intestinal, y se concentran en grandes ciegos intestinales en larvas y en regiones especializadas de túbulos de Malpighi en adultos. Como en el caso de plataspid - *Ishikawaella capsulata*, se someten a una eficiente transmisión materna, lograda por medio del frotamiento de los huevos por las madres seguido de la ingestión por las larvas nacidas. Los análisis filogenéticos realizados indicaron que esto resultó en una coevolución a largo plazo de los hospedadores y sus endosimbioses (Kolsch & Pedersen, 2010).

III.2.4 Condiciones fisicoquímicas en los intestinos de insectos

La colonización microbiana también depende de las condiciones fisicoquímicas del lumen de los diferentes compartimentos intestinales, ya que éstos pueden mostrar una variación extrema en el valor de pH y la disponibilidad de oxígeno. El pH del lumen está activamente regulado y a menudo difiere del de la

hemolinfa, que generalmente es cercano a 7.

En los intestinos de insectos con grandes comunidades microbianas, el metabolismo microbiano contribuye activamente a formar las condiciones dentro de la luz de los diferentes compartimentos intestinales. Por ejemplo, en las larvas del escarabajo *Pachnoda ehippiata*, los productos de fermentación microbiana, incluyendo acetato, formiato y lactato, son abundantes tanto en el intestino medio como en el intestino posterior, aunque los perfiles difieren entre los dos compartimentos. El estudio del pH a lo largo del tracto intestinal de *P. ehippiata* mostró una variación regular y pronunciada, con valores cercanos a 8 en el intestino medio anterior, aumentando a $\text{pH} > 10$ en el centro del intestino medio y cayendo a 7 en el intestino posterior (Lemke et al., 2003) donde las densidades microbianas son más altas (Cazemier et al., 1997). Por el contrario, los lúmenes intestinales de algunos insectos no holometabólicos a menudo muestran gradientes de pH menos extremos (Appel & Martin, 1990). Las termitas son una excepción, con un pH que varía desde 5 a 12 en los intestinos de algunas especies que se alimentan de suelo (Brune & Ohkuma, 2010; Köhler et al., 2012). La alcalinidad extrema en algunos compartimientos de los intestinos de algunas termitas no previene completamente la colonización microbiana, sino que favorece el crecimiento de bacterias simbióticas alcalinas tolerantes especializadas de *Firmicutes*, *Clostridium* y *Planctomycetes* (Köhler et al., 2008; Bignell, 2011). La oxigenación de los intestinos en los insectos puede variar completamente de aeróbica a anaeróbica. Las condiciones anaeróbicas son más comunes en insectos grandes y en los insectos que tienen agrandados los compartimentos intestinales y comunidades intestinales robustas (Appel & Martin, 1990; Johnson & Barbehenn, 2000).

El sistema digestivo de las termitas es considerado un ambiente anaeróbico debido a la gran comunidad de microorganismos estrictamente anaeróbicos presentes en el intestino posterior. Allí los microorganismos intestinales simbióticos despolimerizan la celulosa y la hemicelulosa y fermentan los carbohidratos generados en ácidos grasos de cadena corta, que luego son absorbidos y oxidados por el huésped (Brune & Friedrich, 2000). Sin embargo, los intestinos de las termitas mantienen las condiciones anóxicas debido a sus pronunciados gradientes de oxígeno en la interfase oxo-anóxica, lo que genera un influjo continuo de O_2 en el

intestino. En la termita inferior *Reticulitermes flavipes*, los estudios con radiotrazadores muestran un flujo de O₂ a través del epitelio intestinal que se reduce en la periferia del intestino posterior (Boga & Brune, 2003; Navodita & Erdei, 2018).

III.3 Sistemas celulolíticos en las termitas

Las termitas (Isoptera) tradicionalmente se dividen en termitas inferiores y superiores (Kumari et al., 2006). Las termitas inferiores (Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae y Serritermitidae) albergan procariontes y protistas flagelados en sus intestinos, mientras que las termitas superiores (familia Termitidae) carecen de protistas simbiotes (Abe et al., 2000). Algunas especies de termitas superiores cultivan en sus nidos un hongo basidiomiceto, género *Termitomyces*, que al alimentarse de las heces de la casta trabajadora ayuda a la digestión de la madera preprocesada (Mueller & Gerardo, 2002).

La degradación de la lignocelulosa en las termitas depende de un sistema dual que incluye tanto las actividades del huésped como de sus endosimbiontes intestinales. El paso de los alimentos a través del tracto digestivo toma alrededor de 24 h (König et al., 2013; Sun & Zhou, 2013). El proceso digestivo comienza en la mandíbula, donde la biomasa se reduce a tamaños de partículas pequeños. Esta fragmentación mecánica de los alimentos es ayudada por las enzimas de las glándulas salivales para maximizar la degradación de la lignocelulosa (Ohkuma, 2003; Hongoh, 2011; Ni & Tokuda, 2013; Talia & Arneodo, 2018). La presencia de microorganismos simbióticos intestinales productores de enzimas celulolíticas (incluidos protistas, arqueas, bacterias y hongos) ha sido reportado en termitas (He et al., 2013; Scharf & Tartar, 2008; Ni & Tokuda, 2013; Tartar et al., 2009).

III.3.1 Termitas inferiores

En las termitas inferiores, que generalmente son xilófagas, el proceso celulolítico comienza en el intestino anterior; los fragmentos de madera cortados por las mandíbulas son triturados por la molleja muscular (*gizzard*) en partículas más

pequeñas (10-20 μm de diámetro). Las enzimas endógenas secretadas por las glándulas salivales hacia el intestino anterior inician la hidrólisis de la celulosa. Varios estudios han señalado a las glándulas salivales como fuente de endoglucanasas (EG) principalmente (Watanabe et al., 1997; Zhou et al., 2007; Brune, 2014). La producción de β -glucosidasas (BG) en este órgano también ha sido establecido para varias especies de termitas (Tokuda et al., 2002; Shimada & Maekawa, 2010; Zhang et al., 2012). En el intestino medio, la elevada concentración de EG hidrolizan las regiones amorfas de las fibras de celulosa, y la acción sinérgica de las BG previene de la inhibición por producto al reducir la acumulación de celobiosa (Watanabe & Tokuda, 2010; Ni & Tokuda, 2013; Brune, 2014). Finalmente, los flagelados protistas alojados en el intestino posterior producen los tres tipos de celulasas principales (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas), así como hemicelulasas. Dentro de las vacuolas digestivas de los protozoos, estas enzimas cooperan en la hidrólisis de la hemicelulosa, la celulosa cristalina y otros remanentes ingeridos (**Figura 10**).

La expresión de enzimas celulolíticas en el intestino de las termitas varía según la casta y la etapa del desarrollo (Fujita et al., 2010; Shimada & Maekawa, 2010). Con respecto a la clasificación, Henrissat & Bairoch, (1993) demostraron que, a pesar de tener diferentes especificidades de sustrato, los miembros de la misma familia de GH a menudo tienen un origen evolutivo común, como lo revelan sus similitudes estructurales. Todas las EC endógenas identificadas hasta el momento pertenecen a la familia GH9 (Teather & Wood, 1982; Watanabe & Tokuda, 2010; Leonardo et al., 2011; Zhang et al., 2012b; Scharf, 2015). Por otro lado, las EG de protistas corresponden a las familias GH5, GH7 y GH45, que parecen pertenecer a un conjunto central de enzimas conservadas durante la evolución simbiótica (Ni & Tokuda, 2013; Scharf, 2015). Hasta la fecha, se ha encontrado que las BG del huésped pertenecen a la familia GH1 (Slaytor, 2000; Tokuda et al., 2002). Con respecto a las hemicelulasas, algunos trabajos han informado xilanasas endógenas (GH11) y de los simbiotes protistas (GH45), expresadas de forma recombinante (Sasagawa et al., 2011; Sethi et al., 2013). Varias enzimas ligninolíticas, como lacasas, peroxidasas, aldo-ceto reductasas, fenol oxidasas y esterases, también han sido identificadas en termitas (Coy et al., 2010; Chandrasekharaiah et al., 2011).

En las termitas inferiores, la microbiota bacteriana parece no tener el papel principal en la hidrólisis de la lignocelulosa. Se ha reportado que cuando las partículas de madera ingresan al intestino posterior, se detienen inmediatamente en las vacuolas alimentarias de los protistas flagelados (Brune, 2014). Sin embargo, el reciente descubrimiento de una feruloil esterasa bacteriana de *Coptotermes formosanus* (Rashamuse et al., 2014) abre nuevas perspectivas en este asunto.

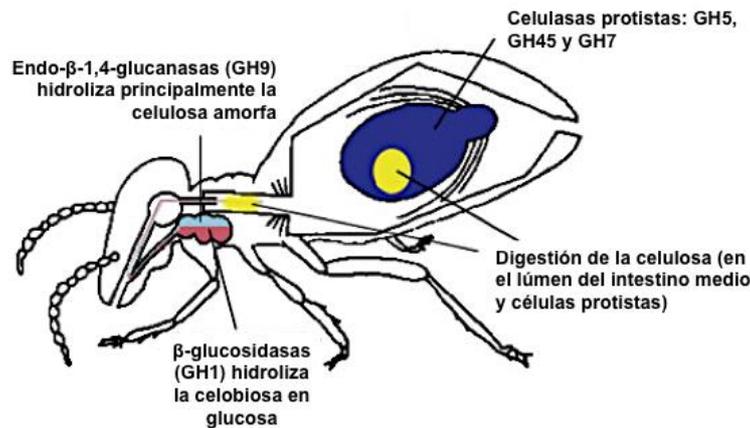


Figura 10. Sistema celulolítico en las termitas inferiores. Modificado de Ni & Tokuda, 2013.

III.3.2 Termitas superiores

La distribución de la actividad celulasa en las termitas superiores es más variable. Durante el período Eoceno (alrededor de 60 millones de años atrás), las termitas superiores perdieron los endosimbiontes flagelados y, en consecuencia, divergieron al evolucionar en nuevas estrategias para la hidrólisis de celulosa (Lo & Eggleton, 2011; Brune, 2014). Las termitas superiores presentan hábitos alimenticios diferentes, incluidas la materia orgánica del suelo, la madera, el estiércol, la hojarasca, el líquen y las gramíneas (König et al., 2013). En la mayoría de las termitas que se alimentan de madera pertenecientes a la subfamilia Nasutitermitinae, la actividad EG se limita al intestino medio. Además, en algunas especies de Termitinae, la mayor parte de la actividad EG se localiza en el intestino posterior, lo que presumiblemente se podría atribuir a una ameba simbiótica (Slaytor, 2000) cuya naturaleza aún no se ha aclarado. De manera similar a las distribuciones de las actividades EG, la distribución de las actividades de BG también es variable. Algunas termitas, incluidas *Nasutitermes* spp., presentan actividad BG principalmente en las glándulas salivales y el intestino medio (Watanabe et al., 1997; Slaytor, 2000). La

distribución de la actividad celulasa en las termitas asociadas a hongos (subfamilia Macrotermitinae) es más complicada debido a la dependencia variable de los hongos simbióticos entre las especies como fuente de carbono (Hyodo et al., 2003). Inicialmente, las contribuciones de los microorganismos del intestino posterior a la digestión de la celulosa en las termitas superiores no habían sido tenidas en cuenta, pero se reportaron actividades de celulasas asociadas a la fibra de la madera en el intestino posterior de *Nasutitermes takasagoensis* y *N. walkeri* (Tokuda & Watanabe, 2007). En cambio, existe un consenso sobre la producción enzimática en el epitelio del intestino medio para el procesamiento de la celulosa la cual es mucho más relevante en las termitas superiores que en las termitas inferiores (Lo et al., 2011; Brune, 2014). Al igual que con las termitas inferiores, las EG endógenas en las termitas superiores están asociadas la familia GH9 y se secretan desde el intestino medio, excepto por la termita *Odontotermes formosanus*, que expresa genes de EG en las glándulas salivales (Tokuda et al., 2004). Con respecto a las BG GH1, los órganos involucrados varían entre las especies de termitas. En la mayoría de las especies de *Nasutitermes*, las BG se han detectado principalmente en las glándulas salivales y el intestino medio, mientras que en otras especies, esta actividad ocurre principalmente en el intestino posterior (Slaytor, 2000; Uchima & Arioka, 2012; Wang et al., 2012; Ni & Tokuda, 2013; Rashamuse et al., 2014). Por lo tanto, la hidrólisis de la celulosa se realiza principalmente por las EG del endosimbionte del huésped y la bacteria secretadas por el intestino medio y el intestino posterior, respectivamente (Watanabe et al., 1997; Tokuda et al., 2004) (**Figura 11**).

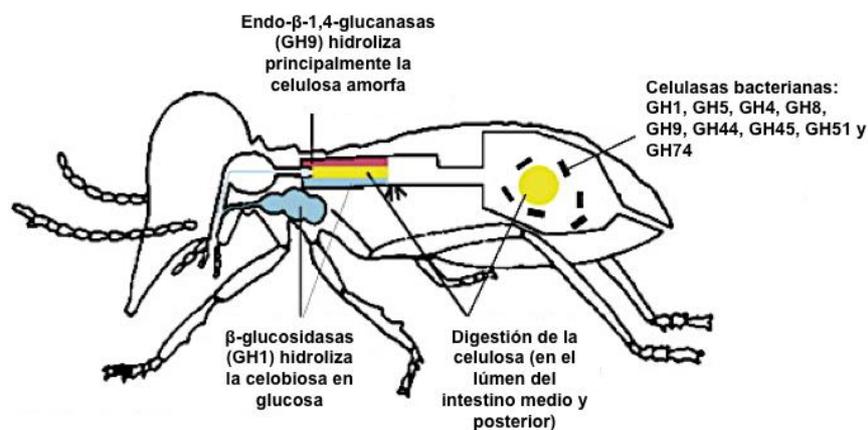


Figura 11. Sistema celulolítico en las termitas superiores. Modificado de Ni & Tokuda, 2013.

Como se mencionó anteriormente, el sistema celulolítico endógeno en las termitas superiores se cree que contribuye a la digestión de la celulosa de manera más significativa que en las termitas inferiores. La **Figura 12** ilustra el sistema celulolítico endógeno de *Nasutitermes* sp. como ejemplo de una termita superior que se alimenta de madera, basados en Tokuda et al., (2012).

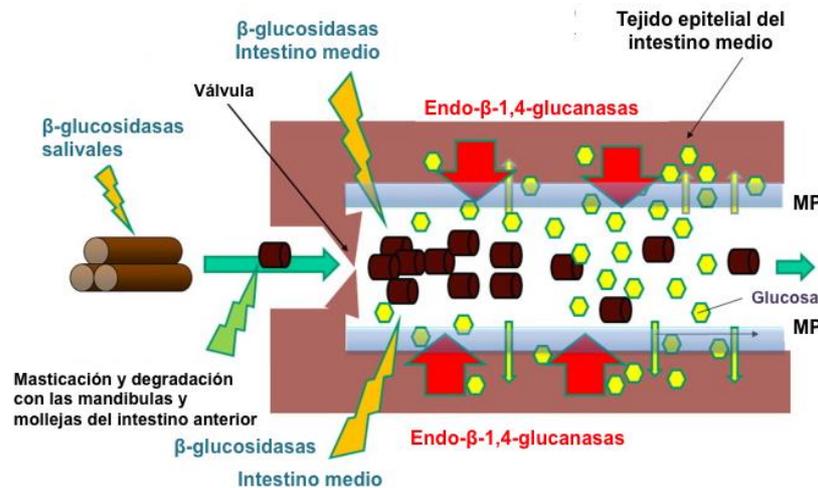


Figura 12. Sistema digestivo endógeno de *N. takasagoensis*. Los fragmentos de madera ingeridos por las termitas se mezclan primero con las BG salivales. Luego, las partículas celulósicas ingeridas se fragmentan en el intestino anterior y entran al intestino medio. El epitelio del intestino medio secreta las EG y BG al espacio luminal, las cuales contribuyen de manera esencial a la digestión celulósica. Las regiones amorfas de celulosa expuestas en la superficie de las partículas de madera son digeridas principalmente por estas enzimas, y la glucosa liberada puede ser absorbida a través del tejido del intestino medio. Finalmente, las partículas de madera parcialmente digeridas se mueven al intestino posterior a través del segmento mixto. MP: membrana peritrófica. Modificado de Ni & Tokuda, 2013.

Excepto por la posible presencia de una celulasa/xilanas bifuncional en el intestino medio de *Trinervitermes trinervoides* (subfamilia Nasutitermitinae) (Potts & Hewitt, 1974), no hay reportes de xilanas endógenas en las termitas superiores que se alimentan de hojarasca o madera. Además, dos xilanas GH10 y GH11 bacterianas han sido aisladas y expresadas de forma recombinantes a partir del intestino de *Nasutitermes* sp. y *Globitermes brachyclases*, respectivamente (Brennan et al., 2004; Han et al., 2013).

III.4 Sistemas celulolíticos en Coleoptera

Existen evidencias que indican que los genomas de Phytophaga contienen los genes que codifican enzimas con capacidad de hidrolizar y utilizar los polisacáridos de la pared celular vegetal tales como celulosa, hemicelulosa y pectina (Pauchet et

al., 2010; Calderón-Cortés et al., 2012; Kirsch et al., 2012). En particular, en especies de escarabajos cerambícidos de la subfamilia Lamiinae, varias celulasas han sido identificadas previamente y caracterizadas funcionalmente (Sugimura et al., 2003; Lee et al., 2004, 2005; Wei et al., 2006b; Calderón-Cortés et al., 2010; Chang et al., 2012). Estas enzimas son miembros de tres familias de GH distintas: GH5, GH9 y GH45. Entre estas, los genes que codifican las celulasas GH9 se encuentran distribuidos en todos los órdenes de insectos examinados hasta el momento. Las enzimas correspondientes a GH9 difieren ampliamente en estructura y secuencia de las celulasas microbianas, por lo que se considera poco probable que reflejen las consecuencias de la transferencia horizontal de genes. Se ha propuesto que un ancestro común de los animales poseía un gen de celulasa GH9 por las siguientes razones: (a) los genes de celulasa GH9 están muy extendidos entre los invertebrados, (b) estas secuencias parecen ser monofiléticas (Davison & Blaxter, 2005) y (c) estos genes comparten identidades posicionales en sus intrones (Lo et al., 2003; Suzuki et al., 2003). También es concebible que un ancestro común de insectos poseyera un gen de celulasa GH9 en el genoma y que el gen GH9 se transfiriera verticalmente a los insectos existentes (Watanabe & Tokuda, 2010; Fischer et al., 2013). Las celulasas miembros de las familias GH5 y GH45 sólo han sido reportadas en Coleópteros (Sugimura et al., 2003; Lee et al., 2004; Wei et al., 2006a; b).

Las familias GH5, GH9 y GH45, no comparten similitudes de secuencia y presentan diferentes características estructurales tridimensionales. Sin embargo, los miembros de estas familias GH muestran las mismas especificidades de sustrato, lo que sugiere que este es el resultado de la evolución convergente de diferentes moléculas en términos de función enzimática. Actualmente no está claro si los genes de las familias GH5 y GH45 se transfirieron verticalmente de un ancestro común de insectos a los coleópteros u horizontalmente de organismos más distantemente relacionados (los genes de celulasas GH5 y GH45 también están presentes en parientes cercanos de artrópodos, como nematodos y moluscos) (Watanabe & Tokuda, 2010; Fischer et al., 2013). Pauchet et al., (2014) identificaron por transcriptómica del intestino de *Apriona japonica* genes que codifican miembros de la subfamilia 2 de GH5, genes que codifican celulasas GH45 y genes que codifican supuestas poligalacturonasas GH28. A su vez, reportaron por primera vez que un

miembro de la subfamilia 2 de GH5 era una xilanasa y no una celulasa. También revelaron por primera vez la presencia de una exopoligalacturonasa activa en un escarabajo cerambícido. En particular, aunque los genes que codifican celulasas de la familia GH45 están ampliamente distribuidos en otras familias de escarabajos Phytophaga, específicamente en Chrysomelidae y Curculionidae, la presencia de genes que codifican celulasas de la subfamilia 2 parece limitada a Cerambycidae (Pauchet et al., 2010).

La actividad celulolítica en larvas de escarabajos xilófagos ha sido detectada en el intestino medio o en el compartimento combinado de intestino medio-posterior, considerándose al intestino medio como el sitio para la digestión de lignocelulosa (Scrivener et al., 1997; Watanabe & Tokuda, 2001). A su vez, el intestino medio de los escarabajos es el sitio de producción de varias enzimas digestivas (Scrivener et al., 1997) y también el lugar de expresión de las celulasas endógenas en los escarabajos xilófagos longicornios y el escarabajo de la mostaza, *Phaedon cochleariae* (Chrysomelidae, Chrysomelinae) (Sugimura et al., 2003; Wei et al., 2005, 2006a; b). El intestino posterior relativamente pequeño sugiere que la digestión de la celulosa en escarabajos longicornios es independiente de los simbiontes, aunque no se puede excluir la posibilidad de que algunos insectos coleópteros alberguen microorganismos celulolíticos en el intestino (Delalibera et al., 2005; Schloss et al., 2006).

IV. Enfoques ómicos aplicados a la prospección de nuevas enzimas celulolíticas

En la actualidad, el término digestoma se utiliza para describir al conjunto de genes endógenos y de los endosimbiontes que contribuyen a la digestión de la lignocelulosa en el tracto digestivo de los animales (Scharf & Tartar, 2008; Tartar et al., 2009). Existen dos aproximaciones principales para estudiar el digestoma en insectos: la primera explora las estrategias genómicas a través de enfoques dependientes del cultivo, es decir, mediante el aislamiento de microorganismos que contienen genes celulolíticos o la caracterización de extractos enzimáticos de cultivos de enriquecimiento celulolítico (Butera et al., 2016, Talia & Arneodo, 2018).

Este método se centra en los microorganismos asociados a insectos y por lo tanto no tiene en cuenta el genoma del huésped. Su potencial es limitado por el hecho de que es ampliamente aceptado que solo alrededor del 1% de la diversidad microbiana intestinal se puede cultivar mediante técnicas microbiológicas convencionales. El segundo enfoque busca superar estas restricciones aplicando estrategias que no requieren el cultivo de microorganismos en medios artificiales y que también consideran al insecto huésped como genómica, metagenómica, transcriptómica, metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica. Estos estudios se pueden realizar de forma independiente o en combinación. Las principales estrategias relacionadas con la metagenómica son (1) análisis de la biodiversidad (endosimbiontes), (2) metagenómica funcional (mediante la construcción de bibliotecas metagenómicas en fósidos o plásmidos, selección funcional y selección de clones individuales con actividad celulolítica) y (3) análisis basado en secuencias a través de la secuenciación de alto rendimiento (SAR). Hasta la fecha, los resultados de metagenómica funcional y SAR permitieron la identificación de genes que codifican enzimas lignocelulolíticas o nuevas familias de proteínas en hospedadores y endosimbiontes, así como en su expresión heteróloga, purificación y caracterización bioquímica (Talia & Arneodo, 2018, Warnecke et al. 2007; He et al. 2013; Liu et al. 2013; Do et al. 2014).

Estudios de secuencia dirigidas al gen ARN ribosomal (ARNr) 16S se han utilizado en el análisis de la diversidad de bacterias y arqueas (Wang & Qian, 2009), mientras que la secuencia del gen ARNr 18S fueron útiles para la identificación de simbiontes protistas y hongos (Tai & Keeling, 2013). Asimismo, los enfoques dependientes e independientes de clonado se realizaron a través de análisis de bajo y de alto rendimiento, centrándose tanto en temas funcionales como taxonómicos (Warnecke et al., 2007; He et al., 2013).

La investigación avanzada de las -ómicas en insectos ha contribuido a dilucidar los problemas moleculares y fisiológicos de las relaciones huésped/endosimbionte y los procesos de digestión celulolítica mediados por los diferentes agentes involucrados (Scharf & Tartar, 2008; Joynson et al., 2018; Krishnan et al., 2014). Sin embargo, se necesitan más trabajos para comprender mejor la importancia funcional de los datos obtenidos por secuenciación y análisis

ómicos.

V. Aplicaciones potenciales en la industria de enzimas celulolíticas

La conversión biotecnológica de la biomasa lignocelulósica se destaca por su enfoque sustentable para el desarrollo de nuevos procesos y productos. Debido a la complejidad de los sistemas enzimáticos que degradan esta biomasa y su gran potencial en la industria, las celulasas y hemicelulasas son fuertes candidatas para llevar a cabo investigaciones académicas e industriales. El potencial biotecnológico de las enzimas celulolíticas tiene un amplio rango que incluye la industria de alimentos, la industria textil, del lavado, del vino, la del papel y el bioetanol lignocelulósico (Kuhad et al., 2011).

V.1 Industria alimentaria

En relación a la industria de alimentos, las celulasas tienen una amplia gama de aplicaciones potenciales. La producción de jugos de frutas y vegetales requiere de métodos mejorados para la extracción, clarificación y estabilización. Las celulasas también tienen una aplicación importante como parte del complejo enzimático de maceración (celulasas, xilanasas y pectinasas) utilizado para la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales para aumentar el rendimiento de los mismos (Minussi et al., 2002; de Carvalho et al., 2008). Las mezclas de enzimas que contienen pectinasas, celulasas y hemicelulasas también se usan para la extracción mejorada de aceite de oliva.

V.2 Industria textil y del lavado

Con respecto a la industria textil y del lavado, las celulasas son de amplia utilidad ya que mejoran la calidad de las telas al modificar las fibras de celulosa de una manera controlada. En el caso de los procedimientos denominados *biostoning* de telas Denim reducen el colorante en ciertas zonas de la misma y *biopolishing* que remueve el exceso de microfibrillas, en especial en telas de algodón. En la industria de los detergentes y polvos para el lavado de ropa, el uso de celulasas mejora el brillo de la misma, la suavidad y remueve la suciedad (Bhat, 2000; Kuhad et al., 2011).

V.3 Industria del vino

Una cantidad de complejos enzimáticos comerciales está disponible para la industria del vino. En la producción de vino, las enzimas como las pectinasas, las glucanasas y las hemicelulasas desempeñan un papel importante al mejorar la extracción del color, maceración de la piel, clarificación del mosto, filtración y finalmente la calidad y estabilidad del vino (Singh et al., 2016).

V.4 Industria del papel

El interés en la aplicación de celulasas y hemicelulasas en la industria de la celulosa y el papel ha aumentado considerablemente durante la última década. Se utilizan combinaciones de celulasas y xilanasas en distintas etapas del proceso como por ejemplo para la generación de la pulpa del papel y modificación de las fibras, así como también en el blanqueo mediante xilanasas y mananasas, reduciendo el uso de cloro generalmente empleado en esta etapa (Kuhad et al., 2011).

V.5 Industria del bioetanol

Una de las principales aplicaciones de las enzimas capaces de hidrolizar biomasa lignocelulósica es la producción de combustibles líquidos, en particular bioetanol de segunda generación.

El esquema convencional de producción de etanol de segunda generación consiste en cuatro procesos individuales: (i) pretratamiento de la biomasa, (ii) hidrólisis enzimática (sacarificación), (iii) fermentación de los azúcares y (iv) purificación del producto, generalmente por destilación del etanol o filtrado molecular (**Figura 13**).

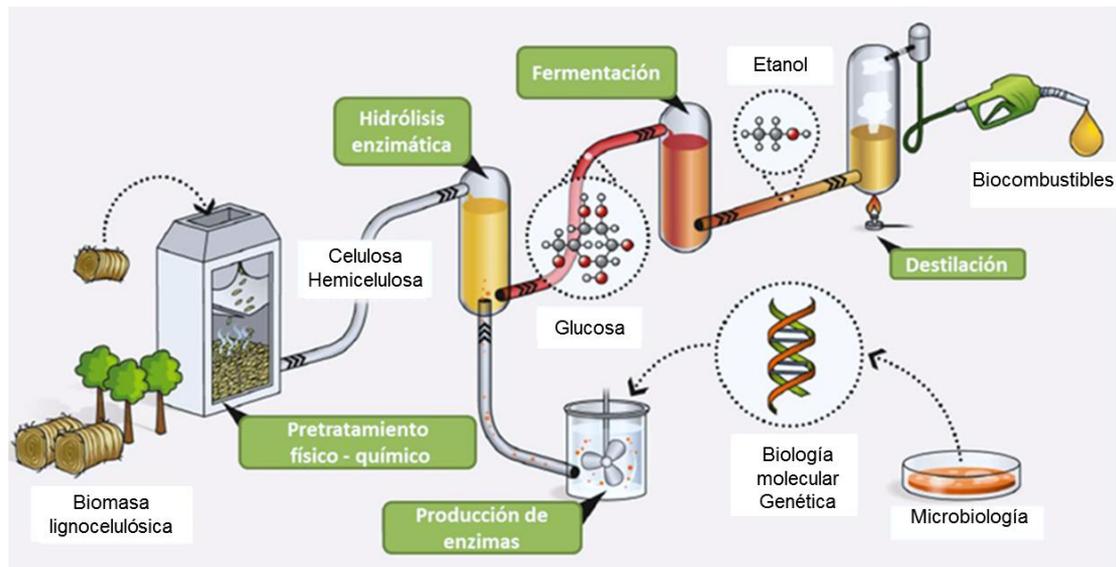


Figura 13. Etapas de producción de bioetanol de segunda generación. La biomasa lignocelulósica es sometida a un pretratamiento mediante el cual los componentes de la misma (celulosa, hemicelulosa y lignina) se encuentran más accesibles para ser hidrólizados por enzimas celulolíticas agregadas al proceso. Luego las levaduras llevan a cabo la fermentación de los azúcares generados a etanol, que posteriormente es separado.

Existen varios tipos de pretratamiento, los cuales se dividen en diferentes categorías, como métodos mecánicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos o varias combinaciones de éstos (Barakat et al., 2013). Un pretratamiento adecuado implica la ruptura de la matriz de hemicelulosa y lignina, de los puentes de hidrógeno que mantienen unida las fibrillas de celulosa, el aumento en la porosidad y el área superficial de la celulosa (Mood et al., 2013) con bajos requerimientos de energía y el reciclado de los catalizadores utilizados (Galbe & Zacchi, 2012). Los más aplicados actualmente suelen involucrar una combinación entre componentes físicos y químicos, aunque el desarrollo de nuevas metodologías con mejoras en los rendimientos y disminución de los costos está en pleno auge (Galbe & Zacchi, 2012; Mood et al., 2013).

Los pretratamientos más estudiados son de naturaleza fisicoquímica. Algunos de estos incluyen procesos hidrotérmicos, como explosión de vapor, explosión con CO₂ o tratamiento con agua caliente, y procesos químicos como hidrólisis alcalina, tratamiento con ácido diluido, procesos de organosolv utilizando solventes orgánicos, explosión de fibra con amoníaco (AFEX) y ozonólisis, entre otros. El principal objetivo de los pretratamientos físicos es la disminución del tamaño de las partículas de lignocelulosa y a su vez, disminuir el grado de interacción entre los

componentes de la matriz. Por lo general la biomasa suele molerse, reduciendo el tamaño de las partículas a 0,2–30 mm dependiendo del mecanismo utilizado. Aunque este proceso suele realizarse previo a los siguientes pasos de tratamientos de la biomasa, algunos trabajos lo proponen como único paso previo a la sacarificación enzimática (Hideno et al., 2009).

El pretratamiento de extrusión es un pretratamiento termofísico en el que los materiales se someten a mezcla, calentamiento y disrupción que conduce a la alteración física y química de su estructura (Lamsal et al., 2010).

El pretratamiento ácido, en particular el uso de H_2SO_4 , es el más común de los tratamientos químicos. En éste, la hemicelulosa es hidrolizada a monosacáridos, permitiendo el acceso a la celulosa. El pretratamiento ácido puede realizarse a bajas concentraciones de ácido con altas temperaturas o a altas concentraciones de ácido con bajas temperaturas (Mood et al., 2013).

El pretratamiento alcalino se lleva a cabo a más baja temperatura y presión que la hidrólisis ácida. Cuando un material lignocelulósico se empapa en una solución alcalina, por ejemplo, hidróxido de sodio, de potasio o de amonio, se rompen los enlaces entre la lignina y los polisacáridos y también se puede solubilizar parte de la lignina. El efecto de esto es un aumento en el área de superficie disponible, mientras que el grado de polimerización se reduce. En general, los métodos de pretratamiento utilizando álcalis son eficaces en ciertos tipos de materias primas, por ejemplo, sobre los residuos agrícolas y cultivos herbáceos. La razón es probablemente la menor cantidad relativa de lignina en estos tipos de materiales (Galbe & Zacchi, 2012).

La hidrólisis de la biomasa pretratada, en la cual se generan mono y oligosacáridos a partir de polisacáridos complejos, puede ser llevada a cabo usando ácidos o enzimas. La hidrólisis ácida requiere relativamente alta temperatura y produce no solo glucosa sino también inhibidores como hidroximetilfurfural y otros productos, lo cual reduce el rendimiento total. La aplicación de enzimas, por otro lado, es ventajosa dando una mayor eficiencia de conversión, baja generación de inhibidores y uso de condiciones operativas moderadas y no corrosivas. De todos modos, la degradación de la biomasa es un proceso multienzimático altamente complejo por lo cual aún no existen sistemas completamente efectivos y de bajo

costo. Los factores de la biomasa que afectan la hidrólisis enzimática, además de la concentración de sustrato, son el grado de polimerización, la cristalinidad, el área accesible al ataque enzimático y el contenido de hemicelulosa y lignina (Ballesteros, 2010).

La etapa de fermentación es llevada a cabo por microorganismos capaces de fermentar a etanol los azúcares generados durante la etapa de hidrólisis. La fermentación alcohólica involucra reacciones bioquímicas y enzimáticas complejas, que tienen lugar en un ambiente con cantidad de oxígeno reducida. La cepa de levaduras más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*, que puede fermentar azúcares monoméricos de seis carbonos. Además, se usan bacterias que fermentan tanto azúcares de cinco como de seis carbonos o levaduras modificadas genéticamente que fermentan pentosas (Ingram et al., 1987; Fernández-Sandoval et al., 2012). Sin embargo estas últimas en ocasiones deben ser ingenierizadas genéticamente para tolerar los altos niveles de etanol generados (Tan et al., 2016). Por ejemplo, *Pichia stipitis* es una levadura capaz de fermentar pentosas naturalmente, que ha sido evaluada como productora de etanol (Silva et al., 2011; Chen et al., 2012b). *Klebsiella oxytoca*, una bacteria mesófila tiene enzimas propias para la captación y fermentación de celooligosacáridos, xilanos, hexosas y pentosas, también ha sido evaluada en la producción de etanol (Dien et al., 2003; Schuster & Chinn, 2013). Por su parte, *Clostridium thermocellum* es una bacteria anaerobia termófila que degrada naturalmente celulosa y que también es capaz de fermentar los azúcares resultantes principalmente en etanol, lactato, acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (Schuster & Chinn, 2013).

Finalmente, se aplican métodos de separación para la recuperación y deshidratación del etanol generado y remoción de los inhibidores producidos durante la fermentación, para aumentar el rendimiento. Dado que el etanol se encuentra diluido en una solución acuosa luego de la fermentación (5-12%), la separación del mismo es un proceso que requiere de energía. En general se aplican dos etapas: en la primera se concentra por destilación convencional (92,4%) y luego es deshidratado a etanol puro mediante destilación azeotrópica, extractiva, líquido-líquido, adsorción o evaporación de membrana (Huang et al., 2010).

Así, un estudio sistémico dirigido a estudiar prospectivamente la diversidad

de microorganismos endosimbiontes de insectos nativos, así como la caracterización de las funciones enzimáticas involucradas en la degradación de biomasa lignocelulósica puede resultar un aporte fundamental para un sin número de aplicaciones industriales.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El tracto digestivo de termitas nativas superiores y coleópteros posee celulasas, hemicelulasas y pectinasas endógenas y de bacterias endosimbiontes no caracterizadas de potencial utilidad para la producción de bioetanol.

OBJETIVOS GENERALES

El **objetivo general** del proyecto consiste en el estudio y prospección de la diversidad bacteriana, cultivable y no cultivable, presente en el intestino de termitas nativas y coleópteros y la caracterización de enzimas hidrolíticas de bacterias endosimbiontes, para su utilización en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

Como **objetivos específicos** del proyecto, se propone:

- 1) Estudiar la diversidad bacteriana cultivable celulolítica presente en el intestino de termitas nativas.
- 2) Evaluar la actividad celulolítica y hemicelulolítica de las bacterias cultivables y de los extractos intestinales totales en el intestino de termitas. Identificar la/s proteína/s de interés.
- 3) Analizar los cambios en la diversidad bacteriana y en las actividades hidrolíticas en respuesta a diferentes dietas lignocelulósicas en el intestino de *Anthonomus grandis*.
- 4) Clonar, expresar y purificar la/s enzima/s de interés de los endosimbiontes, en sistemas de expresión heterólogos apropiados. Evaluar y caracterizar las actividades enzimáticas mediante análisis bioquímicos.
- 5) Determinar la capacidad de hidrólisis de las enzimas seleccionadas en biomásas de interés pretratadas para la producción de bioetanol de segunda generación.

Materiales y métodos

Materiales y Métodos

I. Muestreo

I.1 Hábitat y nutrición de las termitas nativas *Nasutitermes aquilinus* y *Cortaritermes fulviceps*

Las termitas *Nasutitermes aquilinus* (Holmgren, 1910) y *Cortaritermes fulviceps* (Silvestri, 1901) se encuentran ampliamente distribuidas en la cuenca del río Paraná en América del Sur (Fontes & Terra, 1981; Laffont et al., 2004). En este trabajo, se seleccionaron ambas especies en base a su abundancia relativa en la Región del Noreste Argentino (NEA) y a sus diferentes hábitos nutricionales. *N. aquilinus* (NA) construye nidos arbóreos, se alimenta exclusivamente de madera y habita en árboles vivos y muertos, así como en bosques en descomposición. Se las puede encontrar en árboles vivos de *Enterbolium contortisiliquun* y en otras especies de árboles de esta provincia: *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *Grevillea robusta*, *Melia azedarach*, *Peltophorum dubium*, *Schinopsis balansae*, *Sorocea sprucei* y *Tabebuia heptaphylla* (Torales et al., 2004). Por otro lado, *C. fulviceps* (CF) construye montículos en el suelo y tiene una dieta más variada, que incluye materia orgánica del suelo, raíces, hojas y tallos de gramíneas, así como también madera. Trabajos previos reportaron que esta especie ataca los tallos de la palmera *Acrocomia totai* y árboles vivos de *E. grandis* (Laffont et al., 2004; Torales et al., 2004) (**Figura M1**).

Las termitas NA y CF fueron recolectadas en la provincia de Corrientes, Argentina (S 27° 28' 30": W 58° 46' 59,43" y S 27° 26' 58,26": W 58° 44' 17,64", respectivamente). NA se recolectó de árboles vivos de *E. contortisiliquun*, mientras que CF fue colectada dentro de montículos ubicados en pastizales de *Elionurus muticus*. Solo la casta obrera fue seleccionada y almacenada hasta su procesamiento a -20 °C.

Las termitas fueron recolectadas con el permiso de la Dirección Nacional de Recursos Naturales del Ministerio de Turismo de la provincia de Corrientes (permiso número 845/13). No se utilizaron especies en peligro de extinción o protegidas.

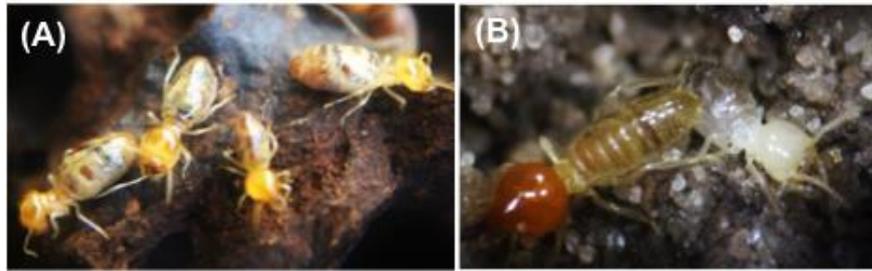


Figura M1. Termitas nativas de Argentina. (A) *Nasutitermes aquilinus*. (B) *Cortaritermes fulviceps*.

I.2 *Anthonomus grandis* boheman

Las larvas de *Anthonomus grandis* boheman (Coleoptera: Curculionidae) se criaron de forma artificial en el Laboratorio de Cría del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), INTA Castelar. Las larvas de *A. grandis* fueron crecidas sobre tres dietas artificiales autoclavadas: harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) y pasto elefante (PE) a 28° C, con 70% de humedad relativa y fotoperíodo de 12 h luz/oscuridad. Las larvas se mantuvieron en cada dieta durante 10 días, período suficiente para que *A. grandis* atraviese tres estadios larvales (Figura M2).

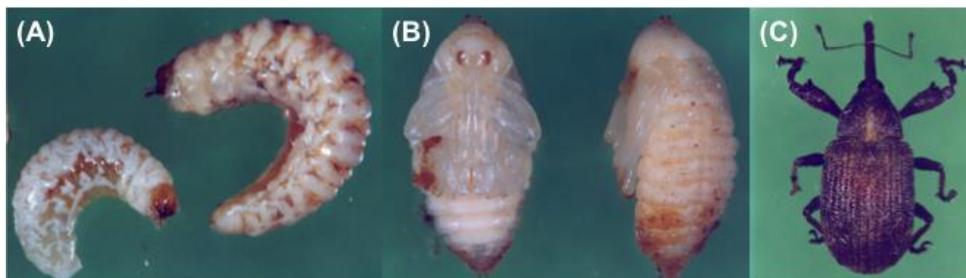


Figura M2. Estadios del desarrollo de *Anthonomus grandis* boheman. (A) Larva (B) Pupa y (C) Adulto. Fuente: <https://inta.gob.ar/documentos/para-controlar-al-picudo-del-algodonero-hay-que-criar-picudos-en-laboratorio>.

I.3 Disección de intestinos

Las larvas de *A. grandis* y las termitas nativas *N. aquilinus* y *C. fulviceps*, se esterilizaron superficialmente con etanol 70% y los intestinos se diseccionaron en lupa binocular.

II. Biomásas lignocelulósicas

El rastrojo de maíz (rastrojo de *Zea mays*) (RM) fue colectado en la Estación Experimental de INTA (EEA) Pergamino. Mediante un proceso de molienda y

tamizado se obtuvo un tamaño de partícula de 2 mm, posteriormente se mantuvo en una estufa a 45 °C durante 8 h para eliminar la humedad residual.

El bagazo de caña de azúcar (BCA) fue gentilmente donado por el molino Jalles Machado (Goiás, Brasil) y las muestras de *Pennisetum purpureum* var. Napier (pasto elefante, PE) (Poales: Poaceae) fue provisto por la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA). El material fue secado con aire caliente y molido a un tamaño de partícula promedio de 2 mm.

II.1 Pretratamiento de biomásas

Las biomásas se resuspendieron en 0,5 N de H₂SO₄ diluido y posteriormente se pretrataron en baño de H₂O a 100 °C durante 3 h. La fracción sólida se separó del líquido por filtración al vacío y se lavó dos veces con agua bidestilada (H₂O_b). Posteriormente el material se secó en un horno a 45 °C durante 8 h para eliminar la humedad residual. Las biomásas secas fueron almacenadas en bolsas plásticas estériles a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

II.2 Determinación de la composición química de las biomásas lignocelulósicas

La determinación del contenido de carbohidratos y lignina insoluble de las biomásas PE y BCA se realizó siguiendo el protocolo del Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL), Golden, Co, EUA (http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html).

Las muestras crudas se extrajeron secuencialmente con H₂O y C₂H₆O, de acuerdo con la metodología NREL con el fin de cuantificar el contenido de las extracciones.

Las biomásas libres de extractivos, sin tratar y pretratadas se sometieron a una hidrólisis ácida en dos etapas: primero se aplicó H₂SO₄ (72% en peso seco) en un baño de agua a 30 °C durante 1 h con agitación, seguido de una segunda etapa con H₂SO₄ (4% en peso seco) en autoclave durante 1 h a 121 °C. La suspensión resultante se filtró, posteriormente el filtrado se analizó por cromatografía líquida acoplada a un detector de índice de refracción. El contenido de glucano, xilano, arabinano y acetilo se estableció mediante cromatografía líquida (Infinity 1290, Agilent, EUA)

equipada con: bomba cuaternaria de solvente (G4204A, 1290 Quat Pump), detector de índice de refracción (G1362A, RID) e inyector de muestra con una configuración de horno de columna a 55 °C (G4226A, 1290 Sampler). Se utilizó una columna BioRad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm) equipada con una precolumna Biorad Aminex Cation-H (30 x 4,6 mm). La fase móvil utilizada fue 5 mM H₂SO₄ en modo isocrático. El caudal fue de 0,6 mL/min y el tiempo total de funcionamiento de 60 min. Se utilizó el software Agilent Open Lab con Data Analysis (versión A.01.01) para el funcionamiento del sistema LC y el procesamiento de datos. La lignina soluble en el filtrado se determinó por absorción ultravioleta (UV) (240 nm y 40 L/g.cm), mientras que la lignina insoluble se determinó como el residuo sólido de la hidrólisis previo descuento del contenido de ceniza.

Como método alternativo, la composición química de las biomásas HA, RM y PE se determinó utilizando el análisis de fibra de Van Soest (Goering & Van Soest, 1970). La medición de la Fibra Detergente Neutro (FDN) se usó para estimar el contenido lignocelulósico total (en términos de celulosa, hemicelulosa y lignina), mientras que las mediciones de la Fibra Detergente Ácido (FDA) y la Lignina Detergente Ácido (LDA) se usaron para estimar la concentración de celulosa-lignina y lignina, respectivamente. La fracción de hemicelulosa se determinó como la diferencia de %FDN - %FDA, mientras que la fracción de celulosa a partir de la diferencia entre %FDA - %LDA.

El contenido de pectina fue determinado de acuerdo al método de Fry (Fry, 1988). Las muestras de biomásas secas fueron extraídas con C₂H₆O (66 mg/mL) a 80 °C durante 2 h. Los residuos insolubles en el alcohol fueron luego extraídos con agua caliente (15 mg/mL, durante 3 h a 90 °C) para obtener un residuo libre de almidón. Esta fracción fue extraída posteriormente dos veces con 0,05 M Ca₂CO₃ conteniendo 20 mM de NaBH₄, a temperatura ambiente. Ambos extractos se combinaron, se dializaron dos veces con agua destilada y finalmente fueron liofilizados. Este proceso fue realizado por triplicado y el contenido de pectina se expresó como porcentaje de material extraíble con la solución diluida de Na₂CO₃.

II.2.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Las diferentes biomásas se trituraron con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana y el tamaño de partículas se homogeneizó utilizando un lienzo de *voile*. A continuación, las muestras fueron sometidas a una serie de lavados secuenciales utilizando Triton X-100, CH₃OH y C₃H₆O siguiendo el procedimiento reportado por Cvikrová et al., (2006), con el fin de eliminar los extraíbles hidro y liposolubles. El material obtenido fue secado a 50 °C hasta peso constante y mantenido en una atmósfera libre de humedad hasta el momento de proceder al armado de las pastillas para FT-IR. Para obtener los espectros se elaboraron pastillas de 13 mm de diámetro con 2 mg de cada muestra seca y 20 mg de KBr grado infrarrojo así como también pastillas blanco conteniendo 22 mg de KBr. Los espectros de absorción FT-IR fueron registrados entre 4.000 y 400 cm⁻¹ empleando un espectrómetro modelo *Spectrum* (Perkin-Elmer Instruments, EUA). El análisis espectral se realizó a una velocidad de 1 cm s⁻¹ con 4 cm⁻¹ de resolución bajo atmósfera de aire seco (cámara con silica gel), el espectro promedio obtenido fue resultado de 64 escaneos. Las mediciones se realizaron por duplicado. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software OMNIC Specta™ y se llevó a cabo la corrección de cada espectro sustrayendo el correspondiente a la pastilla blanco obtenido inmediatamente antes del registro de cada muestra.

De los espectros resultantes se seleccionaron bandas de referencia dentro de la región 800-3000 cm⁻¹ generalmente asignados a grupos funcionales característicos de los polímeros de la biomasa vegetal (**Tabla M1**), y se estimaron sus intensidades relativas siguiendo los protocolos de Luna et al. (2015) y Pandey & Pitman, (2003). Diversos parámetros relacionados al índice de cristalinidad de la celulosa fueron calculados: índice de orden lateral (LOI, por sus siglas en inglés) y la intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI, por sus siglas en inglés) (Nelson & O'Connor, 1964; Oh et al., 2005), grado de lignificación (°L) (Hinterstoisser et al., 2001) y diferentes relaciones tales como lignina/carbohidrato (L/C), carbonilo/carbohidrato (C/C) y Siringilo/Guaiacilo (S/G) (Bechtold et al., 1993; Dorado et al., 1999).

Tabla M1. Asignación de bandas características de absorción Infra Rojo de la pared vegetal

Longitud (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Asignación
2900	Estiramiento simétrico y asimétrico de grupos metil y metilenos	Celulosa
1735	Estiramiento de los grupos C=O no conjugados	Xilano + hemicelulosa
1598	Estiramiento de C=C de grupos aromáticos	Lignina
1510	Estiramiento de C=C de grupos aromáticos	Lignina
1465	Flexión de C-H (metil y metilenos) en monolignoles	Lignina
1426-1430	Flexión de CH ₂	Celulosa
1320-1330	Estiramiento de CH ₂	Celulosa
1320-1330	C-O del anillo siringilo	Lignina
1160-1164	Vibración de enlaces C-O-C	Celulosa
1270	C-O del anillo guaiacilo	Lignina
898	Deformaciones C-H	Celulosa
1630	Grupos carbonilos	Pectina
1660	Grupos carbonilos conjugados	Pectina
1740	Grupos carbonilos no conjugados	Pectina

II.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los cambios morfológicos de la superficie de las biomásas BCA y PE se evaluaron por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Se compararon los materiales no tratados, después del pretratamiento con H₂SO₄ diluido, y luego de la digestión enzimática. Las muestras se colocaron directamente sobre la capa de grafito y se observaron en un SEM modelo FEI Quanta-250 (FEI Co., Holanda) y aumentos de 800-2.000X. Se obtuvieron varias imágenes de diferentes áreas de cada muestra (al menos 20 imágenes por muestra) para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Las observaciones microscópicas se realizaron en el Laboratorio de Microscopía del CICVyA, INTA, Buenos Aires., Argentina.

III. Dietas Artificiales

III.1 Preparación de las dietas artificiales utilizadas para la cría de *Anthonomus grandis* bohemian

La composición de las dietas artificiales que se utilizó para la cría de *A. grandis* se detallan en la **Tabla M2**. La harina de algodón (HA) se sustituyó por las biomásas rastro de maíz (RM) o pasto de elefante (PE) para obtener las diferentes dietas artificiales respectivas. Se utilizaron por placa de Petri 20 mL de cada dieta previamente autoclavada.

Tabla M2. Composición dietas artificiales

INGREDIENTES	1 KILO
Levadura de Cerveza	60 g
Germen de trigo	60 g
Agar de repostería	40 g
Proteína de soja	100 g
Harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) o pasto elefante (PE)	40 g
Azúcar	60 g
Agua destilada	1.300 mL
Ácido Ascórbico	20 g
Ácido Sórbico	2,4 g
Nipagin	2 g
Sales Minerales	100 g
Solución Vitamínica	10 mL
Nistatina	0,5 mL

IV. Condiciones de cultivo

Los intestinos extraídos (ver sección I.3) se molieron en H₂O_b estéril y se homogeneizaron por vórtex. Los homogenatos intestinales obtenidos de *N. aquilinus* y *C. fulviceps*, fueron crecidos en medio mínimo (MM) con extracto de levaduras 0,1% (fuente de nitrógeno), cicloheximida 0,5 % (SIGMA) para prevenir el desarrollo de hongos y suplementados con diferentes substratos o biomasas lignocelulósicas (fuente de carbono): carboximetilcelulosa (CMC) 1%, xilano (XI) 0,5%, BCA 0,5%, PE 0,5% (pretratadas con H₂SO₄ diluido y sin tratar, ver sección II.1). Los cultivos se incubaron a 37 °C en agitador orbital durante una semana a 200 rpm.

V. Técnicas de biología molecular

V.1 Extracción de ADN genómico

El ADN total de las bacterias intestinales cultivables de las temitas nativas, crecidas en MM-CMC, fue extraído con el método de Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) desarrollado por Doyle & Doyle (1987).

La obtención del ADN genómico de las muestras de intestinos de *A. grandis* se realizó mediante el uso del sistema comercial DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, EUA). Cada réplica biológica consistió en un *pool* de tres intestinos enteros.

El ADN obtenido se cuantificó y se evaluó su integridad con el equipo *Fragment analyser™* (Advanced Analytical, EUA).

V.2 Construcción de bibliotecas de clones cultivables mediante amplificación del gen ARN ribosomal 16S del intestino de termitas nativas

La secuencia nucleotídica correspondiente al gen codificante para la subunidad 16S del ARNr casi completa (~1.400 pb) se amplificó por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando el par de cebadores fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') y rD1 (5'-GGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991), usando como templado ADN total de las bacterias intestinales cultivadas en MM-CMC. La mezcla de reacción consistió de: *buffer* de PCR 10X, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 μM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 0,75 U de Taq polimerasa (Invitrogen, EUA), 50 ng de templado y agua milliQ a un volumen final de 25 μL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 10 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 20 seg a 95 °C, 30 seg a 55 °C, 90 seg a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los fragmentos amplificados por PCR fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega, EUA) y transformados en *Escherichia coli* DH5α (ver sección V.7) creando las bibliotecas de clones CMC-NA y CMC-CF correspondiente a *N. aquilinus* y *C. fulviceps*, respectivamente.

Los clones seleccionados (por crecimiento en placas con IPTG/X-gal y posterior ensayo de restricción con la enzima *EcoRI*) fueron secuenciados a partir de los cebadores fD1/rD1 en un Secuenciador Capilar ABI 3130xl (Applied Biosystems, EUA) en la Unidad de Genómica de CICVyA-INTA.

V.3 Construcción de las bibliotecas metagenómicas mediante amplificación de la región V3-V4 hipervariable del gen ARN ribosomal 16S del intestino de *Anthonomus grandis* bohemian

A partir del ADN genómico extraído del intestino de *A. grandis* (sección V.I) se realizó la amplificación de la secuencia codificante para las regiones hipervariables V3-V4 del gen ARNr 16S mediante PCR por triplicado utilizando los cebadores universales 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'), (Turner et al., 1999) y 806R

(5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT -3') (Caporaso et al., 2012) con adaptadores para la secuenciación y códigos de barras específicos de muestras en el cebador 806R. La reacción de PCR de cada muestra fue realizada por triplicado utilizando la siguiente mezcla de reacción: *buffer* ExTaq Takara 10X conteniendo MgCl₂, 10 μM de cada cebador, 0,56 μg/μL de albúmina sérica bovina, 200 μM de cada dNTP, 0,025 U de Taq polimerasa ExTaq (Takara Mirus Bio Inc., Madison, WI, EUA), 10 ng de ADN templado y agua milliQ a un volumen final de 25 μL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 45 seg a 55 °C, 90 seg a 72 °C y una extensión final de 12 min a 72 °C. Las reacciones por triplicado fueron agrupadas y purificadas usando perlas magnéticas SPRI (Agencourt AMPure XP, Beckam Coulter Inc. Brea, CA, EUA) (1,2 X μL de volumen de muestra). Luego las muestras fueron cuantificadas utilizando el fluorómetro Qubit® (Qiagen, EUA). Las muestras se diluyeron a una concentración final de 10 nM. Todas las muestras fueron luego agrupadas en cantidades equimolares para la posterior secuenciación.

La secuenciación fue llevada a cabo por el Laboratorio de Secuenciación Genómica Vincent J. Coates de la Universidad de Berkeley, CA, EUA. Se utilizó el *kit* v3 y un programa de 300 ciclos de secuenciación usando el secuenciador MiSeq de Illumina.

V.4 Amplificación por PCR de genes codificantes para glicosil hidrolasas

En un trabajo paralelo a esta Tesis se realizó la identificación y selección de genes involucrados en la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa del intestino de las termitas *N. aquilinus* y *C. fulviceps* a partir de la secuenciación de ADN total mediante Illumina HiSeq 2500 (Soria et al., en preparación). De este conjunto de datos se seleccionaron seis genes que codifican para GH, pertenecientes a la familia GH5, en base a los siguientes criterios: i) cobertura del *contig* (número de lecturas de cada *contig*), ii) la asignación taxonómica, iii) longitud del *contig* que contenga codones de iniciación y stop identificables, iv) presencia en el microbioma de ambas termitas (**Tabla M3**).

Tabla M3. Genes codificantes para las glicosil hidrolasas de la familia GH5

Nombre del gen	Función	Organismo
GH5CelA	Endoglucanasa	bacteria no cultivable 35A20
GH5CelB	Endoglucanasa	bacteria no cultivable
GH5CelC	Endoglucanasa	<i>Hydrotalea flava</i>
GH5CelD	Endoglucanasa	<i>Treponema</i> sp. C6A8
GH5CelE	Endoglucanasa	<i>Treponema primitia</i>
GH5CelF	Endoglucanasa	bacteria no cultivable 35A20

Se diseñaron cebadores para amplificar los seis genes codificantes para endoglucanas seleccionados (Tabla M4).

Tabla M4. Cebadores utilizados para la amplificación de genes de interés.

Nombre	Secuencia (5'-3')*	Tamaño
GH5CelA-F	<u>GGATCC</u> GGATGTGGCACAATATCATTTAGC	1091 pb
GH5CelA-R	<u>CTCGAG</u> TTATTTTTTAACCTTTCGCTGGGG	
GH5CelB-F	<u>GGATCC</u> AATATCCCATTTTCAAGAGGC	1025 pb
GH5CelB-R	<u>CTCGAG</u> TTACTTTACCGTTTTAAAACCTATAGCG	
GH5CelC-F	<u>GGATCC</u> CACAACACTAAGTCAACCAC	1094 pb
GH5CelC-R	<u>CTCGAG</u> TCAGTACTTTCTCAAACGTC	
GH5CelD-F	<u>GGATCC</u> AATAAATCTATTGTTTTTTATTTTG	1025 pb
GH5CelD-R	<u>CTCGAG</u> TTATGTAGCGTCTGTTATTTT	
GH5CelE-F	<u>GGATCC</u> AAAAGAACAGTTTTTTCCG	1712 pb
GH5CelE-R	<u>CTCGAG</u> TCAATTCGCTCCCCTGATAAG	
GH5CelF-F	<u>GGATCC</u> CCCGCAGAAGGAGAAGGGAGG	1229 pb
GH5CelF-R	<u>CTCGAG</u> TTATTTTTTTACTGCTTCGACCATCG	

*los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I se encuentran subrayados

Las condiciones de amplificación, del tipo *touch down*, fueron en dos etapas. La primer etapa consistió en un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido de 10 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C, la temperatura de *annealing* disminuyó 1 °C por ciclo. La segunda etapa consistió de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 45 °C, 160 seg a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72.

V.5 Vectores de clonado y expresión

Durante este trabajo se utilizó el vector pGEM-T Easy (Promega) para clonar los fragmentos de PCR de los genes seleccionados que pudieron ser amplificados.

Para la expresión proteica en *E. coli* se utilizó el vector pET28a(+) (Novagen), que permite la producción de la proteína de interés fusionada a seis residuos de histidina.

V.6 Preparación de células de *Escherichia coli* competentes químicas

Se prepararon células competentes químicas de las siguientes cepas de *E. coli*: DH5 α (Thermo Fisher, EUA), Rossetta DE3 (Novagen, EUA) y SHuffle[®] T7 (NEB, EUA) utilizando el siguiente protocolo: a partir de una colonia se inició el cultivo de 5 mL, durante 16 h a 37 °C. Al día siguiente se inocularon 300 mL de LB con 3 mL del cultivo bacteriano en un Erlenmeyer de 2 L a 37 °C con agitación hasta llegar a una DO ($\lambda=600$)= 0,48. Luego se colocaron las células 5 min en hielo y se centrifugaron a 4.000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 40 mL de la solución TFBI fría, se dejó en hielo 5 min y se centrifugó nuevamente a 4.000 rpm, 4°C durante 5 min. Finalmente se resuspendió el pellet en 10 mL de la solución TFBI fría. Las células fueron fraccionadas de a 100 μ L en microtubos y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

V.7 Reacciones de ligado

Para llevar a cabo las reacciones de ligación se utilizó la enzima T4 ligasa (Promega, EUA), siguiendo las especificaciones del fabricante. La relación ADN inserto/ADN vector fue de 3:1. La reacción de ligación se llevó a cabo a 4 °C por un período de 16 a 18 h.

V.8 Transformación de *Escherichia coli*

Para los ensayos de transformación se agregaron 5 μ L de plásmido (10-50 ng) a 50 μ L de células competentes. La reacción se incubó en hielo por 30 min, luego se aplicó un *shock* térmico a 42°C durante 90 s y nuevamente se incubó en hielo por 120 s. A continuación se agregaron 200 μ L de medio LB y se incubó a 37 °C por 1h con agitación constante. Al terminar el período de recuperación, se sembraron 100 μ L de la reacción de transformación en la superficie de placas de medio sólido conteniendo LB agar 1,5%, en presencia del antibiótico adecuado para la selección de las transformantes (Ampicilina 100 mg/mL y/o Kanamicina 50 mg/mL). Cuando fue necesario se agregó superficialmente a las placas el inductor IPTG (100 mM) y el sustrato cromogénico X-gal (50 mg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h.

V.9 Minipreparación de ADN plasmídico

Para la obtención de plásmidos a partir de *E. coli* se utilizaron los kits de extracción de ADN plasmídico: Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EUA) y QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania), según lo indicado en el manual de uso por los fabricantes.

V.10 Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión se realizaron utilizando de 2 a 5 μL de plásmido, al que se agregó 1 μL de la enzima de restricción, 2 μL del *buffer* 10X (específico para cada enzima) y 20 μL de H_2O , se incubó a 37 °C durante 3 h. Todas las enzimas de restricción (*EcoRI*, *BamHI* y *XhoI*) fueron adquiridas en Promega y se utilizaron según las especificaciones del fabricante.

V.11 Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización de la calidad del ADN extraído y purificación de fragmentos de ADN obtenidos en reacciones de PCR o de cortes con enzimas de restricción con rangos de tamaño de 500 a 3.000 a pb, se utilizó una concentración de agarosa (Biodynamics) de 0,8 a 1 % con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE (40 mM Tris, 20 mM CH_3COOH y 1 mM EDTA) a 80 V en cubas (BioRad). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb *ladder* (Promega, EUA). Las muestras fueron visualizadas en un sistema de documentación de geles (Gel Doc XR, BioRad).

V.12 Purificación de fragmentos de ADN

Para la purificación de fragmentos de ADN obtenidos por reacciones de PCR, tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones o a partir de geles de agarosa, se utilizó el sistema comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

La cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos se realizó mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technology).

V.13 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en el sistema heterólogo *Escherichia coli*

La secuencia génica amplificada de GH5CelC a partir del ADN total de *N. aquilinus* se clonó en el vector pGem-T Easy, mientras que las secuencias génicas correspondientes a GH5CelA y GH5CelB fueron obtenidas como genes sintéticos (GenScript®, EUA) en el vector de clonado pUC57, optimizados en el uso de codones para *E. coli*. Los genes se cortaron utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xho*I (Promega) y se clonaron en el vector de expresión pET28a(+) (Novagen) mediante ligación con la enzima T4 ligasa (Promega).

Luego, con los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* Rossetta DE3 y Shuffle T7 para la expresión proteica, las cuales se cultivaron en medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina o con ampicilina 100 µg/mL. La expresión se indujo con 0,1 mM de IPTG ON a 20 °C para GH5CelA y GH5CelB.

Las proteínas, luego de la lisis celular (*buffer* de lisis) y sonicación (6 pulsos de 10 seg, 28% amplitud), se purificaron de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad por iones (IMAC) con resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Para ello se usaron los *buffers* de lavado y elución adecuados. La composición de los *buffers* de lisis y lavado se detallan en la **Tabla A1**.

V.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas en una dimensión se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron las cubas y accesorios del sistema miniprotean 3 (BioRad) para geles de 7x8 cm. Para el armado de un gel pequeño, se siguió la siguiente tabla:

Gel Separador concentración final de acrilamida 12%	5 mL
H₂O b	1,6 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,3 mL
Amonio persulfato (APS) 10%	50 µL
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	50 µL
Acrilamida-Bisacrilamida. (30-0,8%)	2 mL
Tetrametiletilendiamina (Temed)	2 µL

Gel Concentrador concentración final de acrilamida 4%	3 mL
H ₂ O b	2,1 mL
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	0,380 mL
Amonio persulfato (APS) 10%	30 µL
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	30 µL
Acrilamida-Bisacrilamida (30-0,8%)	500 µL
Tetrametiletilendiamina (Temed)	3 µL

Las muestras se prepararon en *buffer* de siembra 5X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; β-mercaptoetanol 50 mM; SDS 10%; azul de bromofenol 0,2%; glicerol 50%) y se calentaron a 100 °C durante 5 min para desnaturalizar totalmente las proteínas. La electroforesis se realizó a 100 – 130 V constante en *buffer* Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,8; glicina 190 mM; SDS 0,1%). En cada corrida se utilizaron 5 µL de un marcador de peso molecular de rango 10-180 kDa preteñido (Thermo Scientific, EUA) y se sembraron 15 µL de muestra.

V.15 Tinción con azul de *Coomassie*

Luego de la separación de las proteínas por SDS-PAGE 12%, se incubaron los geles con una solución de azul de *Coomassie* (*Coomassie brilliant blue* R250 0,05%, CH₃OH 50%, CH₃COOH 10%) durante una hora en agitación. Luego se realizaron lavados con una solución decolorante (CH₃OH 50%, CH₃COOH 10%).

V.16 *Western blot*

Luego de realizada la separación electroforética de las proteínas, se utilizó el sistema de transferencia para geles pequeños Mini Trans-Blot™ (BioRad). Los geles se sumergieron en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glicina 196 mM, CH₃OH 20%) y se utilizó la membrana de nitrocelulosa Hybond C-Extra (GE Healthcare Life Science, EUA). La transferencia se llevó a cabo a 200 mA durante 1 h. Las membranas se guardaron secas a temperatura ambiente.

Una vez transferidas las membranas fueron tenidas con una solución de Rojo *Ponceau* (rojo *Ponceau* 650 mM, CH₃COOH 1%) para confirmar la correcta transferencia de las proteínas.

Las membranas transferidas se incubaron en solución de bloqueo TBS + 3% de leche descremada en polvo a 4 °C durante 1 h. Luego, se agregó el anticuerpo

primario anti-histidinas (1:300) (GE Healthcare Life Science, EUA), se incubó 1 h a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con TBS. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (1:10.000) (SIGMA), se incubó a temperatura ambiente por 1 h y se realizaron 3 lavados con TBS y 1 lavado con *buffer* fosfatasa alcalina (BREFA).

Para el revelado, las membranas se incubaron con una solución de 10 mL de BREFA más el agregado de NBT (Nitroblue tetrazolium, Promega) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fostato, Promega) 66 μ L y 33 μ L respectivamente, en oscuridad, hasta ver la presencia de las bandas correspondientes.

V.17 Electroforesis bidimensional

El sobrenadante de cultivo MM-CMC inoculado con *N. aquilinus*, obtenido en la sección IV, fue sometido a electroforesis en geles de dos dimensiones.

Las proteínas presentes en el sobrenadante de un cultivo de 7 días y libre de células se precipitaron con $C_2HCl_3O_2$ (TCA) al 10%, a 4°C durante 2 días. El pellet de proteínas obtenido se resuspendió en *buffer* de rehidratación (0,5% v/v IPG *buffer*, GE Healthcare y 20 mM DTT, ditioneitol). Luego, un volumen de 150 μ L conteniendo 400 mg de proteínas se usó para rehidratar una tira con gradiente inmobilizado de pH (IPG) (7 cm, pH 4-7, Inmobiline DryStrip, GE Healthcare) durante 6 h a temperatura ambiente. El IEF se llevó a cabo en un Ettan IPGphor 3 System (GE Healthcare), usando el siguiente protocolo: 1) 0,2 kV h a 300 V; 2) 0,3 kV h (gradiente) a 1.000 V; 3) 4,5 kV h (gradiente) a 5.000 V; 4) 30 kV h a 5.000 V.

Para la electroforesis en segunda dimensión, a la tira se le agregó *buffer* de equilibrio y se corrió en un gel SDS-PAGE 10% a 80 V durante 5 h. Los *spots* observados luego de la tinción con *Coomasie* Coloidal G-250 se cortaron del gel y analizaron por espectrometría de masas.

V.18 Espectrometría de masas

Las bandas correspondientes a celulasas activas (zimograma, ver sección VI.8 y resultados parte II.4) y los *spots* más intensos obtenidos (electroforesis bidimensional) se escindieron de los geles, cortaron en trozos pequeños, destiñeron,

redujeron y se alquilaron, de acuerdo con Shevchenko et al., (2007). Posteriormente, estas bandas se sometieron a digestión trípica con 10 ng/mL de Tripsin Gold (Promega) de acuerdo con Celedon et al., (2007). La reacción de digestión se interrumpió incubando los *spots* del gel en el *buffer* correspondiente [50 μ L de C_2H_3N 50% (ACN), CH_2O_2 al 5% (AF)]. Luego los péptidos se extrajeron dos veces con [50 μ L de CH_3OH al 60%, AF al 1%], dos veces con [50 μ L de ACN al 50% y agua calidad cromatografía (MS), 1% AF] y por último una vez con [50 μ L de ACN 100%, 1% AF]. Todos los sobrenadantes fueron recuperados, combinados y secados al vacío. Los péptidos se desalaron con una columna ZipTip C18 de fase inversa (Merck Millipore), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los péptidos purificados se eluyeron en 50% de ACN y agua calidad MS, 0,1% de $C_2HF_3O_2$ (ATFA), mezclado con una solución de 5 mg/mL de α -ciano-4-matriz de ácido hidroxicinámico (CHCA) preparada en [50% ACN y agua calidad MS, 0,1% $C_2HF_3O_2$ (ATFA)]. Posteriormente, las proteínas se cargaron en cada punto de la placa de muestreo y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min.

El análisis de espectrometría de masas se realizó en el modo reflector de iones positivos por acumular datos de 1.000 disparos del láser (200/espectro), utilizando 5.200 Hz (MS) y 6.000 Hz (MS/MS). Las masas peptídicas se midieron en función de su m/z entre 900 – 4.000 con foco en 2.000, usando el Sistema de Ionización/Desorción Láser Asistida por Matriz (MALDI-TOF/TOFTM 5.800 de ABSciex).

El instrumento se calibró usando Calibration Mixture 1 (Mass Standards Kit para Calibration-ABSciex TOF/TOFTM). Las condiciones de operación del detector fueron: multiplicador de voltaje del detector = 0,7, voltaje del detector final = 2.100, frecuencia del pulso (Hz) = 400. El control del instrumento, la adquisición de datos en modo automático y la evaluación de datos se realizó con el TOF/Software TOFTM Series Explorer v. 4.1.0.

Los espectros resultantes se procesaron con el *software* ProteinPilotTM (ABSciex) combinado con MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com) y las secuencias se compararon con las bases de datos NCBI y UniProt.

VI. Métodos enzimáticos

VI.1 Obtención de extractos enzimáticos

VI.1.1 Preparados enzimáticos de *Nasutitermes aquilinus* y *Cortaritermes fulviceps*

Los sobrenadantes de cultivo libre de células (extractos enzimáticos extracelulares) obtenidos mediante crecimiento en MM y diferentes sustratos (ver sección IV) fueron centrifugados a 12.000 *g* a 4 durante 20 min °C. Luego, los sobrenadantes de cultivo se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm (Ministart, Sartorius Stedim Biotech, EUA) y se les adicionó inhibidor de proteasas (Thermo) y azida de sodio al 0,4%, para evitar la proteólisis e inhibir el crecimiento bacteriano, respectivamente.

VI.1.2 Preparados enzimáticos intestinales de *Anthonomus grandis bohemian*

Los intestinos pertenecientes al tercer estadio larval (ES) fueron seccionadas en tres partes: ES1 (intestino anterior o estomodeo, esófago, glándulas labiales y proventrículos), ES2 (intestino medio) y ES3 (intestino medio posterior, túbulos de Malpighi e intestino posterior). Las distintas secciones de los intestinos y la cabeza se molieron en H₂O estéril, se homogeneizaron por vórtex y se centrifugaron a 12.000 *g* a 4 °C durante 10 min. Se utilizaron tres placas independientes por tratamiento. A los extractos enzimáticos obtenidos se le agregó Protease Inhibitor Cocktail kit (Thermo Scientific, EUA) (1µL/mL) y fueron mantenidos a -20 °C para las reacciones enzimáticas.

VI.2 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método del ácido bicinonínico empleando el sistema Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, EUA) o mediante el método de Bradford (1976) con el reactivo Protein Assay Reagent Concentrated (BioRad), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

VI.3 Ensayo cualitativo de actividad celulasa y hemicelulasa

Se realizaron ensayos cualitativos de degradación en medio sólido para evaluar la actividad endoglucanasa y xilanasa. Para ello, alícuotas de cada

sobrenadante de cultivo u extracto de intestino (10 μ L) se sembraron en la superficie de la placa. Las placas conteniendo MM-CMC y MM-XI se incubaron a 37 °C por 16 h. Las actividades se evidenciaron por la formación de un halo de hidrólisis luego de la tinción por Rojo Congo 0,1% (p/v) durante 10 min y lavado con una solución 1M de NaCl durante 10 min adicionales (Teather & Wood, 1982).

VI.4 Cuantificación de azúcares reductores y curvas patrón

Según el método Miller (1959), los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el DNS es reducido en presencia de calor, se desarrolla un cambio de color con variaciones de amarillo hasta café. El cambio de coloración puede determinarse por lecturas de la absorbancia a 540 nm. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración. En la **Figura M3** se muestra la reacción de óxido-reducción antes descrita. A 100 μ L del producto de reacción de hidrólisis (azúcares reductores), se le agregaron 100 μ L del reactivo DNS, lo cual se incubó a 98 °C por 15 min y luego a 4 °C durante 15 min adicionales. El mismo procedimiento se aplicó en paralelo a una curva patrón de xilosa, glucosa o ácido galacturónico (0-1 mg/mL). El producto coloreado generado se midió a 540 nm por espectrometría.

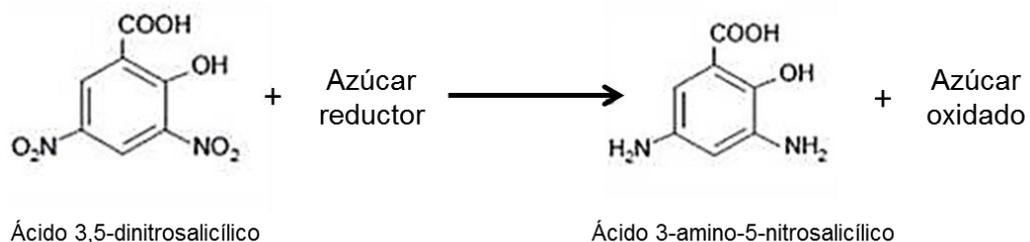


Figura M3. Método DNS, reacción de oxidación de azúcares reductores.

VI.4.1 Determinación de las actividades endoglucanasa, xilanasa, pectinasa, β -glucanasa, exoglucanasa y laminarasa

Las medidas de actividad se realizaron en un volumen final de 200 μ L, con 100 μ L de cada sustrato, para una concentración final (Cf) de: CMC 1%

(endoglucanasa), XI 0,5% (xilanasas), PEC 0,5% (pectinasas), β -glucano de cebada 1% (β -glucanasa), Laminarin 1% (laminarasa) y 0,5% AV (avicel, exoglucanasa), preparado en el *buffer* a pH adecuado, y 100 μ l de una dilución apropiada de la enzima o del extracto enzimático, en el mismo *buffer* (reacciones adaptadas a volúmenes menores según King et al., (2009). En los ensayos enzimáticos de especificidad de sustrato, adicionalmente se utilizó celulosa bacteriana microcristalina (BMCC) o celulosa amorfa regenerada (PASC) (Zhang et al., 2006) para medir la actividad celulolítica (concentración final, Cf: 1mg/mL). Además, en todos los casos se realizaron controles de sustrato y *buffer* (sin enzima) y de enzima (sin sustrato). Las reacciones se llevaron a cabo en agitador termostático (Eppendorf, Alemania) a 300 rpm, a la temperatura y tiempo requerido, y se detuvieron a 100 °C durante 15 minutos. Luego se centrifugaron durante 2 min a máxima velocidad y se midieron los azúcares reductores. Al descontar los controles, se determinó la actividad enzimática en UI/mL de extracto o cultivo o bien UI/mg de proteína (actividad específica).

La actividad enzimática de cada muestra se expresó en Unidades Internacionales (UI) por mililitro de enzima o extracto enzimático (UI/mL), considerando una unidad internacional como la cantidad de enzima que libera un μ mol de producto por minuto, bajo determinadas condiciones de reacción.

VI.4.2 Actividad β -glucosidasa y celobiohidrolasa

Las reacciones enzimáticas β -glucosidasa y celobiohidrolasa (volumen final 200 μ L), se realizaron con 100 μ L de cada sustrato preparado en *buffer* (para obtener una concentración final de 2,5 mM): 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido y 4-nitrofenil- β -D-celobiosido (SIGMA) y 100 μ L de una dilución apropiada del extracto enzimático o enzima purificada, durante 20 min a la temperatura y pH apropiados. Luego, se detuvieron las reacciones con 500 μ L de Na_2CO_3 (2% p/v) y se midió la absorbancia a 410 nm. Se utilizó como estándar una curva patrón de *p*-nitrofenol (*p*NP) (SIGMA).

VI.5 Cálculo de la actividad enzimática y actividad enzimática específica

La actividad enzimática (AE) se expresó en unidades internacionales por mililitro de extracto de intestino (EI) (UI/mL). En donde se consideró una unidad

internacional, como la cantidad de enzima que libera un μmol de producto por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

$$AE \text{ (UI/mL)} = \frac{X * Vr}{PM * t * Vm}$$

donde X mg/mL es la concentración de glucosa, xilosa, ácido galacturónico o pNP obtenida a partir de la curva patrón; Vr, el volumen total de la reacción; Vm, el volumen de la muestra; t, el tiempo en minutos de la reacción y PM el peso molecular de glucosa (0,180 mg/ μmol), xilosa (0,150 mg/ μmol), ácido galacturónico (0,194 mg/ μmol) o pNP (0,13911 mg/ μmol).

La actividad enzimática específica (AEe) resultó del cociente de la actividad enzimática y la concentración de proteínas de cada muestra expresada en mg/mL). Se obtuvo, de esta manera, valores con la siguiente unidad: UI/mg.

$$AEe \text{ (UI/mg)} = \frac{AE \text{ (UI/mL)}}{Proteínas \text{ (mg/mL)}}$$

VI.6 Detección de actividad enzimática por zimografía

Con el propósito de determinar el tamaño molecular de las endoglucanasas y hemicelulasas de interés presentes en los extractos enzimáticos de NA y CF y sobrenadantes de cultivos, se prepararon geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) co-polimerizados con CMC (0,2% p/v) o xilano (0,1% p/v) (los sustratos sólo se incluyeron en el gel separador). Se agregó a cada muestra el mismo volumen de *buffer* de muestra para zimografía (2X), sin calentar y se sembraron 15 μL por calle. Se realizó la corrida completa a 100 V. Posteriormente, se colocó el gel en un recipiente y se realizaron 3 lavados con *buffer* 0,04 M TrisHCl pH 6,8, de media hora cada uno, en agitación a temperatura ambiente. Luego del último lavado, se dejó toda la noche en el mismo *buffer* a 4 °C y al día siguiente se mantuvo a 37 °C por 2 h. Posteriormente se realizó la tinción de Rojo Congo por 15 min y el subsiguiente desteñido con 1 M NaCl.

VI.7 Caracterización de la actividad enzimática de enzimas purificadas: pH, temperatura y termoestabilidad

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se evaluó realizando las reacciones en *buffer* citrato (pH 3-5), fosfato de sodio (6-8) y glicina-NaOH (pH 9-12) a una temperatura predeterminada. El efecto de la temperatura se evaluó a un pH predefinido, en un rango de temperaturas de 30 °C a 80 °C, en termobloque.

La estabilidad térmica se evaluó por preincubación de la enzima purificada en *buffer* a pH óptimo y a diferentes temperaturas, con la toma periódica de muestras para la medición de la reacción enzimática correspondiente. Los resultados se expresaron en base a la actividad enzimática residual, es decir al porcentaje de actividad respecto de la actividad máxima (100%).

VI.8 Cinética enzimática

A partir de las enzimas recombinantes purificadas se determinó en primer lugar el tiempo en el cual la reacción enzimática transcurrió de forma lineal (V_0), para lo cual se ensayó la actividad a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15 y 20 min. Al tiempo correspondiente a la V_0 de la reacción, se determinó la actividad enzimática usando diferentes concentraciones de sustrato (2, 5 y 10 mg/mL) y se evaluaron los parámetros cinéticos de: K_M o K_{half} , V_{max} , número de recambio (kcat: $V_{max}/[Et]$), eficiencia catalítica (kcat/ K_M) o coeficiente de Hill (η_H), según correspondiera por el tipo de cinética, utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.04 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California EUA (www.graphpad.com).

VI.9 Hidrólisis de biomasa lignocelulósica

Las biomásas lignocelulósicas (rastrojo de maíz, pasto de elefante y bagazo de caña de azúcar) pretratadas con ácido sulfúrico diluido se utilizaron en una suspensión 2% de sólido en la reacción. Para volúmenes de reacción de 0,5 mL, se utilizaron tubos de plástico de 2 mL, para facilitar la agitación. La enzima purificada se agregó a los tubos con biomasa y *buffer* citrato 0,5 M (al pH indicado para cada reacción) y se llevaron a cabo las reacciones en agitador orbital a 250 rpm, a la temperatura y tiempo requerido. Luego, se detuvo la reacción enzimática a 100 °C,

10 min y se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 20 min. Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron con filtro de nylon de 0,2 µm para analizar los azúcares solubles por DNS.

VI.10 Cromatografía en capa delgada (TLC)

El perfil de azúcares generado luego de las reacciones de hidrólisis se analizó cualitativamente por cromatografía en placas de sílica gel (GE Healthcare Life Science, EUA), usando una solución de butanol:ácido acético:agua (2:1:1) como solvente. Luego de la separación completa de las muestras (aproximadamente 3 h), se reveló la placa con una solución de agua:metanol:ácido sulfúrico (20:70:3) 1% orcinol (SIGMA) sobre el calor directo. Como estándar se utilizó una mezcla de 0,125 mg/mL de cada celooligosacárido: glucosa, celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa (SIGMA, EUA).

VII. Métodos bioinformáticos

VII.1 Análisis filogenéticos

VII.1.1 Construcción de árbol filogenético a partir de secuencias del gen de ARNr 16S obtenidas de bibliotecas de clones cultivables de *Nasutitermes aquilinus* y *Cortaritermes fulviceps*

Se construyó un árbol filogenético a partir de las bibliotecas de clones cultivables CMC-NA y CMC-CF descritas en la sección V.2 y un conjunto de secuencias de referencia disponibles en el GenBank. Dado que las secuencias correspondientes al gen de ARNr 16S estaban clonadas en el vector pGEM-T Easy (Promega, EUA), como primer paso se eliminó de las mismas la región correspondiente al vector, mediante VecScreen del NCBI, con el consiguiente armado de los alineamientos completos utilizando el programa BioEdit versión 7 (Hall, 1999).

Las bases de datos de secuencias nucleotídicas como BLASTN (del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y RDP Ribosomal Database Project (Cole et al., 2014) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) se utilizaron para la identificación de género y especie bacterianas, en base a secuencias curadas del gen ARNr 16S. Aquellas secuencias con alta identidad y cobertura (mayor al 90%) fueron descargadas para la construcción

de árboles filogenéticos con las herramientas disponibles en el programa MEGA versión 6.0 (Tamura et al., 2013). Los alineamientos múltiples de todas las secuencias se realizaron con Clustal W (dentro de MEGA). Luego, el análisis filogenético se realizó en base a Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) con el método de distancia Tamura-Nei. El árbol final resultó como consenso a partir de 1.000 réplicas (*bootstrap*).

VII.1.2 Análisis filogenético de endoglucanasas

Se realizó el estudio filogenético de las enzimas GH5CelA y GH5CelB. Para ello, las secuencias completas del módulo catalítico de las GH familia 5 se obtuvieron de la base de datos CAZy (mayo de 2018) y se descargaron para la construcción de árboles filogenéticos con las herramientas disponibles en el programa MEGA versión 6.0 (Tamura et al., 2013). Los alineamientos múltiples de todas las secuencias se realizaron con Clustal W (dentro de MEGA). El alineamiento múltiple resultante del dominio catalítico de las secuencias correspondiente a las subfamilias de GH5 se utilizó para realizar un árbol filogenético de Máxima Verosimilitud utilizando el método de Poisson. El árbol final en cada caso resultó como consenso a partir de 1.000 réplicas (*bootstrap*).

VII.2 Análisis de secuencia e identificación taxonómica del gen ARNr 16S de *Anthonomus grandis* bohemian

El procesamiento inicial y el control de calidad de las lecturas *paired-end* obtenidas fue realizado con el programa Mothur (Schloss et al., 2009), y el programa SOP desarrollado por Kozich et al., (2013). Los pasos fueron: (i) alinear los extremos de 250 pb de cada lectura *paired-end* en una sola secuencia bajo un algoritmo de calidad, (ii) las secuencias que presentaban ambigüedades, así como una longitud mayor a 265 pb fueron eliminadas y (iii) las secuencias restantes se alinearon contra la base de referencia SILVA adaptada para Mothur (Quast et al., 2013)(<http://www.arb-silva.de/>, http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files). Aquellas secuencias que comenzaron luego de la posición de alineación 13.862 o terminaron antes de la posición 23.444 y aquellas con homopolímeros de una longitud mayor a 8 bases también fueron eliminadas. Este procedimiento fue

seguido por un paso de reducción de ruido utilizando un algoritmo de pre *cluster* y la eliminación de quimeras con el algoritmo UCHIME, ambos implementados en Mothur. Finalmente, las secuencias se clasificaron taxonómicamente mediante el clasificador Bayesiano de Mothur y la base de datos de referencia SILVA 123 (Wang et al., 2007). Las OTUs se agruparon para cada muestra antes y después de la eliminación de singuletes y dobletes. Menos del 0,2% de las secuencias fueron clasificadas como pertenecientes al Dominio Archaea y por lo tanto eliminadas. El experimento consistió en tres tratamientos, cada uno con tres réplicas biológicas. De las nueve muestras se obtuvieron 72.028 lecturas de alta calidad. Sin embargo, hubo grandes diferencias en lecturas por muestra, que van desde 4.400 a 26.633. Todos los análisis posteriores se realizaron en submuestras normalizadas de 4.400 lecturas (39.600 lecturas, aproximadamente el 55% de las lecturas iniciales) y 3.747 para los análisis que excluyen las secuencias raras (singuletes y dobletes).

El conjunto de datos obtenidos, limpios y normalizados, se utilizó para agrupar las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTU) con un valor de corte de similitud de 0,97.

VII.3 Estimación de la diversidad bacteriana

La riqueza observada se definió como el número de OTUs presentes en cada muestra. El estimador de riqueza Chao y los estimadores de α -diversidad (índice de Shannon e inversa de Simpson) se calcularon usando el programa Mothur (Schloss et al., 2009). Los patrones de diversidad de las OTUs se examinaron mediante curvas de rarefacción. Se consideró que un umbral de similitud de secuencia del 80%, 90%, 95% y 97% sería diferencial en el nivel de phylum, clase/familia, género y especie, respectivamente.

Para los análisis de β -diversidad (inter comunidad), se construyeron las matrices de disimilitud ponderadas UniFrac y Bray-Curtis. Para representar los datos gráficamente se realizó un análisis mediante un ordenamiento multidimensional no paramétrico (NMDS, de sus siglas en inglés).

En el caso de las bibliotecas de termitas CMC-NA y CMC-CF, la β -Diversidad (reparto de la diversidad entre las comunidades) se estimó en función del número de

especies compartidas mediante el algoritmo de LIBSHUFF con el programa Mothur (Schloss et al., 2009).

VII.4 Modelado molecular de endoglucanasas

Las estructuras moleculares de las proteínas de interés se generaron usando el programa de modelado *online* I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang & Zhang, 2015). Para la construcción del modelo, el programa utilizó estructuras de proteínas similares depositadas en la base de datos PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org>) mediante LOMETS (combinación de 10 programas: MUSTER, FFAS3D, SPARKSX, HHSEARCH2 5, HHSEARCH I, NeffPPAS, HHSEARCH, pGenTHREADER, cdPPAS, PROSPECT2). Los fragmentos de templados con el máximo nivel de significancia (medido mediante el *Z score*) se reensamblaron en un modelo de longitud completa. El modelo final de I-TASSER fue el resultado de una segunda simulación donde se refinó su topología global. El nivel de confianza de cada modelo se determinó cuantitativamente por el *C-score*, *TM-score* y RMSD. El *C-score* tiene un valor típico entre [-5, 2], donde un valor alto representa un alto nivel de confianza y viceversa. El *TM-score* tiene valores en un rango de [0, 1], donde 1 indica una similitud perfecta entre dos estructuras. El RMSD representa la distancia promedio entre los átomos de dos proteínas superpuestas. El análisis funcional se realizó también por I-TASSER, utilizando COACH (combinando los programas COFACTOR, TMSITE y SSITE) e incluyendo la predicción de los sitios de unión a ligandos. La manipulación para obtener la figura final de los modelos se realizó usando Chimera software v1.11 (Pettersen et al., 2004).

VII.5 Métodos gráficos y estadísticos

Los gráficos y los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.0 (Swift, 1997). Los datos de actividad enzimática fueron analizados mediante un análisis de la varianza de dos factores (ANOVA), seguido del test de Tukey ($p < 0,01$).

En los análisis de β -diversidad de Parte II de la sección Resultados, las diferencias entre las dietas en la matriz de distancia de Bray-Curtis se probaron mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

Los *heatmaps* utilizados en la Parte I de la sección Resultados se construyeron utilizando el programa MeV versión 4.8.1 para Windows, TM4 Software (Saeed et al., 2003).

La visualización de los alineamientos correspondientes a la secuencias aminoacídicas de GH5CelA y GH5CelB presentes en la sección Parte III: resultados se realizaron con el programa JalView v2 (Waterhouse et al., 2009).

VII.6 Número de acceso de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias parciales del gen 16S ARNr obtenidas en la construcción de las librerías de termitas CMC-NA y CMC-CF se depositaron en GenBank bajo los siguientes números de acceso KJ933510-KJ933529.

Las secuencias de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr provenientes de las librerías de *A. grandis* se depositaron en el archivo NCBI *Sequence Read* bajo el *BioProject* PRJNA327396.

Resultados

Parte I

Efecto de las dietas lignocelulósicas sobre
la diversidad bacteriana y la actividad
hidrolítica en el intestino de *Anthonomus*
grandis boheman

Resultados: Parte I

I.1 Detección de la actividad celulolítica a lo largo del desarrollo de *Anthonomus grandis* bohemian

Con el propósito de conocer el perfil celulolítico durante el desarrollo de *A. grandis*, se evaluó la actividad endoglucanasa en extractos de cabeza (EC) y de intestinos enteros (EI) a lo largo de los distintos estadios de desarrollo del insecto: 1er estadio (4 mm), 2do estadio (5 mm), 3er estadio (7 mm), pupa y adulto.

La mayor actividad endoglucanasa fue observada en los EI del tercer estadio larval ($0,76 \pm 0,08$ UI/g). En cuanto a los EC, la actividad fue similar a lo largo de las distintas etapas del desarrollo de *A. grandis* ($P=0,05$), excepto para el estadio de pupa, en el cual la actividad es apenas detectable (**Figura I1**). En base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar en los próximos ensayos EI pertenecientes al tercer estadio larval.

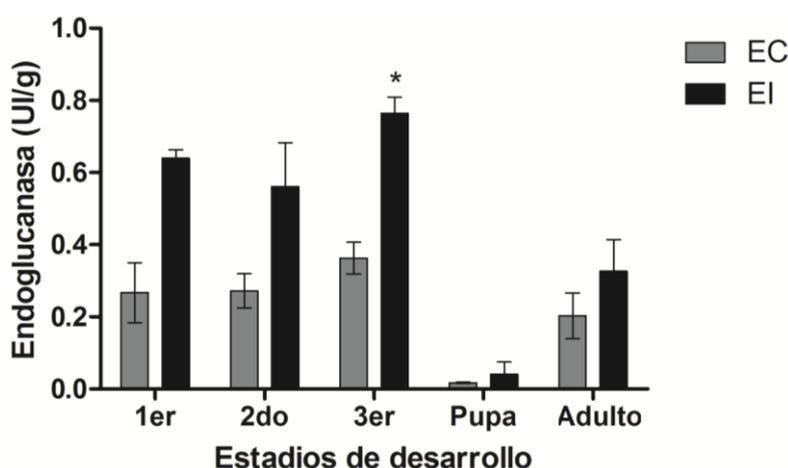


Figura I1. Perfil de la actividad endoglucanasa de *A. grandis*. Los resultados corresponden al promedio ($n=3$) \pm desvío estándar de la actividad endoglucanasa determinada en extractos de cabeza (EC) y extractos de intestinos (EI) durante los diferentes estadios de desarrollo del insecto (1er, 2do, 3er, pupa y adulto). * indica diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$).

I.2 Actividad celulolítica y hemicelulolítica a través de las diferentes secciones del intestino de *Anthonomus grandis* bohemian

Con el objetivo de estudiar la distribución espacial de las actividades enzimáticas en el tracto digestivo de *A. grandis*, se midió la actividad celulolítica y

hemicelulolítica, en adelante (hemi) celulolítica, en extractos de las secciones intestinales (ES1, ES2 y ES3) y del intestino entero (EI) (**Figura I2**). Tanto la actividad endoglucanasa como xilanasas están principalmente localizadas en la sección S1 ($0,85\pm 0,08$ y $0,11\pm 0,03$), y son significativamente menores en las secciones S2 ($0,69\pm 0,04$ y $0,02\pm 0,01$) y S3 ($0,29\pm 0,09$ y ausente) ($P=0,01$, **Figura I3A-B**). Además, las actividades registradas en ES1 no muestran diferencias significativas a las observadas para el EI. Por otro lado, la actividad β -glucosidasa fue significativamente mayor ($P=0,05$) en el EI ($1,6\pm 0,1$) comparado con las secciones S2 ($0,4\pm 0,08$) y S3 ($1,3\pm 0,1$), y no fue detectable en S1 (**Figura I3C**). Asimismo, la actividad pectinasa resultó similar en las tres secciones del intestino y en el EI (**Figura I3D**). Debido a que las actividades enzimáticas analizadas en el EI resultaron similares o mayores con respecto a las regiones individuales, y dado que el EI es más fácil de procesar, se decidió utilizar en los próximos ensayos los intestinos enteros.

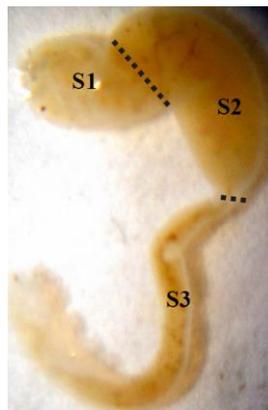


Figura I2. Sistema digestivo de *A. grandis*. Las diferentes secciones del intestino del insecto se muestran separadas por líneas de puntos: S1=intestino anterior, esófago, glándulas labiales y proventriculos, S2=intestino medio, S3=intestino medio posterior, túbulo de Malpighi e intestino posterior.

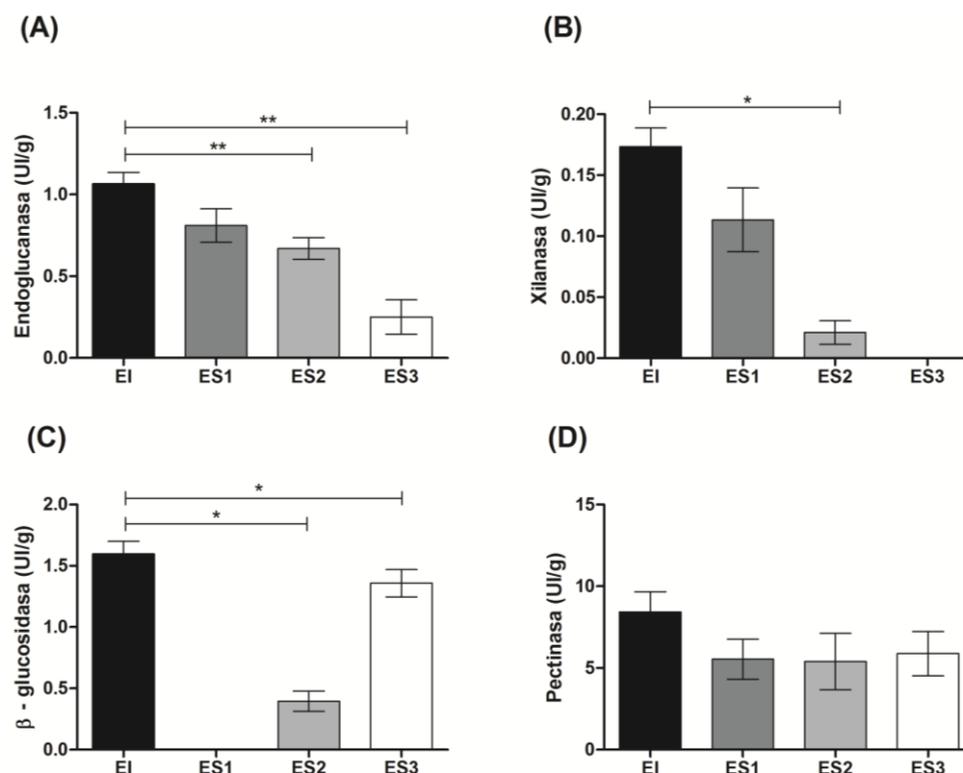


Figura 13. Actividad hidrolítica en el intestino de *A. grandis*. (A) Actividad endoglucanasa, (B) xilanasa, (C) β -glucosidasa y (D) pectinasa, en intestinos enteros (EI) y en las diferentes secciones intestinales de larvas de *A. grandis* del tercer estadio. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de n=3 determinaciones. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de test de Dunnet's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs EI.

1.3 Estudio de la diversidad bacteriana intestinal de *Anthonomus grandis* bohemian

Con el propósito de investigar cómo responde el microbioma de *A. grandis* a cambios en la dieta, se realizó un análisis de secuenciación de alto rendimiento (SAR) de la comunidad bacteriana presente en la microbiota intestinal de este insecto mediante el análisis de amplicones de la región hipervariable V3-V4 del gen ARNr 16S por triplicado. Se utilizaron larvas pertenecientes al tercer estadio alimentadas con tres dietas lignocelulósicas diferentes: harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) y pasto elefante (PE).

En intestinos de *A. grandis* alimentados con las diferentes dietas artificiales se detectaron quince *phyla* y un bajo número de bacterias no clasificadas (0,2%) (Figura 14). Dentro del grupo alimentado con HA, los grupos dominantes encontrados fueron Proteobacteria (76%) y Firmicutes (17%), seguido de Actinobacteria (4%) y Spirochaetes (2%). También fueron detectados Bacteroidetes,

Deinococcus-Thermus, Chloroflexi y Candidate_division_OP3 con abundancias entre el 1 y 0,1%. En el grupo alimentado con PE también dominaron las Proteobacterias y Firmicutes, seguidos por Actinobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Deinococcus-Thermus, Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Parcubacteria y Planctomycetes (74, 14, 6, 4, 1, 0,3, 0,2, 0,1, 0,1, 0,1, 0,1, 0,1% de las lecturas, respectivamente). Cabe destacar, que en el grupo alimentado con RM, dominaron las Spirochaetes (62%), seguido por Proteobacteria (14%), Actinobacteria (3%), Bacteroidetes (2%), Acidobacteria (0,5%), Planctomycetes (0,3%), Chlorobi (0,2%) y Synergistetes (0,1%). Asimismo, 3% de las lecturas pertenecieron a OTUs que no pudieron ser clasificados a nivel de *phylum*.

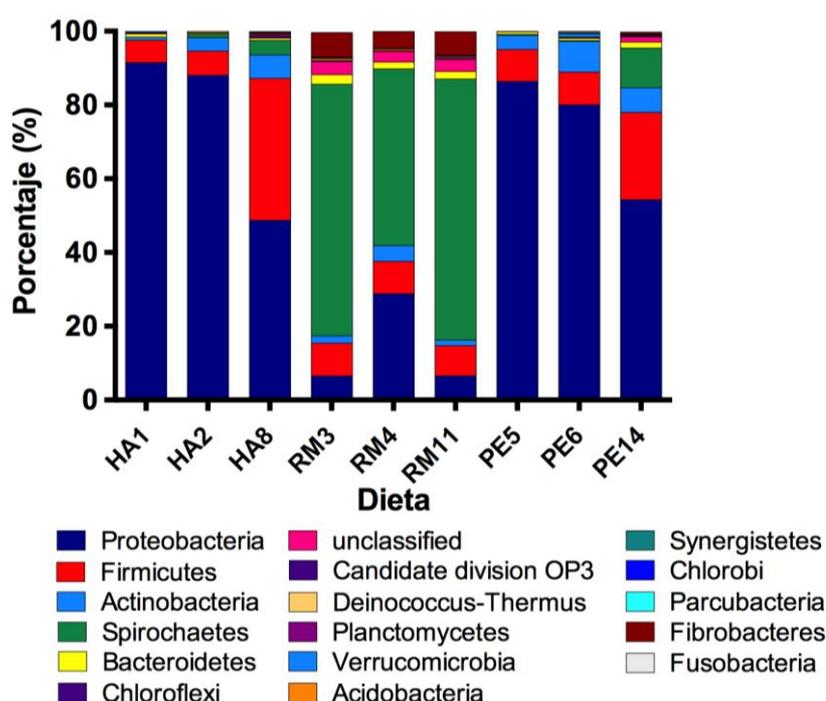


Figura I4. Abundancia relativa de los *phyla* bacterianos presentes en el intestino de *A. grandis* alimentados con harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) y pasto elefante (PE). Se representan los *phyla* bacterianos con una abundancia mayor o igual al 0,1%.

I.4 Estimación de la diversidad bacteriana en el intestino de *Anthonomus grandis* bohemian

I.4.1 Diversidad alfa

Con el propósito de determinar si el tamaño muestral fue representativo del total se estimaron las curvas de rarefacción al 97% de similitud. Para los análisis se

tuvieron en cuenta todas las OTUs (grupo A) y aquellas OTUs en las que hubieran al menos tres lecturas (es decir, excluyendo los singuletes, dobles y las OTUs muy raras (grupo B). Luego de la remoción de las OTUs raras se observó alta cobertura (>0,98 %) (**Tabla I1**). Las curvas de rarefacción alcanzaron la meseta en el grupo B (**Figura I5B**). Este análisis reveló que el tamaño de la muestra fue suficiente para representar la diversidad bacteriana de OTUs no raras presentes en la comunidad de *A. grandis* alimentados con HA, RM y PE (**Figura I5**).

En la comunidad bacteriana intestinal de los picudos alimentados con RM se observaron los mayores índices de riqueza. La diversidad, medida como índice inverso de Simpson, fue también elevada en la comunidad de RM; sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto a la obtenida en la dieta PE (**Tabla I1**). Por otro lado, en la comunidad bacteriana de HA se observó menor riqueza y el menor índice de diversidad de Simpon, indicando que es la comunidad más uniforme.

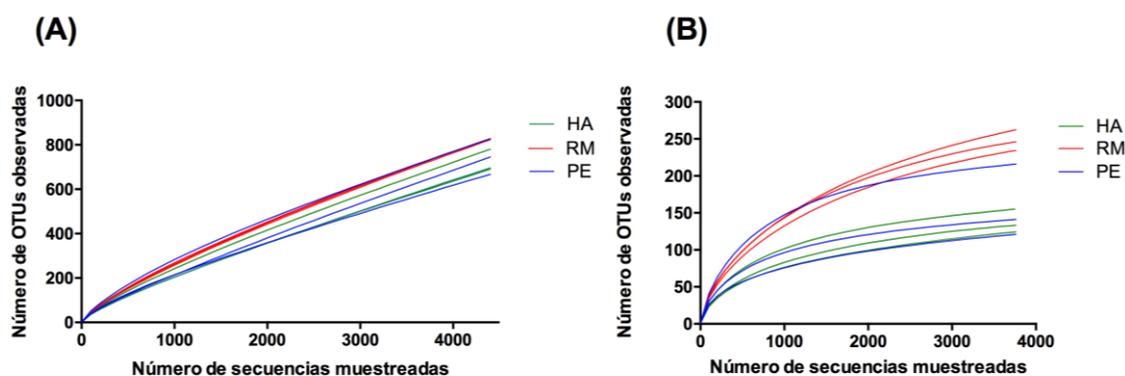


Figura I5. Curvas de rarefacción de las comunidades bacterianas del intestino de larvas de *A. grandis* alimentadas con tres dietas artificiales. Número de OTUs distintas en el intestino de larvas alimentadas con harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) y pasto de elefante (PE). **(A)** total de las OTUs **(B)** Excluyendo las OTUs raras (singuletes y dobles). Las curvas fueron construidas agrupadas al 97% de identidad de secuencia.

Tabla I1. Estimación de riqueza e índices de diversidad y para las muestras de intestino con diferentes dietas^a.

Grupo	Con secuencias raras				Sin secuencias raras			
	Riqueza		Diversidad		Riqueza		Diversidad	
	Observado	Chao	InvSimpson	Cobertura	Observada	Chao	InvSimpson	Cobertura
HA1	696	6913,2 (4911-9867,1)	7,7 (7,3-8,1)	0,86	125	181,4 (151-248,1)	5,8 (5,5-6)	0,99
HA2	690	5849 (4250,4-8164,4)	9 (8,5-9,5)	0,86	134	156,9 (144-186,6)	6,8 (6,5-7,2)	0,99
HA8	780	5860,1 (4390-7929)	14 (13,2-15)	0,86	155	223,3 (185,1-310)	10,2 (9,6-10,8)	0,99
RM11	823	3427,6 (2812-4234)	13,7 (12,8-14,7)	0,85	235	273,3 (256-315,3)	10,2 (9,6-10,7)	0,98
RM3	826	3271,3 (2692,8-4029,2)	14,7 (13,8-15,8)	0,86	147	283,9 (267-315,3)	11 (10,3-11,7)	0,98
RM4	828	3892 (3137,4-4892,6)	22,9 (23,4-26,6)	0,85	264	336,2 (307-386,2)	18,8 (17,7-20)	0,98
PE14	828	5094,3 (3910,3-6733,2)	22,2 (20,8-23,8)	0,86	216	261,3 (237-314,4)	16,2 (15,3-17,3)	0,99
PE5	745	6853,5 (4993,4-9528)	11,3 (10,7-12)	0,85	121	158 (137,3-205)	8,3 (7,8-8,7)	0,99
PE6	667	5361,5 (3869-7550)	13 (12,3-13,8)	0,88	142	173 (155-217,4)	10 (9,5-10,6)	0,99

^aLos índices de riqueza y diversidad fueron estimados al 3% de diferencias en el alineamiento de ácidos nucleicos antes y después de la remoción de las secuencias raras. Entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza calculados al 97% con el programa Mothur (Schloss et al., 2009).

I.4.2 Diversidad beta

I.4.2.1 Estructura de la comunidad

Las distancias entre las comunidades bacterianas basadas en las OTUs presentes, así como también su abundancia fueron representadas utilizando las matrices de disimilitud de Bray-Curtis y UniFrac no ponderada. Los resultados fueron visualizados gráficamente mediante un ordenamiento multidimensional no paramétrico (NMDS). El análisis de similaridad de Bray-Curtis reveló que la comunidad bacteriana presente en los intestinos de *A. grandis* alimentados con la dieta artificial RM estuvo claramente separada, a lo largo del segundo eje, de aquella perteneciente a los alimentados con las dietas HA y PE. Además, las comunidades bacterianas HA y PE se encontraron separadas a lo largo del primer eje (**Figura I6A**). Cuando se utilizó la matriz de disimilitud UniFrac ponderada se observó un patrón similar, pero en este caso la separación entre las comunidades pertenecientes a las dietas HA y PE fue menos clara a lo largo del eje 1 (**Figura I6B**). Mediante la aplicación del test de permutación, aplicado a la matriz UniFrac ponderada, se observó que las diferencias entre las dietas artificiales fueron significativas ($P < 0,005$); aunque no se encontraron diferencias significativas con la matriz de distancia no ponderada UniFrac. Estos resultados sugieren que las diferencias observadas entre las comunidades se debieron a diferencias en las abundancias relativas, y no a diferencias en la identidad de las OTUs. Además se llevó a cabo un test AMOVA a la matriz de distancia Bray-Curtis de todas las réplicas biológicas y diferentes tratamientos. Este análisis también reveló diferencias significativas a través de las diferentes dietas artificiales ($P = 0,011$).

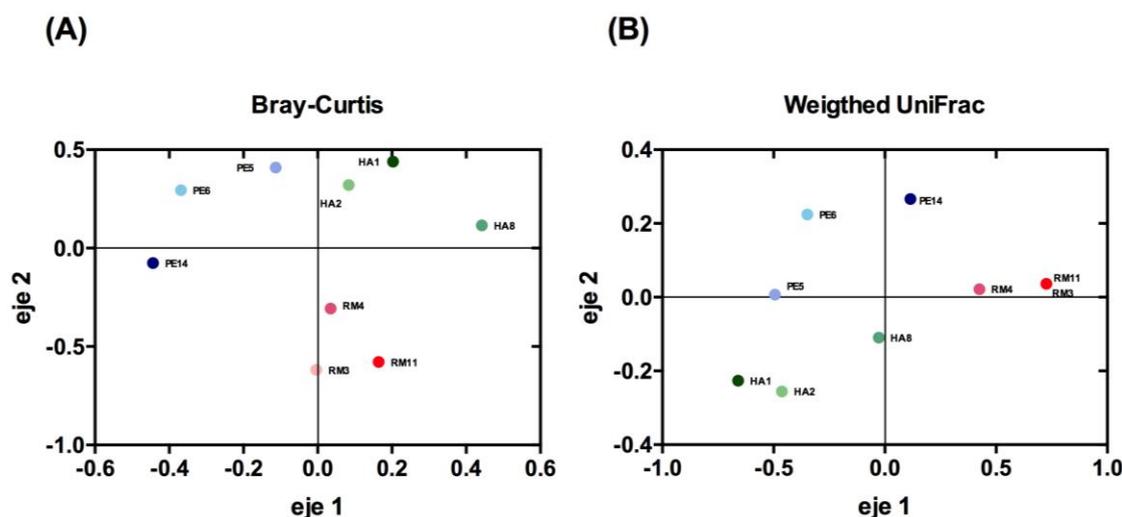


Figura 16. Representación gráfica del ordenamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) derivados de la comparación entre las comunidades bacterianas del intestino de *A. grandis* alimentados con diferentes dietas artificiales. Ambas matrices de distancia, (A) Bray-Curtis y (B) UniFrac ponderado, mostraron diferencias significativas a lo largo de las diferentes dietas cuando se analizan con un test de permutaciones ($P=0,011$ y $P<0,005$ para Bray-Curtis y UniFrac, respectivamente). Las réplicas biológicas provenientes de la dieta artificial rastrojo de maíz (RM, rojo) están separadas claramente de aquellas de harina de algodón (HA, verde) y pasto de elefante (PE, azul).

1.4.2.2 Diversidad entre comunidades microbianas del intestino de *Anthonomus grandis* bohemian

Los patrones de coocurrencia de las OTUs observadas en los microbiomas de *A. grandis* alimentados con las diferentes dietas artificiales se representaron mediante diagramas de Venn. Entre las tres réplicas biológicas de *A. grandis* alimentados con HA se identificaron 686 OTUs totales de las cuales 28 eran comunes entre las réplicas (**Figura 17A**). En el caso de la comunidad de RM, el número de OTUs compartidas fue mayor, 141 de un total de 776 OTUs. Así, un número significativo de OTUs parecen ser únicos de cada réplica (**Figura 17B**). Finalmente, un resultado similar se obtuvo para la comunidad de PE, ya que solamente 24 de las 750 OTUs totales fueron compartidos a lo largo de las tres réplicas biológicas (**Figura 17C, Tabla A2**). Cuando se repitieron los análisis eliminando las OTUs raras, los resultados obtenidos en las OTUs compartidas fueron similares para cada dieta. Sin embargo, el número de OTUs únicas por dieta decreció (datos no mostrados). Se identificaron 11 OTUs compartidas entre las tres dietas artificiales, las cuales pudieron ser asignadas a tres *phyla*, diez familias y ocho géneros (**Figura 17D, Tabla I2**). Estas OTUs representan alrededor del 27% del total de las secuencias obtenidas.

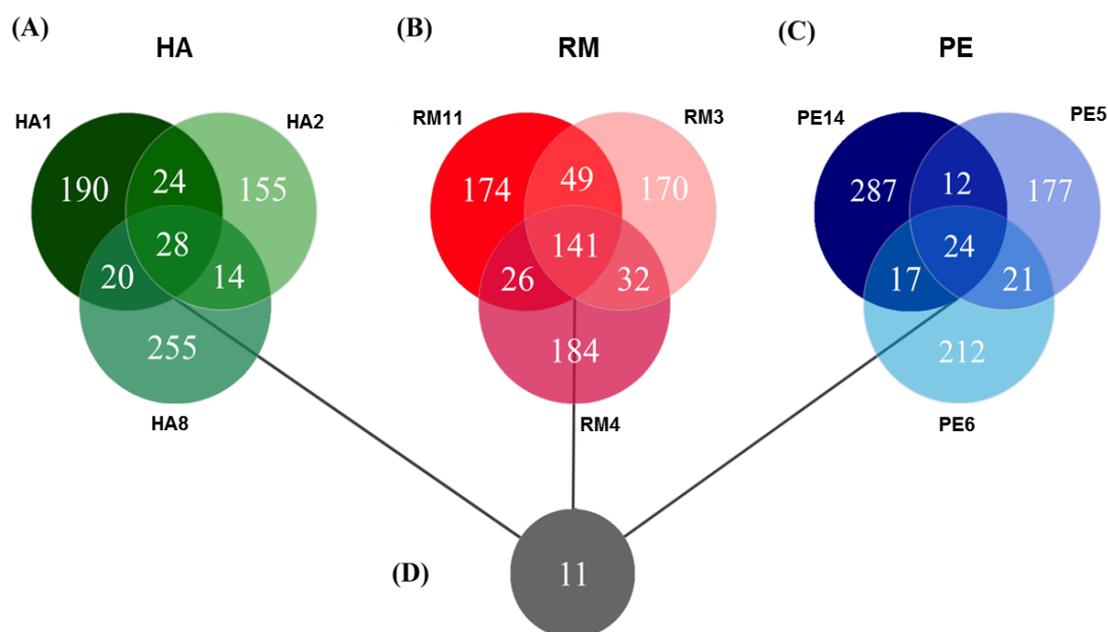


Figura 17. Diagrama de Venn para cada dieta artificial por triplicado y core general. Los diagramas de Venn representan para cada dieta las OTUs únicas y compartidas entre las réplicas biológicas de cada dieta, **(A)** Harina de algodón (HA), **(B)** Rastrojo de maíz (RM), **(C)** Pasto de elefante (PE). **(D)** Core microbiano compuesto por las once OTUs compartidas entre dietas. Se estableció la distancia genética para los OTUs a un valor de *cutoff* de 0,03.

Tabla 12. OTUs compartidas presentes en el core microbiano de *A. grandis* alimentado con las dietas artificiales HA, RM y PE.

OTUs	Phylum	Familia	Género
0001	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0002	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
0004	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Delftia</i> sp.
0008	Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
0014	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0015	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0144	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0006	Firmicutes	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i> sp.
0007	Firmicutes	Panibacillaceae	<i>Fontibacillus</i> sp.
0011	Actinobacteria	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i> sp.
0022	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.

Las OTUs que formaron parte de este core microbiano pertenecieron a los géneros más abundantes encontrados, los cuales mostraron una fuerte variación en abundancia a lo largo de las dietas y a su vez entre réplicas biológicas de las mismas dietas. Para mayor visualización estos resultados los representamos en un *heatmap*

(Figura I8). Dado que en este trabajo de Tesis estamos interesados en identificar los géneros responsables de la degradación de la lignocelulosa, se realizó una búsqueda bibliográfica de los géneros del *core* y se encontró que siete de las OTUs compartidas se incluyen dentro de los ocho géneros celulolíticos más abundantes encontrados: *Delftia* sp., *Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Micrococcus* sp. (Figura I8).

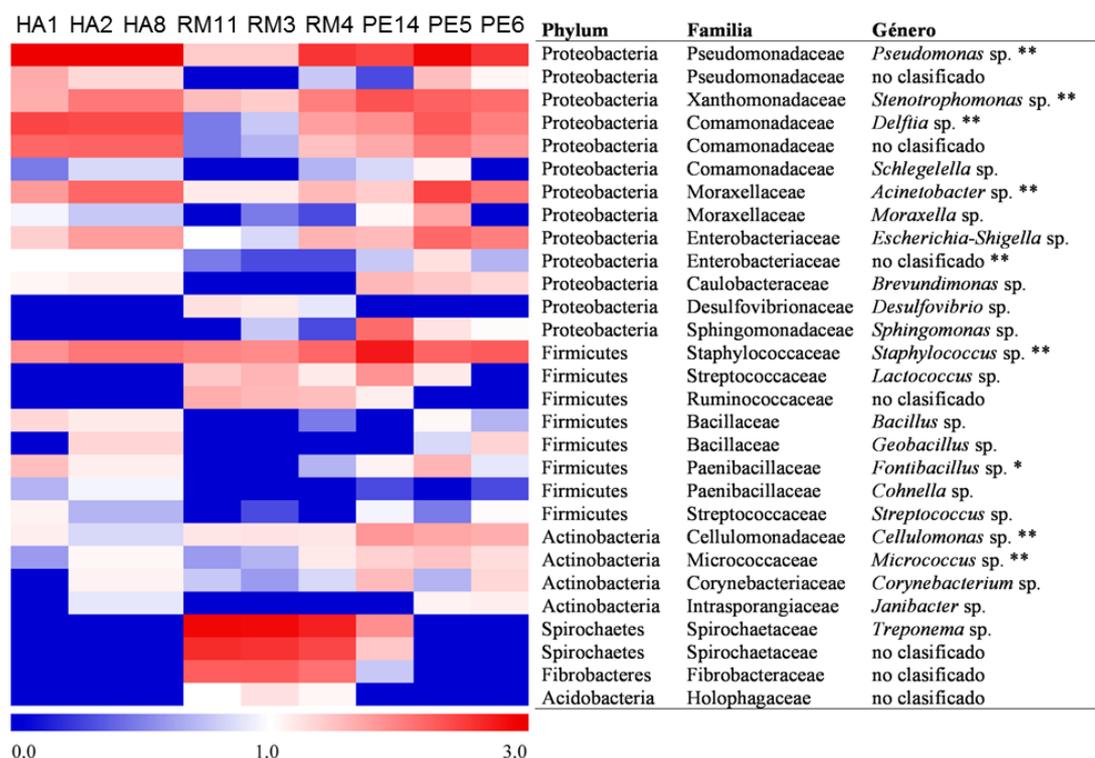


Figura I8. Abundancia relativa de los taxa bacterianos más abundantes en el intestino de *A. grandis* a lo largo de las dietas artificiales. Se muestra la clasificación bacteriana a nivel de género. El *heatmap* fue construido en escala logarítmica para facilitar la visualización de los grupos menos abundantes. Los colores de azul a rojo representan la abundancia relativa de las OTUs de menor a mayor. * indica bacterias presentes en el *core*, y ** indica bacterias celulolíticas presentes en el *core*. Harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) y pasto elefante (PE).

I.5 Caracterización de la actividad hidrolítica a través de las diferentes dietas

Con el propósito de comparar los posibles cambios en los perfiles de actividad hidrolítica, las actividades endoglucanasa, xilanasa, β -glucosidasa y pectinasa se evaluaron en los EI de larvas de *A. grandis* alimentados con las tres dietas artificiales (HA, RM y PE). Se observó que las larvas criadas con la dieta HA presentaron niveles de actividad endoglucanasa, xilanasa y β -glucosidasa

significativamente mayores respecto de las otras dos dietas artificiales ($P = 0,0001$, **Figura I9**).

La actividad enzimática se caracterizó luego a cinco condiciones de pH diferentes, comprendidos en el rango de 4,0-8,0, y a tres temperaturas diferentes (30, 50 y 80 °C). Como resultado se observó que el pH óptimo de actividad endoglucanasa se registró en dos valores, a 5 y 7, en las tres dietas ensayadas (**Figura I9A**).

Por otro lado, en el caso de la actividad xilanasa se observó una influencia de la dieta artificial HA sobre el perfil de pH generado (**Figura I9B**), ya que en intestinos de picudos alimentados con esta dieta se obtuvo una actividad significativamente mayor ($P < 0,0001$) a pH 6, mientras que para la dieta PE, el perfil de actividad fue máxima en el rango de pH 5-6. Por el contrario, en la dieta RM la actividad fue significativamente menor, con un pico de actividad a pH 5 y con una reducción a partir de pH 6.

La actividad β -glucosidasa presentó un rango de pH óptimo entre 5-6 para la dieta HA, un pico de pH 5 para PE y pH a 6 para RM. Por encima de pH 6, la actividad β -glucosidasa se perdió por completo en las tres dietas (**Figura I9C**).

La actividad pectinasa mostró un rango de pH óptimo entre 5-7 para las tres dietas, y no se detectó actividad a pH 8. Por lo tanto, esta actividad enzimática fue la menos afectada por el tipo de dieta artificial utilizada (**Figura I9D**).

La condición de temperatura óptima para la actividad endoglucanasa fue de 50 °C en las tres dietas artificiales estudiadas. Esta temperatura también resultó la óptima para las actividad xilanasa y β -glucosidasa a pH 5 en el caso de la dieta RM y para la actividad pectinasa a pH 6 para las dietas artificiales HA y PE (**Figura I9E-H**).

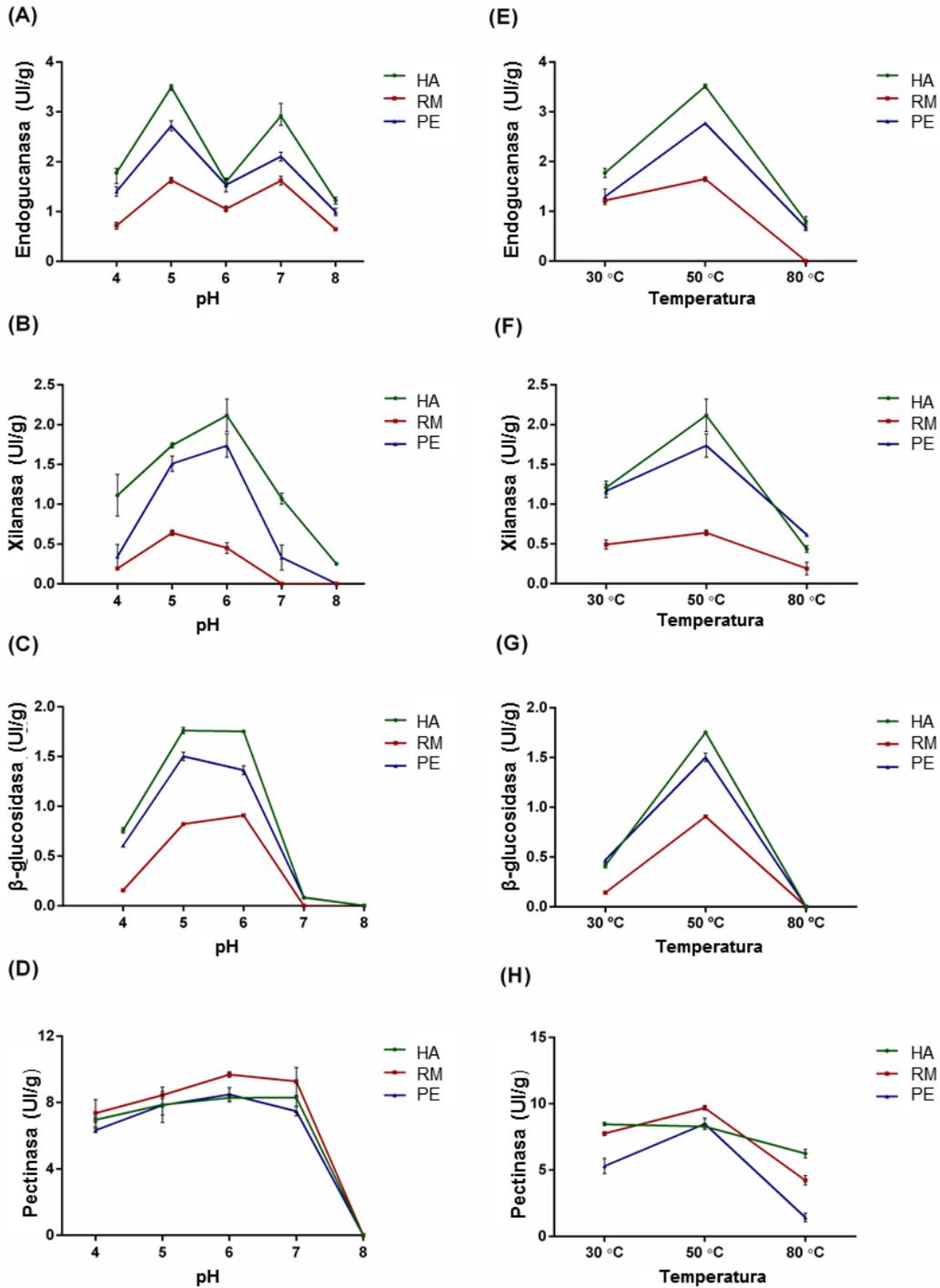


Figura 19. Caracterización de la actividad enzimática de extractos de intestinos de *A. grandis* alimentados con tres dietas artificiales. Los datos representan el promedio \pm desvío estándar de tres replicas biológicas a diferentes pH y temperaturas. (A, E) actividad endoglucanasa, (B, F) xilanasa, (C, G) β -glucosidasa y (D, H) pectinasa, en intestinos de insectos alimentados con harina de algodón (HA), rastrojo de maíz (RM) y pasto elefante (PE). La significancia estadística entre las distintas actividades enzimáticas se determinó utilizando un análisis de la varianza de dos factores (ANOVA) seguido del test de Tukey.

I.6 Composición química de la biomasa lignocelulósica

Para evaluar cómo la composición química y estructural de las diferentes dietas afectan tanto los cambios observados en la microbiota como en el perfil de las actividades hidrolíticas, se analizó el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina en HA, RM y PE. Las proporciones de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina detectadas fueron 32, 28, 5 y 4%, en RM y 46, 27, 9 y 2% en PE, respectivamente. La harina de algodón es una dieta comercial (Pharmamedia), rica en proteínas (55%), 2% de carbohidratos, 5% de aceite y 4% de cenizas. Esta dieta contiene un 9,6% de celulosa, 8,7% de hemicelulosa, 5,4% de lignina y 10% de pectina.

I.6.1 Caracterización de las dietas mediante Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)

Utilizando los datos del espectro FT-IR se calcularon diferentes relaciones para la caracterización de materiales lignocelulósicos (**Figura A1**). El índice de orden lateral (LOI) y la intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI) se utilizaron como parámetros para calcular la cristalinidad de la celulosa en las muestras. El grado de lignificación como la relación Siringilo/Guaiacilo (S/G), lignina/carbohidrato (L/C) y carbonilo/carbohidratos (C/C) se muestran en la **Tabla I3**. Se puede observar que los valores de LOI y HBI son significativamente mayores ($P < 0,05$) para la biomasa RM en comparación con PE, sugiriendo una estructura más ordenada de la celulosa (cristalina). A su vez, el grado de lignificación fue significativamente mayor para RM respecto a PE ($P < 0,05$), mientras que la relación de unidades S/G es similar para ambas biomásas. Para el caso de la dieta HA, las relaciones anteriores no pudieron ser calculadas debido a la ausencia en el espectro de las bandas correspondientes a las longitudes de ondas características de ciertos enlaces utilizados para realizar la caracterización.

Tabla I3. Relación obtenida entre la intensidad de absorbancia del número de onda designado a los polímeros*.

		Muestra	
		PE	RM
LOI	I1429/I898	1,60±0,12 ^a	3,80±0,56 ^b
HBI	I3400/I1320	0,85±0,17 ^a	1,02±0,02 ^b
° Lignificación	I1510/I898	1,27±0,06 ^a	2,20±0,23 ^b
Relación S/G	I1327/I1271	0,94±0,09 ^a	0,84±0,1 ^a
Relación L/C	I1510/I1164	0,45±0,06 ^a	0,33±0,04 ^b
	I1510/I1738	1,40±0,12 ^a	1,66±0,24 ^a
Relación C/C	I1732/I1373	0,49±0,03 ^a	0,43±0,02 ^a
	I1738/I1164	0,32±0,07 ^a	0,21±0,06 ^a

* I1510/I1164: relación lignina-holocelulosa; I1510/I898: relación lignina-celulosa; I1510/I1373: relación lignina-celulosa y hemicelulosa, I1510/I1738: relación lignina-xilano (hemicelulosa).

Valores con la misma letra en una misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

I.7 DISCUSIÓN

En el sistema digestivo de muchos insectos el intestino anterior secreta enzimas endógenas lignocelulolíticas, mayormente para la despolimerización de la lignina. En el intestino medio ocurre la secreción de numerosas enzimas digestivas endógenas y en el intestino posterior se encuentra la mayoría de los endosimbiontes y es allí donde ocurre la principal degradación de la celulosa (Li & Brune, 2005; Sun et al., 2013). Sin embargo, este patrón de organización no es general, ya que en algunas especies de Coleópteros y Leptidópteros las comunidades bacterianas están asociadas a las secciones del intestino medio y posterior (Egert et al., 2004; Arias-Cordero et al., 2012). En el escarabajo rojo (Donaciinae) los endosimbiontes se concentran en grandes ciegos del intestino medio, en larvas, y en regiones especializadas de los túbulos de Malpighi en adultos (Kölsch & Pedersen, 2010), mientras que en el escarabajo adulto *Odontotaenius disjunctus* la comunidad bacteriana se localiza en el intestino posterior (Nardi et al., 2006). Los genomas del escarabajo *Anoplophora glabripennis* y otros escarabajos fitófagos contienen los genes que codifican las enzimas necesarias para degradar tanto la celulosa como la hemicelulosa presente en la pared vegetal (Pauchet et al., 2010, 2014). En algunos escarabajos de la familia cerambícidos, estos genes se obtuvieron originalmente a través de la transferencia horizontal a partir de hongos o bacterias, y posteriormente se diversificaron para formar familias con múltiples genes. Esto se diferencia de otros insectos que se alimentan de madera, como por ejemplo, las termitas y algunas hormigas y cucarachas, que presentan similares capacidades metabólicas llevadas a cabo por los microorganismos endosimbiontes cuyos genomas contienen muchas de las mismas familias de genes. Además, la lignina se degrada durante el paso a través del intestino de *A. glabripennis*, lo que sugiere el rol de las enzimas secretadas en el intestino por el escarabajo, su microbiota intestinal o ambas partes (McKenna et al., 2016). En el lepidóptero *Manduca sexta* se reportó la presencia de bacterias en el lumen del intestino y colonizando el epitelio del intestino posterior (Dillon & Dillon, 2004). Por el contrario, el tracto digestivo de los barrenadores marinos de la madera Limnoriid, a diferencia de otros animales que se alimentan de madera, no dependen de microorganismos simbióticos para contribuir a digerir la

lignocelulosa. El tracto intestinal parece ser efectivamente estéril sin microorganismos residentes. Esta es una situación particularmente llamativa porque implica que *Limnoria* no requiere de la presencia de una microbiota mutualista, y también que el ambiente intestinal inhibe la proliferación microbiana. La ausencia de microorganismos en el tracto digestivo sugiere que los barrenadores de madera producen todas las enzimas necesarias para la digestión de la lignocelulosa (King et al., 2010).

En cuanto a *A. grandis*, su sistema digestivo se encuentra formado por el intestino anterior (que comprende el esófago, las glándulas salivales y el proventrículo), el intestino medio, túbulos de Malpighi y el intestino posterior (MacGown & Skorowski, 1981). Hasta el presente, el proceso de cómo ocurre la degradación de la lignocelulosa en el mismo es desconocido.

Nuestros resultados mostraron que la actividad endoglucanasa se localizó principalmente en el intestino anterior (S1) y medio (S2), mientras que la actividad xilanasasa se en el intestino anterior (S1) en comparación con las otras secciones, reflejando probablemente un rol más importante de las enzimas endógenas en la degradación. Sin embargo, la actividad β -glucosidasa se detectó principalmente en el intestino posterior (S3), sugiriendo que las comunidades microbianas también contribuyen a la digestión.

A. grandis, como otros insectos, poseen enzimas endógenas y de su microbiota endosimbionte que podrían tener la capacidad de degradar las paredes vegetales de las plantas. En la actualidad, ha sido secuenciado el transcriptoma completo del intestino medio de *A. grandis*, identificándose numerosas enzimas GH (Firmino et al., 2013; Salvador et al., 2014). Sin embargo, la relación que existe entre las enzimas endógenas y la microbiota intestinal en la degradación de los complejos componentes que componen la pared vegetal no es clara aún. En particular, la respuesta de la microbiota intestinal a cambios en la dieta no ha sido estudiada hasta el momento.

Estudios previos revelaron que la dieta modula la estructura de la comunidad y las funciones metabólicas de la microbiota intestinal de diferentes animales, incluyendo a los insectos (Leser et al., 2000; Middelbos et al., 2010; Cardoso et al., 2012; Colman et al., 2012; Montagna et al., 2016; Deusch et al., 2017; Jiang et al.,

2017). En efecto, Montagna et al. (2015) encontraron que la fuente de alimentación influye significativamente en la comunidad bacteriana de *Rhynchophorus ferrugineus* (escarabajo de la palmera roja). Su trabajo reveló también que los efectos fueron más evidentes en los insectos alimentados con dietas compuestas por material lignocelulósico. En el caso de las termitas, diferentes estudios se enfocaron en determinar cómo una dieta específica determina la composición de la microbiota, y se definió que las dietas podrían influir en el microbioma del intestino (Mikaelyan et al., 2015; Rahman et al., 2015; Wang et al., 2016).

Los cambios observados en las curvas de rarefacción y en los índices de diversidad descritos en este trabajo sugieren que las dietas utilizadas son capaces de inducir grandes cambios en la estructura de la comunidad bacteriana respecto a riqueza, diversidad y composición taxonómica. *A. grandis* alimentado con la dieta rastrojo de maíz (RM) presentó una mayor riqueza y diversidad bacteriana respecto a las otras dos dietas, con una importante disminución en Proteobacteria y un incremento en Spirochaetes. Además, cuando las secuencias raras (singuletes y dobletes) fueron removidas del análisis, el efecto de las dietas artificiales fue mucho más evidente. En los intestinos de las larvas alimentadas con las dietas artificiales harina de algodón (HA) y pasto elefante (PE), alrededor del 90% de los *phyla* encontrados correspondían a Proteobacterias y Firmicutes. Ambos *phyla* predominantes fueron reportados previamente en otros insectos como los gorgojos (*Rhynchophorus ferrugines* y *R. Vulneratus*), escarabajos (*Pachisoma endroedyi*, *P. striatum*, *Megetra cancellata*, *Epicauta longicollis*, *Gonasida inferna* y *Calosoma peregrinator*), el gusano de la hoja de algodón (*Spodoptera littoralis*), termitas superiores (*Nasutitermes aquilinus* y *Cortaritermes fulviceps*), abejas (*Apis mellifera*), saltamontes (*Lycorma delicatula*) y la vaquita de San Antonio amarilla (*Illeis koebelei*) (Ben Guerrero et al., 2015; Colman et al., 2012; Franzini et al., 2016; Montagna et al., 2015; Shao et al., 2014; Yun et al., 2014; Montagna et al., 2017; Muhammad et al., 2017). Por otro lado, el género Spirochaetes ha sido descrito como un grupo predominante dentro de la microbiota intestinal de las termitas (Benjamino & Graf, 2016; Boucias et al., 2013; Husseneder et al., 2010; Warnecke et al., 2007). Los cambios observados en la microbiota pueden deberse a diferencias en la heterogeneidad de las diferentes biomasas, ya que dietas más complejas y diversas

en nutrientes como la de RM podrían requerir una microbiota más diversa (Bertino-Grimaldi et al., 2013; Wang et al., 2016; Deusch et al., 2017). Además, en insectos no sociales, como *A. grandis*, la microbiota intestinal es adquirida del ambiente, por lo cual pueden llegar a ocurrir variaciones significativas entre insectos. Este tipo de variaciones fueron también observadas en otras comunidades intestinales (Boucias et al., 2013; Husseneder et al., 2010; Schauer et al., 2014; Thompson et al., 2008). Adicionalmente, estudios mediante análisis del gen ARNr 16S revelaron que los cambios en la dieta lignocelulósica no tienen impacto a corto plazo en la composición de la microbiota en insectos sociales como las termitas y cucarachas (Boucias et al., 2013; Sanyika et al., 2012; Schauer et al., 2014).

Es de destacar que el microbioma de los insectos alimentados con la dieta artificial RM resultó muy diferente al observado con el de las otras dos dietas y en el mismo predominaron bacterias del *phylum* Spirochaetes, mientras que en los microbiomas alimentados con HA y PE los *phyla* predominantes fueron Firmicutes y Proteobacteria. Se ha descrito previamente la presencia y el posible rol de las Spirochaetes en el intestino de las termitas superiores. La fermentación de la celulosa resulta en producción de hidrógeno, que es eliminado rápidamente del intestino anterior de las termitas. Esto ocurre, en parte, a través de la acetogénesis reductora realizada por diversas bacterias intestinales (Breznak & Switzer, 1986; Brune, 2007). Las especies del género *Treponema*, que dominan el intestino anterior de las termitas inferiores y superiores, parecen ser responsables de la mayor parte de la actividad acetogénica (Engel & Moran, 2013; Dietrich et al., 2014). La acetogénesis bacteriana representa aproximadamente la cuarta parte de la producción total de acetato en el intestino de las termitas y, por lo tanto, contribuye significativamente a la nutrición del huésped. Estudios metagenómicos de *Nasutitermes* y *Amitermes* spp. indicaron a Fibrobacter y Spirochaetes como miembros bacterianos potencialmente responsables de la digestión de la celulosa (Warnecke et al., 2007; He et al., 2013). Warnecke et al., (2007) reportaron además que la mayoría de los genes necesarios para una acetogénesis reductiva funcional en el intestino de *Nasutitermes* fueron asignados principalmente a las Spirochaetes.

La similitud entre los perfiles de las comunidades microbianas intestinales de las diferentes dietas se analizó mediante un ordenamiento multidimensional (NMDS)

basado en las matrices de distancia Bray-Curtis y Unifrac ponderada. La comunidad RM se encuentra claramente separada de aquellas comunidades provenientes de las dietas artificiales HA y PE. Nuestro estudio reveló variaciones significativas en cuanto a la estructura de la comunidad bacteriana de *A. grandis*, tanto entre muestras como entre grupo de réplicas biológicas provenientes de una misma dieta artificial. Dichas variaciones entre réplicas biológicas han sido descritas previamente. En efecto, Curtis & Sloan (2004) postularon que las comunidades microbianas provenientes de ambientes físicamente iguales difieren en cuanto a su composición cuando están formadas por un grupo grande y diverso de microorganismos. También se describieron variaciones similares en la microbiota intestinal de otros insectos (termitas y cucarachas), serpientes, cabras, cerdos y humanos (Bertino-Grimaldi et al., 2013; Cardoso et al., 2012; Cunha et al., 2011; Ley et al., 2006; Mikaelyan et al., 2015; Schauer et al., 2014; Thompson et al., 2008).

Si bien se identificó un pequeño número de OTUs (11) en todas las réplicas biológicas de las tres dietas artificiales éstas representaron alrededor del 27% del total de las secuencias obtenidas. Algunos autores proponen que ciertas especies hospedantes, especialmente aquellas que consumen dietas altamente variables, tienen un *core* microbiano que provee una estabilidad funcional y sustenta la homeostasis intestinal (Otani et al., 2014; Qin et al., 2010; Schauer et al., 2014; Turnbaugh et al., 2009). Estas funciones pueden ser llevadas a cabo por diferentes entidades taxonómicas. En relación a esto, algunos autores proponen la existencia de un *core* funcional y taxonómico (Qin et al., 2010; Schauer et al., 2014; Turnbaugh et al., 2009). De todas las diferentes OTUs encontradas en las réplicas biológicas de cada dieta de *A. grandis*, sólo una pequeña fracción formó parte del *core* respectivo. Sin embargo, por el momento, no podemos asegurar la importancia funcional de este *core*. En algunos insectos se ha descrito previamente, la presencia de un *core* microbiano pequeño. Por ejemplo en *Anopheles gambiae*, *Plodia interpunctella*, *Apis mellifera* y *Pachysoma* sp., *Cimex lectularius* y *Rhynchophorus* sp., y en *Blattella germanica* ha sido identificado un *core* compuesto por sólo dos, seis, nueve, diez, quince y veinticinco OTUs, respectivamente (Wang et al., 2011; Moran et al., 2012; Sabree et al., 2012; Meriweather et al., 2013; Montagna et al., 2015, 2016; Pérez-Cobas et al., 2015; Franzini et al., 2016).

Las OTUs que componen el *core* microbiano identificado en este trabajo se encuentran dentro del grupo de los géneros más abundantes hallados en el análisis (**Tabla 12; Figura 18**). *Lactococcus* sp., *Bacillus* sp., *Brevundimonas* sp. y *Corinebacterium* sp. también fueron reportado previamente como los más abundantes en el intestino del escarabajo *Rhynchoporus ferrugines* olivers (Tagliavia et al., 2014; Montagna et al., 2015).

Estas once OTUs pertenecen a familias descritas anteriormente como parte del microbioma de otros insectos. Hedin & Lindig, (1978) reportaron previamente las familias Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, Micrococcaceae en el intestino de *A. grandis*. A su vez, se aislaron del intestino de *Dendroctonus valens* y de *Helicoverpa armígera* miembros de las familias Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, Cellulomonadaceae, Paenibacillaceae, Comamonadaceae y Moraxellaceae (Gayatri Priya et al., 2012; Xu et al., 2015). Montagna et al., (2015) aislaron a partir de distintos órganos (intestino, hemolinfa, ovario, y testículo) de *Rhynchoporus ferrugineus* las familias Enterobacteriaceae, Cellulomonadaceae, Comamonadaceae, Moraxellaceae y Xanthomonadaceae. A su vez, Muhammad et al., (2017) aislaron miembros de la familia Enterobacteriaceae y Staphylococcaceae desde intestinos de *Rhynchoporus ferrugineus* Olivier. La familia Enterobacteriaceae también fue reportada en el intestino del escarabajo del estiércol del desierto *Pachysoma* y en los coleópteros *Sitophilus oryzae* L. y *Sitophilus zeamais* Mots (Campbell et al., 1992; Franzini et al., 2016). Gayatri Priya et al., (2012) aislaron a partir del intestino de la mosca de la fruta *Bactrocera tau* (Walker) bacterias de las familias Comamonadaceae y Pseudomonadaceae. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, postulamos que la comunidad bacteriana del intestino de *A. grandis* varía en respuesta a cambios en la dieta manteniendo un *core* microbiano estable, el cuál presenta variaciones simultáneas junto a otras OTUs acompañantes. Sin embargo, resta establecer si estas OTUs adicionales son comensalistas oportunistas, mutualistas simbióticos funcionalmente equivalentes o una mezcla de ambos.

En este trabajo de Tesis estuvimos particularmente interesados en estudiar el sistema celulolítico del insecto, esto es, en la identificación de los géneros bacterianos con potencial actividad celulolítica. Estos géneros podrían llegar a estar formando parte del *core* microbiano descrito o pertenecer al grupo de los géneros

más abundantes que son funcionalmente redundantes, de modo que podrían ser reemplazados por taxas alternativas. En este sentido, el microbioma intestinal es capaz de llevar a cabo todas las funciones requeridas para la degradación de la lignocelulosa, las cuales, pueden estar siendo aportadas por el *core* o por las OTUs que no forman parte del *core* microbiano. Dentro del *core* encontramos siete géneros que fueron reportados previamente como degradadores de lignocelulosa: *Acinetobacter* sp., *Delftia* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Cellulomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. El género *Acinetobacter* sp. está presente en el intestino de la termita *C. fulviceps*, tal como fue descrito en este trabajo (resultados parte II), en el intestino medio y hemolinfa de *Leptinotarsa decemlineata*, *Microcerotermes diversus* y en el intestino de la serpiente gigante Africana (*Archachatina marginata*). Las actividades celulasa, xilanasas y β -glucosidasa de este género fueron evaluadas cuantitativamente (Ekperigin, 2007; Pourramezan et al., 2012; Vilanova et al., 2012). *Delftia* sp. fue descrita previamente como miembro de comunidades celulolíticas de diversos nichos ecológicos (Juárez-Jiménez et al., 2010), incluyendo suelos (Mehnaz et al., 2010). Este género también fue aislado a partir de un suelo nativo mediante cultivo en filtro de papel (Talia et al., 2012). Algunos investigadores han reportado a *Stenotrophomonas* sp. como celulolítica (Huang et al., 2012; Pinheiro et al., 2015; Talia et al., 2012). Además, miembros del género *Micrococcus* sp. fueron aislados a partir del intestino medio del barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis* y se determinó cuantitativamente su actividad celulasa, xilanasas y β -glucosidasa (Vilanova et al., 2012). A su vez, diferentes miembros de *Staphylococcus* sp. han sido descritos como celulolíticos (Jaishree et al., 1986; Pourramezan et al., 2012; Manfredi et al., 2015; Ventorino et al., 2015). *Sphingomonas* sp. se encuentra frecuentemente en suelos forestales (Männistö and Häggblom, 2006; Talia et al., 2012) y se han reportado actividad endoglucanasa, β -glucosidasa y ligninolítica (Masai et al., 2007). Bacterias del género *Cellulomonas* sp., frecuentemente presente en el suelo (Kang et al., 2007; Kim et al., 2008; Yin et al., 2010; Talia et al., 2012), son capaces de crecer utilizando como sustrato al bagazo de caña de azúcar (Ponce-Noyola & De La Torre, 2001) y su actividad celulolítica ha sido bien caracterizada (Shen et al., 1995; Nikolova et al., 1997; Sánchez-Herrera et al., 2007; Pérez-Avalos et al., 2008; Jing et al., 2009; Maki et al., 2009; Saratale et al.,

2010). Miembros de *Pseudomona* sp. fueron descritos como celulolíticos (Huang et al., 2012; Pourramezan et al., 2012; Nandimath et al., 2016) y su actividad β -glucosidasa reportada previamente (Tarayre et al., 2014).

En este capítulo estudiamos la respuesta de la microbiota intestinal de *A. grandis* ante diferentes dietas lignocelulósicas (contenido variable de fibra y proteínas), utilizando intestinos enteros de larvas pertenecientes al tercer estadio. Observamos que las larvas alimentadas con la dieta artificial de HA presentaron la mayor actividad endoglucanasa, xilanasas y β -glucosidasa, respecto a las otras dos dietas; seguida de las larvas alimentadas con PE y finalmente con RM. Estos resultados podrían deberse a la naturaleza recalcitrante de ciertas biomasas como RM, la cual posee un alto contenido de compuestos lignocelulósicos. La mayor actividad enzimática elevada se observó a valores de pH entre 5-6, excepto para la actividad endoglucanasa donde dos valores de pH óptimos fueron 5 y 7. La temperatura óptima en todos los ensayos fue 50 °C. Los resultados obtenidos concuerdan con los de otros autores que caracterizaron la actividad celulasa en insectos y reportaron valores de pH y temperatura similares (Lee et al., 2004; Byeon et al., 2005; Wei et al., 2006b; Kim et al., 2008; Willis et al., 2011; Xia et al., 2013). Asimismo, los valores de pH óptimos observados coinciden con el pH intestinal de las larvas crecidas en las diferentes dietas artificiales: HA (pH 6,5), PE (pH 6) y RM (pH 6,5). Estudios previos evaluaron los efectos de los cambios en la dieta sobre la actividad celulolítica en el intestino de termitas y cucarachas (Geib et al., 2009; Li et al., 2013). Geib et al. (2009) estudiaron el efecto que tienen las dietas sobre el intestino de larvas del escarabajo de cuernos largos *Anoplophora glabripennis*. Ellos demostraron que las larvas alimentadas en árboles de madera resistente al insecto (*Pyrus calleryana*) no poseían actividad celulasa, mientras que las larvas que se alimentaban en un árbol de su preferencia (*Acer ssacharum*) o en uno alternativo (*Quercus palustris*) tenían una elevada actividad enzimática. Además, proponen que hay una correlación directa entre la dieta y la diversidad de la comunidad bacteriana, que es determinada por las dietas y la actividad celulolítica del intestino.

Con el objetivo de comprender de qué manera las diferentes dietas afectaron la microbiota intestinal y las actividades hidrolíticas, se estudió la composición química de las biomasas empleadas para la alimentación de las larvas de *A. grandis*.

El análisis de las distintas dietas reveló que las biomasas PE y RM presentaban una composición similar de celulosa y hemicelulosa, mientras que la dieta HA presentaba una menor concentración de los mismos. Mediante el análisis por espectroscopia FT-IR se corroboró que la dieta de RM contiene una mayor proporción de cadenas de celulosa de forma altamente organizada (cristalina) en comparación con la dieta PE, al presentar un índice de orden lateral (LOI) y de intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI) mayor (Nelson & O'Connor, 1964; Poletto et al., 2014). A su vez, el grado de lignificación fue significativamente mayor para RM respecto a PE. Estos resultados nos sugieren que la biomasa RM es más compleja estructuralmente respecto a PE, a pesar de tener una composición química parecida. En el caso de la HA, no pudieron calcularse los parámetros debido a la ausencia en el espectro de las bandas características asociada a los polímeros como celulosa, hemicelulosa y lignina. Esto podría deberse a que la HA se produce a partir de embriones de las semillas de algodón (dieta comercial llamada Pharmamedia), la cual está compuesta mayoritariamente por proteínas globulares. La composición de la pared celular de la fibra de algodón exhibe cambios continuos a lo largo del desarrollo de la misma. Se considera que el período de transición entre 16 y 21 dpa (días post antesis) representa un cambio en la síntesis de las células primarias a secundarias, produciéndose modificaciones estructurales que conducen a la formación y depósito de macromoléculas de celulosa, pectina y hemicelulosa (Tokumoto et al., 2002; Abidi et al., 2008, 2010).

Estas diferencias encontradas a través del estudio por FT-IR en las distintas dietas contribuyen a explicar las diferencias observadas en los perfiles de actividades hidrolíticas, así como en los cambios observados en la composición de la microbiota.

II.8 CONCLUSIONES

En este trabajo, mediante secuenciación masiva de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr se demostró que los cambios en la dieta tienen influencia en la composición de la comunidad microbiana presente en el intestino de *A. grandis*. Estos resultados indican que los cambios en la abundancia de la microbiota degradadora de celulosa influyen sobre la actividad celulolítica general. Además, la

información obtenida contribuye a una caracterización completa del proceso celulolítico de insectos, para identificar enzimas lignocelulolíticas eficientes, las cuales podrían ayudar a reducir el alto costo de producción industrial de bioetanol.

Parte II

Prospección y evaluación de enzimas
(hemi) celulolíticas usando biomasas sin
tratar y pretratadas en dos termitas
nativas de Argentina

Resultados: Parte II

II.1 Determinación de la composición de las biomásas: bagazo de caña de azúcar y pasto elefante

El contenido de carbohidratos en una biomasa es un factor esencial a tener en cuenta en procesos de conversión de azúcares a etanol. Para analizar la factibilidad de uso de dos biomásas comunes en Argentina y Brasil en la producción de bioteanol lignocelulósico, se evaluó la composición de carbohidratos en bagazo de *Saccharum officinarum* (bagazo de caña de azúcar, BCA) y *Pennisetum purpureum* (pasto elefante, PE) (Tabla II1). La fracciones celulósicas y hemicelulósicas se analizaron antes y luego del pretratamiento con H₂SO₄ diluido para evaluar cambios en la composición de monosacáridos (Tabla II1). En ambas biomásas no tratadas no se observaron diferencias significativas entre los constituyentes principales de la fracción hemicelulósica: xilano, arabinano y derivados de acetilo. Sin embargo, BCA presentó mayor contenido de xilano (Tabla II1). Por otro lado, las biomásas pretratadas (BCA-P y PE-P) presentaron una reducción significativa en la fracción de hemicelulosa y un aumento en el contenido de lignina y glucanos. Además, la aplicación del test t de Student indicó que el contenido de los compuestos principales de las biomásas pretratadas y no pretratadas era significativamente diferente con un nivel de confianza del 95%. Estos resultados indicaron que el pretratamiento de las biomásas con ácido diluido eliminó parte de la fracción de hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar y pasto elefante (Tabla II1).

Tabla II1. Composición porcentual de las biomásas sin tratar y pretratadas (-P) bagazo de caña de azúcar (BCA) y pasto elefante (PE)*

Muestra	Cenizas	Proteínas estructurales	Extractivo total	Lignina Total	Glucano	Xilano	Arabinosa	Acetilo	Total
BCA	0,62 (± 0,45) ^a	0,20 (± 0,04) ^a	6,09 (± 0,28)	26,49 (± 0,34) ^a	35,50 (± 3,28) ^a	15,27 (± 1,00) ^a	1,56 (± 0,05) ^a	5,64 (± 0,31) ^a	91,37
BCA-P	0,74 (± 0,00) ^a	0,27 (± 0,16) ^a	-	32,66 (± 1,03) ^b	48,97 (± 1,21) ^b	8,74 (± 0,22) ^b	0,73 (± 0,02) ^b	2,15 (± 0,03) ^b	94,25
PE	1,95 (± 0,02) ^A	0,42 (± 0,02) ^A	11,70 (± 0,06)	25,19 (± 0,06) ^A	33,87 (± 1,31) ^A	11,98 (± 0,41) ^A	1,57 (± 0,03) ^A	4,01 (± 0,11) ^A	90,69
PE-P	2,21 (± 0,02) ^A	0,53 (± 0,01) ^B	-	31,66 (± 0,91) ^B	49,61 (± 1,31) ^B	8,17 (± 0,28) ^B	0,65 (± 0,03) ^B	2,10 (± 0,07) ^B	94,92

* Valores con la misma letra (minúscula o mayúscula) en una misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

II.1.1 Caracterización por Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)

En paralelo, se estudió mediante espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) el efecto del pretratamiento con H_2SO_4 diluido sobre las biomásas antes y luego del mismo. Utilizando los datos del espectro FT-IR se calcularon diferentes relaciones para la caracterización de materiales lignocelulósicos (**Figura A1**). El índice de orden lateral (LOI) y la intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI) se utilizaron como parámetros para calcular la cristalinidad de la celulosa en las muestras. El grado de lignificación como la relación Siringilo/Guaiacilo (S/G), lignina/carbohidratos (L/C) y carbonilo/carbohidratos (C/C) se muestran en la **Tabla II2**.

Para BCA, los valores de LOI aumentaron significativamente luego del pretratamiento ($P < 0,05$), sugiriendo una estructura más ordenada de la celulosa en esta biomasa, mientras que no se observaron diferencias significativas para el índice HBI. Por otro lado, el grado de lignificación aumentó significativamente ($P < 0,05$) para esta biomasa luego del pretratamiento, indicando un enriquecimiento en lignina. Las relaciones S/G, L/C y C/C no presentaron variaciones significativas luego del pretratamiento. En cambio para PE no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados (**Tabla II2**).

Tabla II2. Relación obtenida entre la intensidad de absorbancia del número de onda designado a los polímeros*.

		Muestras			
		BCA	BCA-P	PE	PE-P
LOI	I1429/I898	1,61±0,38 ^a	3,30±0,02 ^b	1,81±0,37 ^a	2,14±0,58 ^a
HBI	I3400/I1320	1,10±0,21 ^a	1,55±0,35 ^a	0,95±0,13 ^a	1,11±0,32 ^a
° Lignificación	I1510/I895	1,10±0,16 ^a	2,25±0,06 ^b	1,37±0,19 ^a	1,40±0,41 ^a
Relación S/G	I1327/I1271	0,88±0,13 ^a	0,92±0,18 ^a	0,94±0,09 ^a	0,89±0,09 ^a
Relación L/C	I1510/I1164	0,42±0,05 ^a	0,35±0,05 ^a	0,45±0,05 ^a	0,35±0,05 ^a
	I1510/I1738	0,97±0,07	2,10	1,40±0,13 ^a	1,7±0,61 ^a
Relación C/C	I1732/I1373	0,58±0,1 ^a	0,37±0,15 ^a	0,50±0,03	0,35
	I1738/I1161	0,40±0,01 ^a	0,27±0,15 ^a	0,32±0,07 ^a	0,23±0,11 ^a

* I1510/I1164: relación lignina-holocelulosa; I1510/I898: relación lignina-celulosa; I1510/I1373: relación lignina-celulosa y hemicelulosa, I1510/I1738: relación lignina-xilano (hemicelulosa).

Valores con la misma letra en una misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

II.2 Efecto del pretratamiento y sacarificación sobre la morfología del bagazo de caña de azúcar y pasto elefante

Para verificar si el pretratamiento mejoró la digestibilidad enzimática, se evaluaron los cambios morfológicos producidos por el pretratamiento con ácido diluido sobre la estructura de las dos biomásas seleccionadas, mediante microscopía electrónica de barrido (**Figura II1**). A su vez, las biomásas BCA y PE pretratadas se cultivaron con los extractos de intestino (EI) de *Nasutitermes aquilinus* (NA) y *Cortaritermes fulviceps* (CF) para evaluar la acción de las enzimas hidrolíticas producidas durante el cultivo.

En la superficie del BCA no tratado se observó una capa de cobertura continua, probablemente compuesta por hemicelulosa y lignina (**Figura II1A**). Por el contrario, luego del pretratamiento con ácido diluido se observó una menor cohesión entre las fibras y los haces de celulosa se hicieron más evidentes (**Figura II1B**). Esto podría deberse al tipo de pretratamiento utilizado, ya que el ácido diluido eliminó parte de la fracción de hemicelulosa como se describió anteriormente. Asimismo, luego de la acción de las enzimas hidrolíticas (tanto endógenas como de la microbiota) presentes en el intestino de ambas especies de termitas, se observó una mayor rotura y separación en las fibras de BCA (**Figura II1C y II1D**). En el caso del PE, los efectos del pretratamiento fueron más débiles y los haces se evidenciaron solo en algunas regiones de la superficie de las muestras (**Figura II1E y II1F**). Luego de la exposición a las enzimas hidrolíticas del intestino de ambas termitas, las muestras de PE también mostraron menor degradación en comparación con las de BCA (**Figura II1G y II1H**).

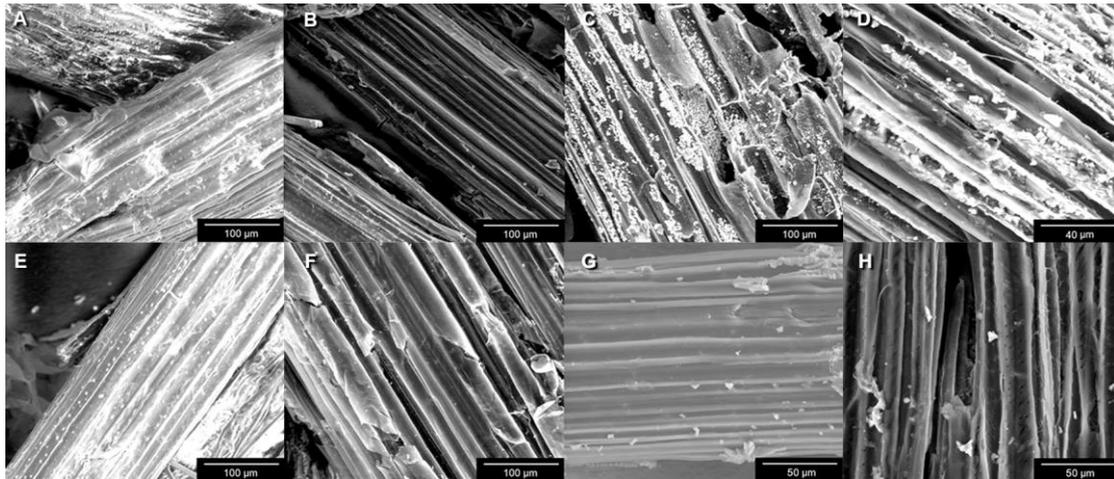


Figura II.1. Microscopía electrónica de barrido. (A) Bagazo de caña de azúcar no tratado (800X). **(B)** Bagazo de caña de azúcar pretratado (800X). **(C)** Bagazo de caña de azúcar pretratado – *N. aquilinus* (800X). **(D)** Bagazo de caña de azúcar pretratado – *C. fulviceps* (800X). **(E)** Pasto elefante no tratado (800X). **(F)** Pasto elefante pretratado (800X). **(G)** Pasto elefante pretratado – *N. aquilinus* (800X). **(H)** Pasto elefante pretratado – *C. fulviceps* (800X).

II.3 Actividades (hemi) celulolíticas de *Nasutitermes aquilinus* y *Cortaritermes fulviceps*

La actividad (hemi) celulolítica (endoglucanasa y xilanasas) se evaluó tanto en extractos de intestinos (EI) de ambas termitas como en sobrenadantes libres de células (SN) de cultivos de EI en medio mínimo (MM) conteniendo: CMC, xilano, BCA y PE, como única fuente de carbono. En todas las condiciones ensayadas se observó crecimiento bacteriano, indicando la presencia de microorganismos expresando las enzimas necesarias para digerir los sustratos lignocelulósicos.

II.3.1 Evaluación enzimática cualitativa

La actividad endoglucanasa y xilanasas se evidenció, en todos los tratamientos, por la formación de un halo de hidrólisis alrededor de la gota de muestra, indicando la degradación del sustrato CMC y xilano, respectivamente (**Figura II.2**). Con respecto a la hidrólisis de CMC, el EI y SN-CMC de cultivos de *N. aquilinus* mostraron una capacidad de hidrólisis mayor respecto a los de *C. fulviceps* (**Figura II.2A-II.2D**). Sin embargo, en el SN de cultivo de bagazo de caña de azúcar (SN-BCA) se detectó un halo de degradación similar para ambas termitas (**Figura II.2E y II.2G**). Por el contrario, el sobrenadante de cultivo de pasto elefante (SN-PE) de *C. fulviceps* exhibió un halo de degradación mayor que SN-PE de *N. aquilinus* (**Figura II.2F y II.2H**). Asimismo, la actividad xilanasas de SN de cultivos de ambas biomasas

(SN-PE y SN-BCA) resultó en halos de degradación similares, independientemente de la especie de termita estudiada (**Figura II2I-II2L**).

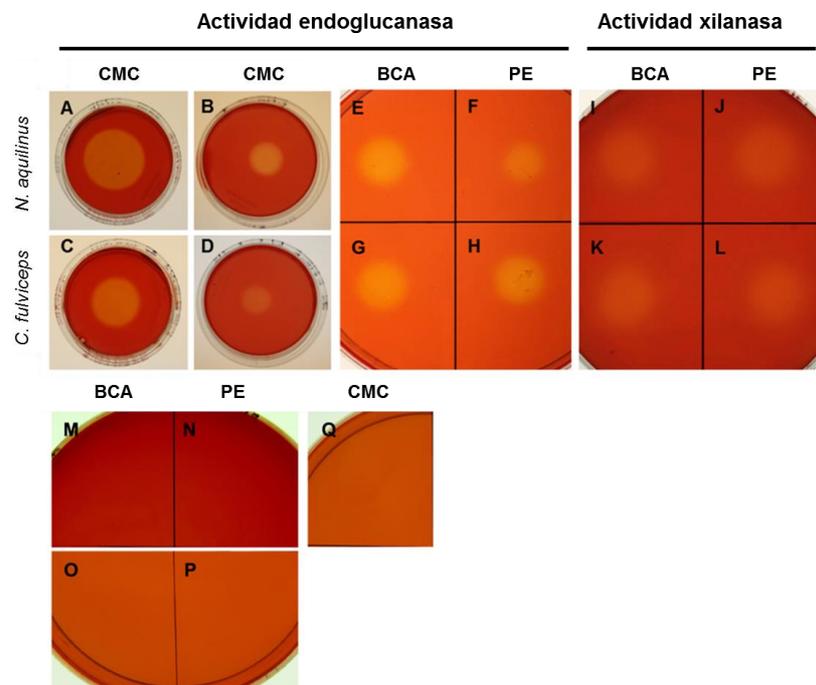


Figura II2. Ensayo cualitativo de actividad endoglucanasa (A-H) y xilanasa (I-Q). Actividad endoglucanasa: (A) EI-*N. aquilinus*. **(B)** SN-CMC de cultivos de *N. aquilinus*. **(C)** EI-*C. fulviceps*. **(D)** SN-CMC de cultivos de *C. fulviceps*. **(E)** SN-BCA de cultivos de *N. aquilinus*. **(F)** SN-PE de cultivos de *N. aquilinus*. **(G)** SN-BCA de cultivos de *C. fulviceps*. **(H)** SN-PE de cultivos de *C. fulviceps*. **Actividad xilanasa: (I)** SN-BCA de cultivos de *N. aquilinus*. **(J)** SN-PE de cultivos de *N. aquilinus*. **(K)** SN-BCA de cultivos de *C. fulviceps*. **(L)** SN-PE de cultivos de *C. fulviceps*. **(M)** Control negativo de MM-BCA en placas de CMC. **(N)** Control negativo de MM-PE en placas de CMC. **(O)** Control negativo de MM-BCA en placas de Xilano. **(P)** Control negativo de MM-PE en placas de Xilano. **(Q)** Control negativo de MM-CMC en placas de CMC.

II.3.2 Evaluación enzimática cuantitativa

Las actividades β -1,4-endoglucanasa y β -xilanasa se determinaron cuantitativamente a partir de los sobrenadantes de cultivo libres de células (SN) crecidos en MM con el agregado como sustrato de: CMC, xilano, BCA o PE, ambas biomásas pretratadas con ácido sulfúrico y sin pretratamiento, como única fuente de carbono, usando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (**Figura II2**).

La actividad endoglucanasa resultó máxima en el SN de cultivo de bagazo de caña de azúcar pretratado de *N. aquilinus* MM-BCA-P ($14,7 \pm 0,55$ UI/mg) al ser comparado con el resto de los tratamientos. En cambio, los SN de cultivo de *C. fulviceps*, presentaron una actividad endoglucanasa máxima usando las biomásas

pretratadas PE-P y BCA-P, pero no se detectaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Además, no se detectó actividad endoglucanasa en los SN de cultivo de pasto elefante no tratado de *C. fulviceps* (Figura II3A).

Con respecto a la actividad xilanasa, los SN de cultivo de *N. aquilinus* mostraron una actividad significativamente mayor para los SN de cultivos de BCA pretratado BCA-P ($5,91 \pm 0,68$ UI/mg) en comparación con los otros tratamientos, mientras que *C. fulviceps* exhibió la mayor actividad xilanasa en SN de cultivo de PE pretratado PE-P ($11,7 \pm 0,16$ UI/mg) (Figura II3B). Como era de esperar, el uso de biomasa pretratada mejoró significativamente la actividad enzimática en todas las condiciones de cultivo ensayadas.

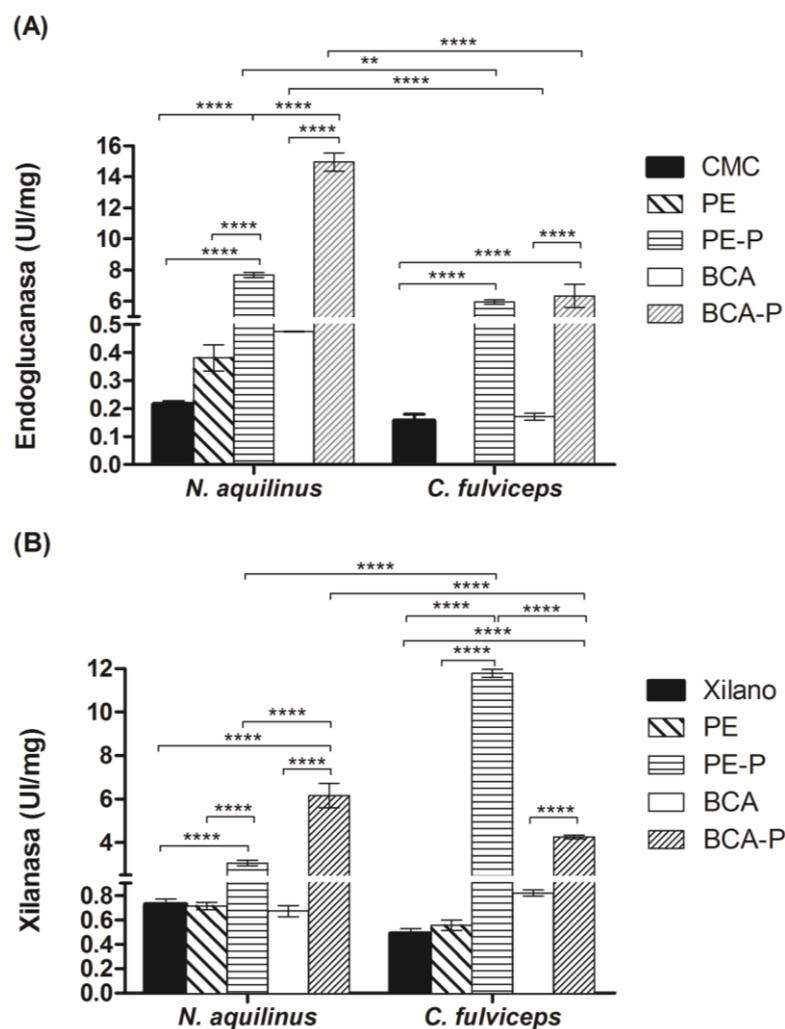


Figura II3. Actividad enzimática en sobrenadantes libres de células. (A) Endoglucanasa. (B) Xilanasa. Cada barra en los gráficos representa el promedio \pm desvío estándar ($n=3$) de UI de actividad enzimática/mg de extracto. Se aplicó un Análisis de Varianza de Dos Vías (ANOVA) seguido del Test de Tukey (**** $P<0,0001$; ** $P<0,01$) (GraphPad Prism 6).

II.4 Identificación de celulasas y hemicelulasas del intestino *Nasutitermes aquilinus* y *Cotaritermes fulviceps*

Para identificar las celulasas y hemicelulasas del intestino de *N. aquilinus* y *C. fulviceps*, se analizaron por zimografía el EI y SN de cultivos de ambas termitas, usando como sustrato CMC y xilano, respectivamente. En los zimogramas de EI sobre CMC se pudo observar la presencia de al menos una banda con actividad endoglucanasa por cada especie de termita, con pesos moleculares de 45 kDa y 40 kDa para *N. aquilinus* y *C. fulviceps*, respectivamente (**Figura II4A, calle 1 y 2**). En el caso del zimograma correspondiente al SN de cultivo en MM-CMC de *N. aquilinus*, se observaron seis bandas relevantes (entre 45 y 130 kDa) con actividad endoglucanasa (**Figura II4A, calle 3**). Por otro lado, cuando se utilizó xilano como sustrato para la zimografía, se detectaron varias bandas de proteínas distintas con actividad xilanolítica en el SN de cultivos de endosimbiontes provenientes de *N. aquilinus* cultivados en MM-PE no tratado (**Figura II4B**). Sin embargo, no se observó actividad hidrolítica en el SN de cultivos bacterianos de *C. fulviceps* cultivados en MM-CMC, MM-xilano y MM-BCA no tratado (datos no mostrados).

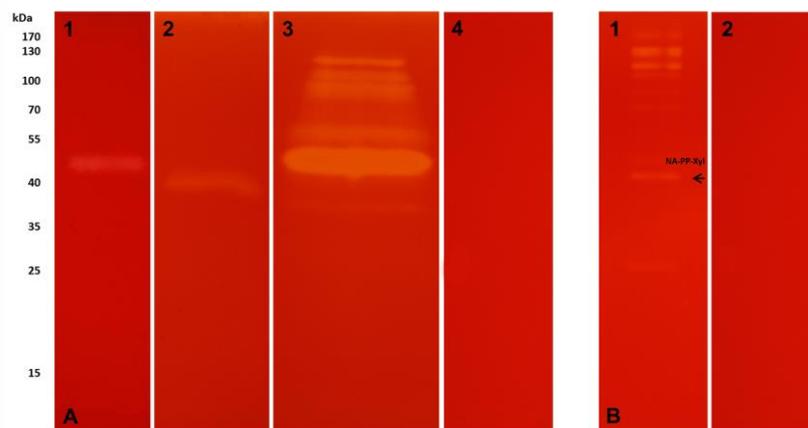


Figura II4. Zimograma. (A) SDS-PAGE-CMC. Calle 1 EI *C. fulviceps*; Calle 2 EI *N. aquilinus*; Calle 3 SN-CMC *N. aquilinus*; Calle 4 control negativo, medio CMC. **(B) SDS-PAGE-Xilano.** Calle 1 SN-PE *N. aquilinus*. La flecha indica la banda escindida para el análisis por espectrometría de masas (MALDI/TOF-TOF) descrita en la Tabla I3.

Paralelamente a los zimogramas, se separaron las proteínas de los SN de MM-CMC y de los EI por electroforesis monodimensional, se tiñeron tanto con *Coomasie blue* como con tinción de plata y se cortaron bandas de cada muestra, correspondientes a diferentes rangos de peso molecular en los cuales se había

observado actividad y se analizaron por espectrometría de masa (**Figura II5**). Un total de 27 bandas predominantes fueron seleccionadas y escindidas para la posterior identificación proteica por espectrometría de masas.

Adicionalmente se realizó la separación de las proteínas provenientes del SN de cultivo MM-CMC de *N. aquilinus* mediante electroforesis en un gel de dos dimensiones (**Figura II6**). Ocho *spots* predominantes fueron seleccionados y escindidos para la posterior identificación proteica por espectrometría de masas.

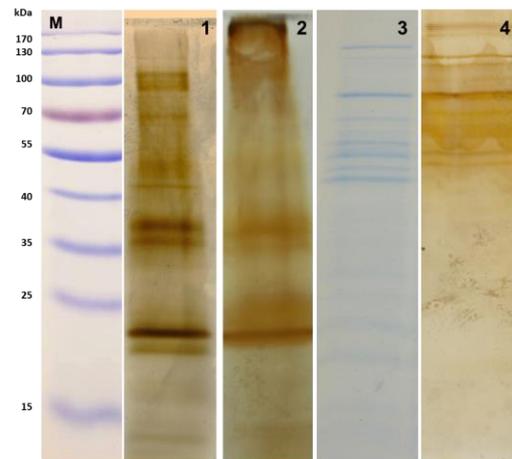


Figura II5. Gel monodimensional de los EI y del secretoma bacteriano de *N. aquilinus* cultivado en MM-CMC. Calle 1 EI *C. fulviceps*; Calle 2 EI *N. aquilinus*; Calle 3 SN-CMC *N. aquilinus* teñido con *coomassie blue* coloidal; Calle 4 SN-CMC *N. aquilinus* teñido con plata. M: marcado de peso molecular. Las 27 bandas de mayor intensidad fueron escindidas para el análisis por espectroscopía de masas (MALDI/TOF-TOF).

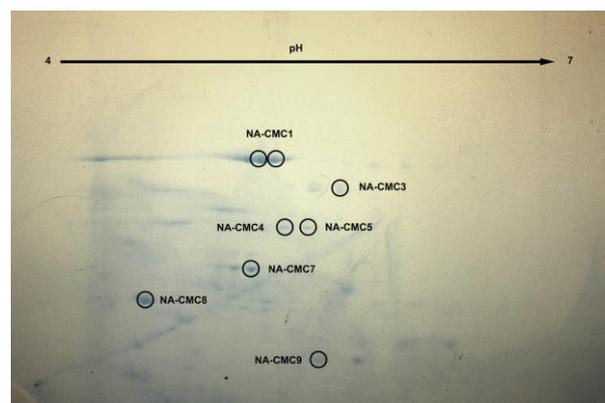


Figura II6. Gel bidimensional del secretoma bacteriano de *N. aquilinus* cultivado en MM-CMC. Se indican los diferentes *spots* que fueron escindidos para el análisis por espectrometría de masas (MALDI/TOF-TOF).

II.5 Diversidad bacteriana en cultivos de *Nasutitermes aquilinus* y *Cortaritermes fulviceps*

La diversidad bacteriana intestinal cultivable en MM-CMC de *N. aquilinus* y *C. fulviceps* se estudió mediante el análisis de la secuencia casi completa del gen ARNr 16S.

Dicho gen se amplificó, clonó y secuenció creando las bibliotecas CMC-NA (*N. aquilinus*) y CMC-CF (*C. fulviceps*). La clasificación taxonómica bacteriana y abundancia relativa encontrada en las bibliotecas de clones se encuentra representada en la **Figura II7**. Las bacterias identificadas pertenecen a los *phylum* Firmicutes y Proteobacteria (alfa, delta y gamma-proteobacteria).

En los cultivos de *N. aquilinus*, el género bacteriano predominante fue *Cohnella* (67% de los clones secuenciados), seguido de *Klebsiella* (28%) y *Burkholderia* (5%). Mientras que en cultivos de *C. fulviceps* predominaron mayoritariamente los *Paenibacillus* (94%) seguido en menor proporción de *Acinetobacter* (4%) y *Roseomonas* (2%).

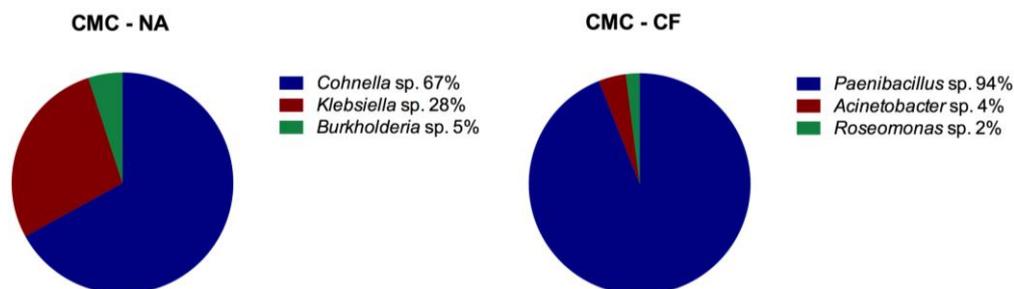


Figura II7. Diversidad bacteriana analizada por el gen 16S ARNr. (A) Cultivos MM-CM de *N. aquilinus*. **(B)** Cultivos MM-CMC de *C. fulviceps*.

II.5.1 Curvas de rarefacción

Con el propósito de determinar si el tamaño muestral fue representativo del total en cada una de las bibliotecas antes mencionadas, se calcularon las curvas de rarefacción al 97%, 95%, 90% y 80% de similitud. En total se analizaron 35 secuencias correspondientes a la biblioteca CMC-NA y 52 secuencias de la biblioteca CMC-CF. Las curvas de rarefacción alcanzaron el *plateau* al 95% de similitud de secuencia en ambas bibliotecas de clones. Este análisis indicó que el número de clones secuenciados de cada biblioteca fue suficiente para representar la diversidad bacteriana presente en las muestras examinadas (**Figura II8**).

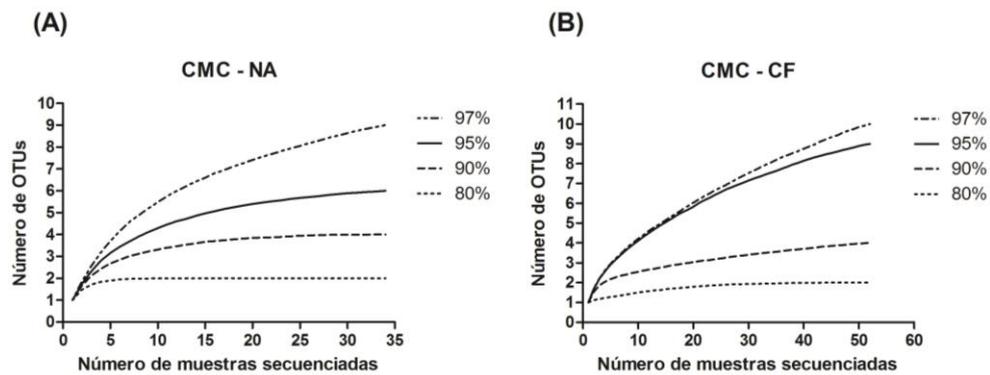


Figura II8. Curvas de rarefacción de las comunidades bacterianas cultivables de termitas en MM-CMC. (A) Biblioteca CMC-NA. (B) Biblioteca CMC-NA.

II.5.2 Estimación de la riqueza y diversidad

La biblioteca de clones correspondiente a CMC-CF presentó una riqueza significativamente mayor con respecto a CMC-NA para los índices estimados (Chao1 y ACE). La diversidad, medida como la inversa de Simpson también fue mayor en esta biblioteca en comparación con la biblioteca CMC-NA (Tabla II3).

La β -diversidad se estimó en base a la comparación de las comunidades a través de las dos bibliotecas de clones utilizando el algoritmo de LIBSHUFF, el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre ellas ($P < 0,0001$).

Tabla II3. Índices de riqueza y diversidad calculados a partir de bibliotecas de clones del gen ARNr 16S.

Muestra	N° de secuencias	N° de OTUs	Índices de Riqueza		Índices de diversidad	
			Chao1	ACE	Shannon	Simpson
CMC-NA	34	9	10 (0,1±19,7)	11,7 (9,46±25,8)	1,9 (1,62±2,2)	0,16 (0,09±0,22)
CMC-CF	52	10	13,3 (10,5±32,1)	17,7 (11,4±52)	1,5 (1,2±1,8)	0,32 (0,21±0,43)

^aLos índices de riqueza y diversidad se estimaron en base a diferencias del 3% en la secuencia nucleotídica. Los valores entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza al 97% calculado con el programa Mothur (Schloss et al., 2009).

II.5.3 Análisis filogenético

Un total de 10 secuencias representativas obtenidas de cada biblioteca de clones, CMC-NA y CMC-CF y 29 secuencias de referencia adicionales se utilizaron para construir una matriz y un dendograma (Figura II9).

El análisis filogenético reveló dos grandes *cluster*, correspondientes al *phylum* Firmicutes y Proteobacteria. Dentro de Firmicutes se identificaron los géneros *Paenibacillus* y *Cohnella*, pertenecientes a la familia Paenibacillaceae. Miembros de

Paenibacillus solo se encontraron en la biblioteca correspondiente a los cultivos MM-CMC de *N. aquilinus*, mientras que los del género *Cohnella* solo en la biblioteca de los cultivos de MM-CMC de *C. fulviceps*. En cuanto a los miembros del phylum Proteobacteria se subdividieron en tres grupos: Alfabroteobacteria, Betaproteobacteria y Gamaproteobacteria representados por *Roseomonas*, *Burkholderia*, y *Klebsiella* y *Acinetobacter*, respectivamente. A su vez, para el caso de Proteobacteria, cada género encontrado se asoció a una sola especie de termita (Figura II9, Tabla AII1).

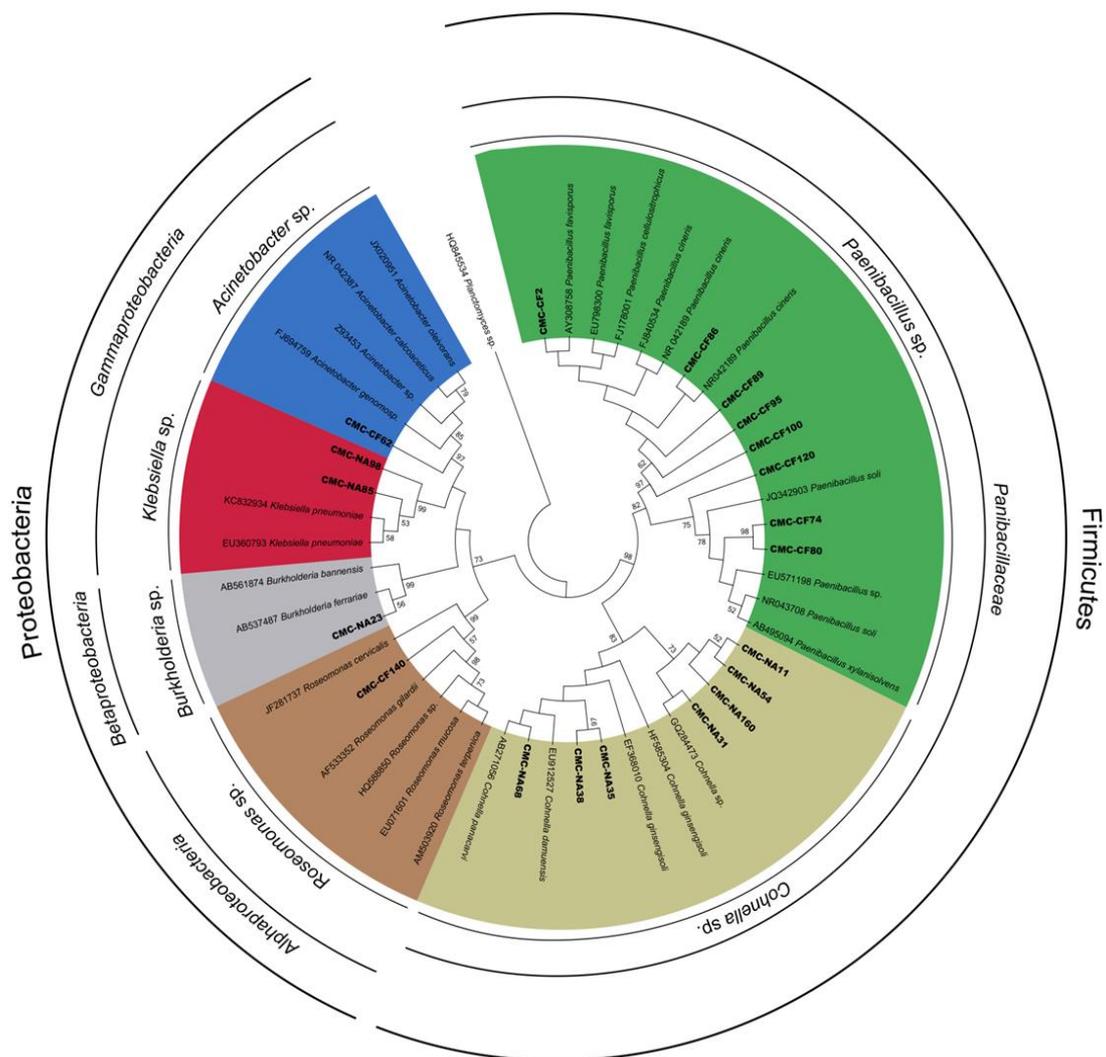


Figura II9. Análisis filogenético de las bacterias cultivables crecidas en MM-CMC de *N. aquilinus* y *C. fulviceps* en base al gen ARNr 16S. La historia evolutiva fue inferida usando el método de *Maximum Likelihood*, con análisis de Tamura-Nei (MEGA6). El porcentaje de árboles en los cuales los diferentes taxones agrupan juntos se determinó a partir de un test de *bootstrap* de 1.000 réplicas y se muestran en cada rama (mayores al 50%).

II.6 Identificación de proteínas del secretoma bacteriano involucrado en la hidrólisis de carboximetilcelulosa

Mediante análisis por espectrometría de masas (MALDI/TOF-TOF) se identificaron las secuencias peptídicas correspondientes a los *spots* y bandas obtenidos mediante electroforesis mono y bidimensional, en base a los miembros del consorcio involucrados en la actividad hidrolítica de ambas termitas. Las bandas que presentaron actividad endoglucanasa y/o xilanasas (tal como se observó en el zimograma) (**Figura II4, calles A1, A2, A3 y B1**) y un total de 8 *spots* provenientes del secretoma de *N. aquilinus* cultivado en MM-CMC (**Figura II6**) se escindieron de los geles teñidos con *coomasie* coloidal y plata (**Figura II5**) y secuenciaron por medio de espectrometría de masas. Siete de los 8 *spots* pudieron identificarse por este método. Sin embargo, las bandas escindidas de los geles en una dimensión no pudieron ser identificados con éxito por secuenciación de *novio* debido a que se obtuvieron secuencias peptídicas cortas (**Tabla AII2**).

La identificación de las proteínas de cada muestra se realizó en una primera instancia por comparación entre las secuencias peptídicas y las secuencias depositadas en bases de datos BLASTP de NCBI. Debido a que los resultados obtenidos en este primer estudio no fueron concluyentes, se decidió utilizar las bases de datos específicas de Uniprot, correspondientes a los géneros presentes en *N. aquilinus* (*Cohnella*, *Klebsiella* y *Burkholderia*).

Cuando se utilizó la base de datos Uniprot específica para el género *Cohnella*, varios *spots* del secretoma de *N. aquilinus* cultivables en MM-CMC (**Figura II6**) mostraron coincidencias significativas con xilanasas y lipasas (**Tabla II4**). Sin embargo cuando se utilizó la base de datos específica para los géneros *Klebsiella* y *Burkholderia*, los péptidos identificados correspondían a proteínas con otras funciones tales como, regulación transcripcional, secreción, activación de la división celular o bien con dominios no caracterizados.

Las bandas o *spots* analizado con su correspondiente número de acceso y porcentaje de cobertura de los péptidos identificados y la base de datos específica utilizada se detallan en la **Tabla II4**. Además, se incluyeron los mejores resultados obtenidos empleando la base de datos BLASTP de NCBI.

Tabla II4. Identificación de proteínas del secretoma de cultivo en CMC de *N. aquilinus*, mediante espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF.

Número de banda/spot	Nombre proteína/Descripción	Especies	Best protein accession	PM Teórico (Da)	# Peptidos	Péptidos Matches*	Cobertura Secuencia (%)	Hit (Num. de acceso NCBI)	Score	E- value
NA-CMC1	Intracellular GH10 xylanase ^a	<i>Cohnella laeviribosi</i>	D5KTJ5_COHLA	39,477	4	R.LAGFAREHGMKMR.G R.HFNCITAENEMK.F K.ALLYARLK.A R.EHGMKMR.G	9	ADE08352.1	46.4	9e-05
	Uncharacterized protein ^b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	V3RIZ5_KLEPN	91,663	19	R.DYALSQIQEAFEAVDPRFFHLFED EASVR.D R.AYGVTTMMGSLGEVVS RAPDLR.S R.YGGGALASMLGPVAGLVDDVVK.L	26	KDI84599.1	120	4e-30
	HlyD family secretion protein ^c	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Q2T5R2_BURTA	51780	15	R.DEALLAAARNNDVALAVAGVAAA QAKR.K R.IRLGEPADVVRTDAYPSAVYR.G R.KVIASLRPTSPRVPTMPNPR.R	31	YP_439487.1	52.4	2e-06
NA-CMC3	Lipase 3646 ^a	<i>Cohnella</i> sp.	K7W8S6_9BACL	29,660	3	R.GTSSADWVSDALAYQIR.Y R.LEADNPGFCPVRTTGK.N R.LLAAYTFGAPR.T	16	AFW99795.1	67.2	2e-11
	Transcriptional regulator ^b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	J2E8D0_KLEPN	9,871	10	R.MTAQGMQPK.S R.RNAEAKLYSK.I K.IIRMTAQGMQPKSIAR.I R.MTAQGMQPKSIARIENCSVK.T	63	WP_004147260.1	97.1	1e-24
	Uncharacterized protein ^c	<i>Burkholderia ambifaria</i>	B1T363_9BURK	17,145	8	K.VIASLRPTSPRVPTMPNPR.R R.KVIASLRPTSPRVPTMPNPR.R R.IRLGEPADVVRTDAYPSAVYR.G R.DEALLAAARNNDVALAVAGVAAA QAKR.K	30	WP_006758180.1	81.7	2e-16
NA-CMC4	Intracellular GH10 xylanase ^a	<i>Cohnella laeviribosi</i>	D5KTJ5_COHLA	39,477	2	K.ALLYARLK.A R.LAGFAREHGMKMR.G	6	ADE08352.1	52.4	1e-06
	Uncharacterized protein ^b	<i>Klebsiella oxytoca</i>	H3MTZ9_KLEOX	21,771	6	R.MFAPTLSVAQSQQK.L K.SMQVTWLPQQPEQKAAKAK.A	28	WP_004868981.1	67.7	1e-11
	Uncharacterized protein ^c	<i>Burkholderia</i> sp.	V5YPK5_9BURK	51,688	8	K.AGHPVTPVWLDNDRLK.L K.EICGGMSGRLYMIGQGRGLGR.V R.VFNTYRPEVTMRDVLNDR.R R.ETAALENWLDASHGKENS PR.H R.GDAGEPAVPLRGCALRR.R K.RGDAGEPAVPLRGCALRR.R	19	WP_023842793.1	88.2	3e-19
NA-CMC5	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase ^b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	W0YD74_KLEPN	16,032	2	R.GDAGEPAVPLRGCALRR.R K.RGDAGEPAVPLRGCALRR.R	12	CDI25518.1	61.7	1e-09

	Putative uncharacterized protein ^c	<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	E5AQI7_BURRH	6,783	2	R.SWRAVCVAGFCAVRR.G R.RSWRAVCVAGFCAVR.R	25	WP_013435098.1	56.2	2e-08
NA-CMC7	Intracellular GH10 xylanase ^a	<i>Cohnella laeviribosi</i>	D5KTJ5_COHLA	39,477	1	R.LAGFAREHGMKMR.G	6	ADE08352.1	52.4	1e-06
	Uncharacterized protein ^b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	W0XIF7_KLEPN	8,345	5	MVEVSLMLLNQTAMSK.V R.VYHRHYCHTILSEGAIIR.A	57	WP_004192382.1	64.3	1e-11
	Uncharacterized protein ^c	<i>Burkholderia</i> sp.	U2FAW4_9BURK	5044	3	MVRFVIVVVEEGIRR.V R.RGTVGLLNAVGMRSRDYSGWR.R R.GTVGLLNAVGMRSRDYSGWR.R	81	WP_021163473.1	70.6	9e-14
NA-CMC8	N-acetylglucosaminyltransferase ^a	<i>Paenibacillus</i> sp.	G3AD32_9BACL	22,529	1	R.GRPSDFGEDR.H	5	CCA94529.1	42.2	0.002
	Uncharacterized protein ^b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	J2APE0_KLEPN	3,239	4	M.DQQVAHAIPR.A MDQQVAHAIPRASK.S K.STTTSPLVGNDWQLST	100	WP_004152911.1	98.2	5e-24
	Uncharacterized protein ^c	<i>Burkholderia mallei</i>	Q62AV4_BURMA	25,352	8	R.CGGHPVAPPPDMVR.R R.LAVFRSDDFDREPR.R R.RCGGHPVAPPPDMVRR.R R.CGGHPVAPPPDMVRRR.S	23	WP_020850392.1	60.0	3e-09
NA-CMC9	MASE2 domain/diguanylate cyclase ^b	<i>Klebsiella oxytoca</i>	K6JIX7_KLEOX	40,555	6	R.ELLEMQUALMDPGLDLPNRR.F R.RELLEMQUALMDPGLDLPNR.R K.NSIIIEWIKEADEMLYQVK.R R.RELLEMQUALMDPGLDLPNRR.F K.RRELLEMQUALMDPGLDLPNR.R	11	WP_004136836.1	73.2	2e-13
	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase ^c	<i>Burkholderia cepacia</i>	J7JC15_BURCE	15,080	5	R.AMVRDPWGNTWQIATHRR.D R.RAMVRDPWGNTWQIATHRR.R R.DAMPAFLYVYVENADSTYR.R	38	WP_014900262.1	55.4	8e-08
NA-PP-Xyl	Lipase 3646 ^a	<i>Cohnella</i> sp.	K7W8S6_9BACL	29,660	1	R.GTSSTADWVSDALAYQIR.Y	6	AFW99795.1	67.2	2e-11
	Cell division activator Ceda ^b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Z5PJM2_KLEPN	12,647	7	R.IGGEGATNGATIGYDR.G M.RIGGEGATNGATIGYDR.G R.GFCFPLCLVNPVFMKPLR.Q R.SPAFSVPESAQRWANQVRQEGEIEA.	64	AIK79843.1	86.3	5e-19
	Enoyl-CoA hydratase ^c	<i>Burkholderia</i> sp.	I2DQA9_9BURK	26,952	9	M.AEIQVERADGVITITIAAAK.K K.LLLGEPFDALEAHRIGIVNRR K.ALLKDTGGVAVARMAEAAHFS AMLR.A	36	WP_014723615.1	80.5	4e-17

^a Base de datos *Cohnella* (Uniprot). ^b Base de datos *Klebsiella* (Uniprot). ^c Base de datos *Burkholderia* (Uniprot). * Solo se agregaron las secuencias peptídicas más largas

II.7 Discusión

El bagazo de *Saccharum officinarum* cuyo nombre común es bagazo de caña de azúcar (BCA) y *Pennisetum purpureum*, también conocido como pasto elefante (PE), se encuentran entre las biomásas más prometedoras para la producción de biocombustibles en Argentina y Brasil (Ferreira-Leitao et al., 2010; Lima et al., 2014; Ohimain et al., 2014; Pereira et al., 2015). Es por ello que en este trabajo planteamos como uno de los objetivos la evaluación y caracterización de ambas biomásas, antes y después del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, y luego de la hidrólisis con enzimas hidrolíticas presentes en el digestoma de las termitas nativas *N. aquilinus* y *C. fulviceps*.

La eficiencia de conversión de la biomasa lignocelulósica en azúcares reductores totales depende del tipo de biomasa seleccionada y la técnica de pretratamiento empleada. Un pretratamiento ideal de la biomasa debería ser aquel capaz de reducir la recalcitrancia del sustrato a la hidrólisis enzimática, evitar la degradación del azúcar y la formación de inhibidores de la fermentación. El pretratamiento con ácido diluido es uno de los métodos más establecidos y proporciona una menor degradación de los azúcares y la aparición de inhibidores como 5-(hidroximetil)furfural o furfural, pero este proceso requiere de mayor tiempo y temperatura para aumentar la velocidad de reacción de la liberación de azúcar respecto a al utilización de ácido concentrado. El pretratamiento con ácido diluido despolimeriza principalmente la hemicelulosa, mejorando la digestibilidad de la celulosa durante la posterior hidrólisis enzimática. Se han evaluado diferentes ácidos como el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico, el ácido nítrico y el ácido clorhídrico, entre otros, pero el ácido sulfúrico es el más comúnmente utilizado para el pretratamiento de la biomasa (Lenihan et al., 2010; Lucena et al., 2011). En este trabajo de Tesis, mediante el análisis de la composición química de las biomásas, se observó que la fracción correspondiente a la hemicelulosa (xilano, arabinano y derivados de acetilos) se eliminó parcialmente luego del pretratamiento con ácido diluido. Asimismo, el enriquecimiento observado en la fracción de celulosa (glucano) y lignina podría ser una consecuencia directa de la eliminación de hemicelulosa. Estos resultados demuestran que el pretratamiento con ácido diluido fue eficiente

en la remoción parcial de la hemicelulosa de ambas biomásas y coincide con lo reportado previamente por Lima et al., (2014), quienes estudiaron el efecto del pretratamiento ácido, alcalino, con sulfitos y agua caliente sobre bagazo de caña de azúcar y varias gramíneas, entre ellas pasto elefante. En dicho estudio, se demostró que el ácido sulfúrico fue el tratamiento más eficaz para la eliminación de la hemicelulosa, mientras que el hidróxido de sodio el más adecuado para eliminar lignina y hemicelulosa en pasto elefante. En un trabajo reciente, Naik et al., (2017) observaron un resultado similar en la reducción de la fracción hemicelulósica y un aumento en celulosa y lignina mediante pretratamiento de sorgo con ácido sulfúrico diluido. Además, Timung et al., (2016) reportaron que el pretratamiento de las biomásas bagazo de caña de azúcar y residuo de citronela con ácido sulfúrico diluido removía parte de la fracción de hemicelulosa.

La necesidad de desarrollar un proceso de pretratamiento más eficiente y económico para mejorar la sacarificación enzimática de la celulosa es un consenso entre diferentes investigadores (Zhu & Pan, 2010; Tomás-Pejó et al., 2011; Lima et al., 2014; Teixeira et al., 2014; Kumar & Sharma, 2017). Sin embargo, dada la complejidad, heterogeneidad y recalcitrancia de las biomásas lignocelulósicas es necesario el desarrollo y optimización de diferentes pretratamientos para cada biomasa.

Mediante espectroscopia FT-IR se estudiaron los cambios relativos en la composición y estructura de la pared celular de las biomásas antes y luego del tratamiento con ácido diluido. Se calcularon distintas relaciones a partir de los datos extraídos de los espectros correspondientes a bandas de absorción características. La biomasa BCA presentó un índice de orden lateral (LOI) significativamente mayor luego del pretratamiento. Este resultado nos indica que la biomasa pretratada contiene mayor cantidad de cadenas de celulosa en una forma altamente organizada en comparación con las biomásas no tratadas (Nelson & O'Connor, 1964; Poletto et al., 2014). Esto puede atribuirse al hecho de que el pretratamiento con ácido diluido a elevadas temperaturas conlleva a una reorganización de la celulosa amorfa y *paracristalina* en la biomasa (Sun et al., 2014a; b; Auxenfans et al., 2017). A su vez, sobre BCA pretratada se observó un aumento significativo en el grado de lignificación que

se corresponde con lo observado previamente por medio del análisis de la composición química.

Por medio de la microscopía electrónica de barrido se estudió la morfología de las biomásas no tratadas y pretratadas con ácido diluido, y luego de la sacarificación. Las biomásas sin tratar, exhibieron una estructura superficial lisa y rígida. Por el contrario, las superficies de las biomásas pretratadas se rompieron en fibras separadas o haces de fibras, apareciendo grietas en diferentes niveles. La razón de esto fue principalmente la degradación de la hemicelulosa durante el pretratamiento. Los efectos del pretratamiento fueron más evidentes sobre la biomasa BCA respecto a PE. Los resultados observados en los cambios morfológicos de las biomásas sugieren la conveniencia de un pretratamiento más severo para mejorar la separación de las fibras de celulosa con el fin de permitir mayor acceso a las enzimas. Sin embargo, es importante controlar las posibles pérdidas en el contenido de celulosa en este paso de optimización.

Con el propósito de explorar la diversidad bacteriana cultivable y evaluar la actividad (hemi) celulolítica de los endosimbiontes celulolíticos presentes en el intestino de dos termitas nativas de Argentina se realizaron los cultivos de los extractos de intestino sobre diferentes sustratos (hemi) celulósicos. Se observó crecimiento bacteriano en todas las condiciones ensayadas, demostrando la presencia de microorganismos que expresan las enzimas necesarias para degradar los sustratos celulósicos y lignocelulósicos utilizados.

Las actividades (hemi) celulolíticas se evaluaron en sobrenadantes de cultivos inoculados con los extractos de intestinos de las termitas cultivados sobre CMC y xilano y las biomásas tratadas y no tratadas. En todos los casos, se detectaron las actividades endoglucanasa y xilanasa, las cuales fueron significativamente mayores cuando se utilizaron biomásas pretratadas en comparación con las biomásas no tratadas, CMC y xilano. Los resultados de actividad enzimática muestran claramente que el enriquecimiento con un sustrato natural puede dar como resultado perfiles enzimáticos bastante diferentes de los obtenidos con sustratos comerciales, tales como CMC y xilano. Estos resultados sugieren que la acción concertada de varias enzimas puede ser determinante en la hidrólisis eficiente de las biomásas, en lugar de una sola especificidad enzimática. Además, el pretratamiento con ácido diluido

fue efectivo (permitió mayor accesibilidad de las enzimas), dado que los SN provenientes de las biomásas pretratadas presentaron valores más altos de actividad enzimática respecto a las sin tratar, y a los sustratos comerciales. El sobrenadante (SN) de cultivo libre de células permitió la desconstrucción de biomásas agrícolas complejas pretratadas, como BCA y PE, mediante la liberación de azúcares reductores.

Al analizar la actividad hidrolítica de los SN, la mayor actividad endoglucanasa se presentó cuando se cultivaron EI de *N. aquilinus* en medio mínimo (MM) y bagazo de caña de azúcar pretratado (BCA-P), mientras que en SN de *C. fulviceps* la mayor actividad xilanasas fue observada cuando se utilizó la biomasa pasto elefante pretratada (PE-P). Estos resultados sugieren que especies de termitas no xilófagas, como *C. fulviceps*, pueden llegar a constituir también una fuente interesante de enzimas, específicamente hemicelulasas, para la digestión de materiales lignocelulósicos. En coincidencia con otros autores, los resultados de esta Tesis proponen que la actividad enzimática es dependiente de la preparación de la muestra, el medio de cultivo y la concentración de los sustratos utilizados. En este sentido, aunque los valores de actividad obtenidos en este trabajo pueden ser bajos, están en concordancia con los reportados en otros estudios (Quiroz-Castañeda et al., 2009; Rehman et al., 2009; Uddin et al., 2012; Lin et al., 2012; Romano et al., 2013; Joynson et al., 2014; Dantur et al., 2015, Ben Guerrero et al., 2016). Lucena et al., (2011), en la búsqueda de nuevas enzimas en termitas brasileñas, reportaron una capacidad hidrolítica similar en BCA micronizado y otros sustratos (aproximadamente 0,2 UI/mg), como los que se describen aquí. No obstante, es interesante destacar que se observó un aumento de un orden de magnitud cuando se utilizó biomasa pretratada como fuente de carbono en los cultivos.

Por medio de la utilización de zimogramas se estudió el perfil de hidrólisis de las enzimas posiblemente involucradas en la conversión de diferentes sustratos. Los pesos moleculares (30–75 kDa) detectados en los geles fueron comparables a los reportados previamente para endoglucanasas y xilanasas de otros insectos (Tokuda & Watanabe, 2007; Geib et al., 2010; Oppert et al., 2010; Willis et al., 2010; Joynson et al., 2014).

Mediante el análisis de la secuencia casi completa del gen de ARNr 16S se realizó la identificación de las bacterias celulolíticas cultivables provenientes del intestino de *N. aquilinus* y *C. fulviceps*. En los cultivos de *N. aquilinus*, el género predominante fue *Cohnella*, seguido de *Klebsiella* y *Burkholderia*. Mientras que en cultivos de *C. fulviceps* predominaron los *Paenibacillus* seguido de *Acinetobacter* y *Roseomonas*.

La mayoría de los géneros identificados en este trabajo: *Cohnella*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter* (con la excepción de *Roseomonas*) han sido reportados previamente como celulolíticos por otros autores, en una variedad de ambientes diferentes. Dado que es probable encontrar nuevas especies no descritas en el intestino de estas termitas, ya que en este trabajo sólo se identificaron las bacterias cultivables en MM-CMC, las bacterias asociadas no cultivables a *N. aquilinus* y *C. fulviceps* podrían ser blanco de una mayor caracterización. Además, estas especies bacterianas probablemente están adaptadas específicamente al tracto intestinal de termitas y podrían estar involucradas en complejas relaciones simbióticas con otros microorganismos intestinales (Ohkuma et al., 2001; Hongoh et al., 2005; Bastien et al., 2013).

Dentro de los géneros encontrados, *Paenibacillus* spp. es bien conocido por su actividad celulolítica y xilanolítica (Sánchez et al., 2005; Shi et al., 2010; Adlakha et al., 2011; Maki et al., 2011; Talia et al., 2012; Ghio et al., 2016). También, se han reportado miembros del género *Cohnella* que presentaron una elevada actividad celulolítica y se han aislado a partir de termitas, compost, muestras de suelo y residuos agroindustriales (Khiangam et al., 2010; Rastogi et al., 2010; Eida et al., 2012; Manfredi et al., 2015). Con respecto a *Burkholderia* spp., generalmente aislado del suelo de bosque o de intestinos de lombrices de tierra, se informó por primera vez su capacidad celulolítica y xilanolítica por Fujii et al., (2012a; b). Por otro lado, Xu et al., (2016a; b) aislaron y estudiaron *Burkholderia* spp. presente en el intestino de la chinche del sur *Blissus insularis*. Además, varias *Klebsiella* spp. capaces de producir enzimas que degradan la celulosa y la hemicelulosa han sido reportadas. Por ejemplo, se demostró que *K. pneumoniae*, aislada del intestino de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) y del escarabajo *Rhynchoporus ferrugines* olivers (Coleoptera: Dryophthoridae), posee actividad celulasa y xilanasas (Anand et al.,

2010; Muhammad et al., 2017). A su vez, la cepa bacteriana celulolítica *K. oxytoca* THLC0409 se utilizó para producir etanol a partir de pasto elefante (Lin et al., 2010). La especie *Acinetobacter anitratus* se aisló a partir de la hemolinfa de un caracol africano y su actividad endocelulasa se determinó cuantitativamente (0,84 UI/mL) (Ekperigin, 2007). Además, *A. lwoffii* se aisló a partir del intestino medio del barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). A su vez, los géneros *Acinetobacter* sp. y *Klebsiella* sp. fueron encontrados en el intestino medio del escarabajo de la papa de Colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) (Vilanova et al., 2012).

Las comunidades bacterianas intestinales se conservan notablemente dentro de un género de termitas, pero difieren significativamente entre géneros de termitas (Nakajima et al., 2006). Los microorganismos de la microbiota también tienen la capacidad de adaptarse a los cambios en la dieta de los insectos, por inducción de enzimas o por cambios poblacionales en la comunidad microbiana (Kaufman & Klug, 1991; Santo Domingo et al., 1998; Anand et al., 2010). En este trabajo, las diferencias encontradas en la composición de la microbiota intestinal cultivable en MM-CMC de *N. aquilinus* y *C. fulviceps* pueden atribuirse tanto a la distancia filogenética entre estos géneros de termitas como a sus diferentes hábitos alimenticios. Sin embargo, es necesario realizar un estudio más exhaustivo a partir de enfoques metagenómicos que incluyan bacterias no cultivables para dilucidar esta cuestión.

Mediante espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF, se realizó la identificación de las proteínas del secretoma correspondiente a los cultivos sobre CMC de *N. aquilinus*, así como las bandas que presentaron actividad en los diferentes zimogramas.

La ausencia de enzimas celulolíticas con alta similitud con las descritas en las base de datos puede explicarse por la metodología utilizada para la extracción de proteínas (Boudart et al., 2005). De acuerdo con Burnum et al., (2011) algunas de las enzimas celulolíticas pueden ser insolubles o pueden permanecer unidas a la matriz lignocelulósica, lo que dificultaría su detección mediante esta metodología. A su vez, es probable que las proteínas identificadas sean diferentes a las previamente reportadas en las base de datos. Fue posible identificar proteínas con distintas

funciones tales como, regulación transcripcional, secreción, activación de la división celular o bien con dominios no caracterizados.

Por otro lado, la identificación de proteínas presentó cierta dificultad debido a la falta de datos de secuencia del genoma para realizar el análisis de metaproteómica. Sin embargo, el resultado del análisis de biodiversidad nos permitió la identificación de péptidos con similitud correspondientes a los géneros presentes en la biblioteca del gen ARNr 16S de cultivos en CMC de *N. aquilinus*.

La separación adicional de estas proteínas mediante electroforesis en gel de dos dimensiones permitió obtener *spots* de mayor pureza. Esto contribuyó a identificar las enzimas hemicelulolíticas como se esperaba, ya que el gel 2D es una técnica óptima para lograr un perfil de alta resolución de proteínas con baja abundancia. Se identificaron en el secretoma de *N. aquilinus* en CMC varios *spots* con homología a una xilanasas GH10 intracelular y a una lipasa correspondientes al género *Cohnella*. A su vez, se detectó la misma lipasa en el secretoma de NA en MM-PE. Este resultado sugiere que algunas de estas proteínas pueden estar involucradas en la hidrólisis de la (hemi) celulosa y que este género podría ser el más relevante en relación a esta actividad. Dado que la xilanasas y la lipasa identificadas en nuestro estudio fueron producidas de forma recombinante y se caracterizó su actividad en trabajos previos (Kim et al., 2010; Golaki et al., 2015) se decidió no continuar con el estudio de las mismas.

II.8 Conclusiones

En este capítulo se evaluó por primera vez la actividad (hemi) celulólitica de las enzimas presentes en dos termitas nativas de Argentina, *N. aquilinus* y *C. fulviceps* y se logró identificar varios péptidos con similitud a xilanasas, mediante espectrometría de masas. Asimismo, aporta nueva información sobre la microbiota bacteriana capaz de degradar hemicelulosa, asociada a estas termitas. Además, las enzimas endógenas y de los endosimbiontes presentes en los extractos intestinales y sobrenadantes de cultivo fueron capaces de hidrolizar el bagazo de caña de azúcar y el pasto elefante. Ambas biomasas son buenas candidatas como materia prima lignocelulósica para la producción de bioetanol en América del Sur.

Parte III

Clonado, expresión, purificación y
caracterización bioquímica de células del
intestino de termitas

Resultados: Parte III

III.1 Análisis bioinformático de GH5Cela y GH5CelB

A partir de un conjunto de datos metagenómicos generados en un trabajo paralelo a esta Tesis (Soria et al., en preparación), provenientes del análisis comparativo de la microbiota intestinal de termitas nativas superiores (*N. aquilinus* y *C. fulviceps*), se seleccionaron seis genes codificantes para enzimas degradadoras de la pared celular vegetal con potencial actividad GH.

GH5Cela codifica un marco de lectura abierto de 1.091 pb, correspondiente a un polipéptido de 363 aminoácidos con un peso molecular estimado de 40,94 kDa y un pI de 7,1. Por otro lado, GH5CelB codifica un marco de lectura abierto de 1.025 pb, generando una proteína de 341 aminoácidos con un peso molecular estimado de 39,73 kDa y un pI de 6,03. Ambas enzimas carecen de péptido señal, lo cual fue corroborado mediante el programa SignalP 4.1.

Las proteínas GH5Cela y GH5CelB se analizaron según su secuencia aminoacídica y pudieron identificarse sus dominios conservados en las bases de datos de NCBI y Expasy-Prosit. En base al análisis mediante BLASTP, la secuencia de GH5Cela mostró una identidad de 79% y una cobertura del 98% con una GH de la familia 5 de bacterias no cultivables (ABW39346), y se alineo además con las secuencias ABW39360, ABW39361, ABW39353, ABW39354, ABW39341 y ABW39352 (**Figura III1A**). A su vez, la secuencia GH5CelB se alineo con ABW39359, ABW39346, ABW39360, ABW39354, ABW39353, ABW39361 y ABW39341, y mostró una identidad del 84% y una cobertura del 99%, también con una GH de la familia 5 de bacterias no cultivables (ABW39352) (**Figura III1B**). El análisis de los dominios conservados de ambas enzimas muestra un dominio catalítico correspondiente a la familia 5. A su vez, la secuencia *signature* conservada de la familia GH5 fue encontrada entre los aminoácidos 139-148 (VVYEVLNEPH) y los aminoácidos 123-132 (VIYEILNEPH) para GH5Cela y GH5CelB, respectivamente.

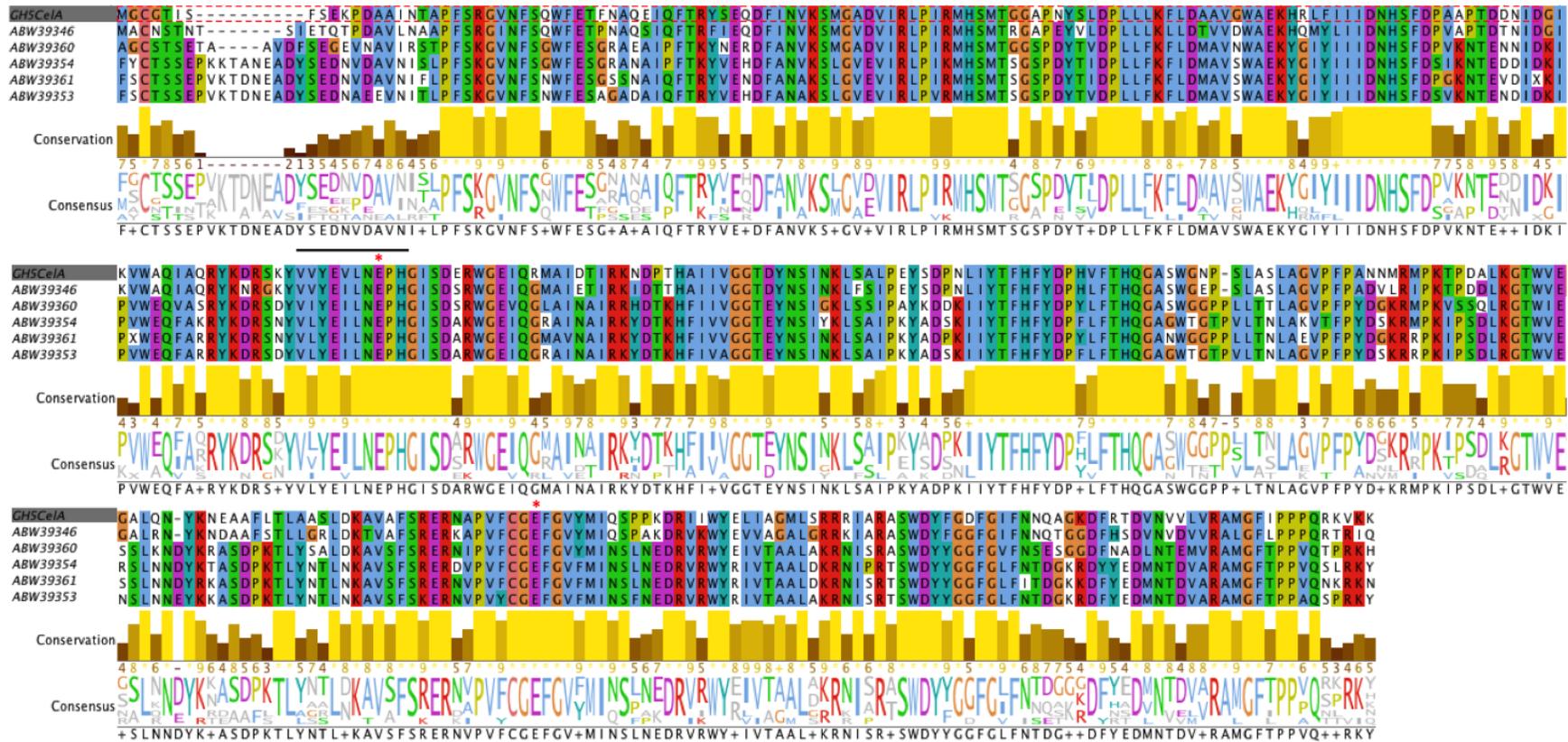


Figura III1A. Alineamiento múltiple de GH5CelA. La secuencia de GH5CelA se alineó con secuencias de endoglucanasas con alta identidad de bacterias no cultivables. Las barras amarillas indican el grado de conservación y las letras muestran la secuencia consenso. Los asteriscos indican los residuos glutámicos (E) del sitio activo. La barra superior indica la secuencia *signature*.

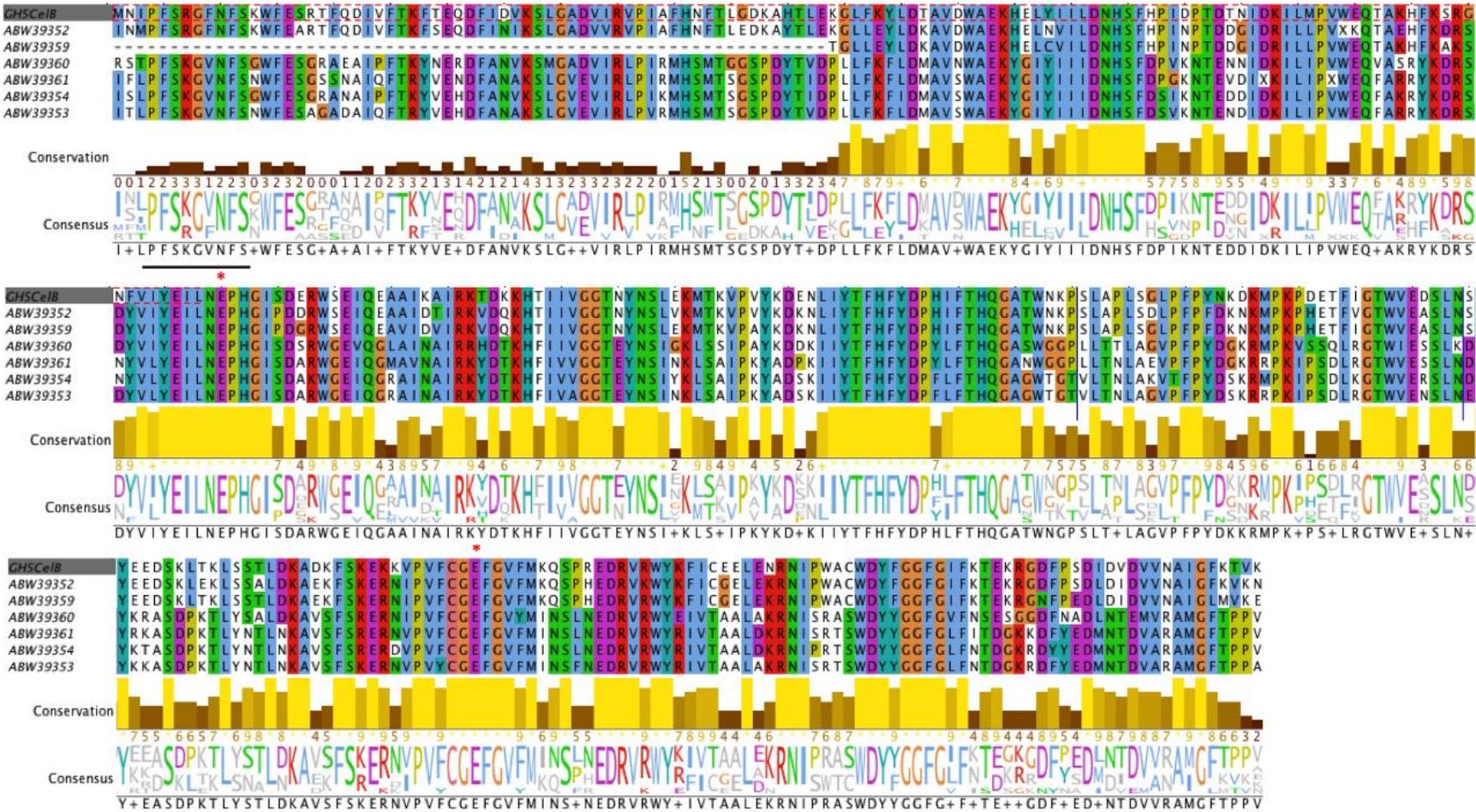


Figura III1B. Alineamiento múltiple de GH5CelB. La secuencia de GH5CelB se alineó con otras secuencias de endoglucanasas con alta identidad de bacterias no cultivables. Las barras amarillas indican el grado de conservación y las letras muestran la secuencia consenso. Los asteriscos indican los residuos glutámicos (E) del sitio activo. La barra superior indica la secuencia signature.

III.2 Expresión recombinante y caracterización bioquímica de las endoglucanasas GH5CelA y GH5CelB

Las secuencias codificantes correspondiente a las proteínas maduras GH5CelA y GH5CelB se adquirieron en forma de genes sintéticos optimizados para expresión en *E. coli*. Únicamente GH5CelC pudo ser amplificado con éxito a partir del ADN genómico de las termitas. Posteriormente, fueron clonadas en el vector pET28a(+) para su expresión recombinante y se optimizaron las condiciones de inducción y purificación, para obtener las proteínas solubles. Las condiciones óptimas de inducción obtenidas fueron a 20 °C, 16 h e IPTG 0,5 mM. La mayor cantidad de proteína soluble de GH5CelA y GH5CelB se obtuvo utilizando la cepa SHuffle y Rossetta de *E. coli* (Figura III2A). Sin embargo, la proteína GH5CelC se obtuvo en forma insoluble (cuerpos de inclusión) bajo todas las condiciones de optimización ensayadas, por lo que no se pudo continuar con su caracterización.

Mediante SDS-PAGE, las proteínas purificadas rGH5CelA y rGH5CelB mostraron un peso molecular esperado de ~40 kDa y no se observó la formación de homo o heteropolímeros en geles en condiciones no desnaturizantes (Figura III2A-B). La enzima rGH5CelB presentó además actividad endoglucanasa en zimogramas, usando CMC como sustrato, lo cual representó un primer indicio de su capacidad endoglucanasa que fue confirmado además en ensayos posteriores (Figura III2C).

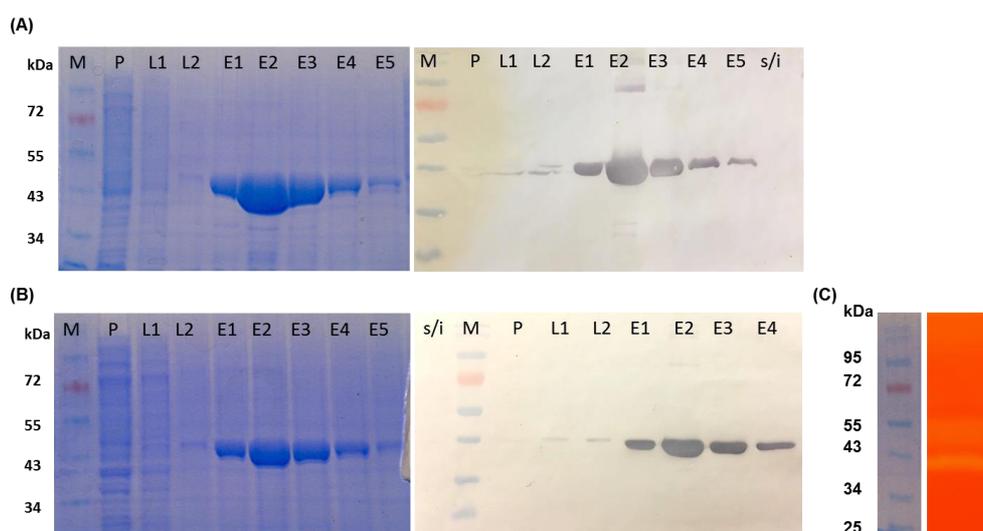


Figura III2. Análisis de las proteínas recombinantes purificadas rGH5CelA y rGH5CelB. Purificación IMAC soluble (SDS-PAGE 12%). (A) rGH5CelA. (B) rGH5CelB. (C) Zimograma en CMC (SDS-PAGE 12% - CMC 0,1%) de rGH5CelB. M: marcador de peso molecular pre-teñido, s/i: sin inducir, P: percolado, L: lavados, E: eluciones.

La clasificación de las GH en familias se establece en base a la secuencia de proteínas y su estructura molecular; sin embargo, no refleja necesariamente su actividad. Así, la mayoría de las familias se componen de proteínas con diferentes actividades enzimáticas y proteínas con la misma actividad enzimática pueden ser encontradas en diferentes familias GH, es decir que una familia GH puede agrupar enzimas de distinto número EC (*Enzyme Commission*). Además, algunas familias GH, tales como la GH5 se dividen en subfamilias. Es por ello que se ensayó la especificidad de sustrato de las dos enzimas de la familia GH5 usando diferentes tipos de sustratos (**Tabla III1**).

La proteína recombinante purificada rGH5CelA fue activa sobre el sustrato *p*NP-celobiósido ($42,3 \pm 2,0$ UI/mg) y sobre el polisacárido β -glucano de cebada ($0,95 \pm 0,02$ UI/mg). Por otro lado, rGH5CelB mostró actividad sobre *p*NP-celobiósido ($29,2 \pm 0,4$ UI/mg), CMC ($0,1 \pm 0,01$ UI/mg) y β -glucano de cebada ($1,3 \pm 0,4$ UI/mg). No se detectó actividad sobre ninguna forma de celulosa cristalina utilizando los sustratos Avicel, BMCC (celulosa microcristalina bacteriana) y PASC (celulosa amorfa regenerada), ni tampoco hidrolizó los polisacáridos galactomanano ni laminarin (**Tabla III1**).

Tabla III1. Especificidad de sustrato de rGH5CelA y rGH5CelB

Sustrato	Actividad	Enlace	rGH5CelA (UI/mg)	rGH5CelB (UI/mg)
Carboximetilcelulosa	Endoglucanasa	(β -1,4) Glc	ND	$0,1 \pm 0,01$
Avicel	Exoglucanasa	(β -1,4) Glc	ND	ND
BMCC	Exoglucanasa	(β -1,4) Glc	ND	ND
PASC	Exoglucanasa	(β -1,4) Glc	ND	ND
Xilano de abedul	Xilanasa	(β -1,4) Xil	ND	ND
<i>p</i>NP-xilopiranosido	Xilosidasa	β -Xil	ND	ND
<i>p</i>NP-glucopiranosido	β -glucosidasa	β -Glc	ND	ND
<i>p</i>NP-celobiósido	Celobiohidrolasa	β -Glc	$42,3 \pm 2,0$	$29,2 \pm 0,4$
Galactomanano	Endomananasa	(β -1,4) Man	ND	ND
β-glucano de cebada	β -glucanasa	(β -1,4/ β -1,3) Glc	$0,95 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,4$
Laminarin	Laminarasa	(β -1,3) Glc	ND	ND

ND: no detectado, UI/mg: UI de actividad enzimática/mg de proteína totales, Glc: glucosa, Xil: xilosa, Man: manosa.

El perfil de actividad celobiohidrolasa en función de la temperatura y el pH de cada enzima se determinó utilizando *p*NPC como sustrato, para caracterizar la actividad en diferentes condiciones de reacción (**Figura III3**). rGH5CelA mostró una actividad máxima a pH 4,5 y pH 5 y 35 °C, con más del 60% de actividad en un rango de pH desde 4 a 6 y a temperaturas entre 25 °C y 45 °C. La enzima mantuvo el 70% y 60%

de su actividad por 24 horas a 30 °C y 35 °C, respectivamente. Sin embargo, perdió casi completamente la actividad luego de 6 horas a 40 °C. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron pH 5 y 35 °C como condiciones de reacción para ensayos posteriores (**Figura III3C**). Por otro lado, rGH5CelB mostró una actividad máxima a pH 5 y 45 °C, manteniendo más del 60% de actividad en un rango de pH, de 5 a 6, y entre 40 °C y 50 °C. A 40 °C, la enzima mantuvo más del 75% de actividad celobiohidrolasa luego de tres horas, pero a las 16 hs la actividad decayó al 20% de la máxima (**Figura III3D**). Por lo tanto pH 5 y 40 °C se seleccionaron como las mejores condiciones de reacción.

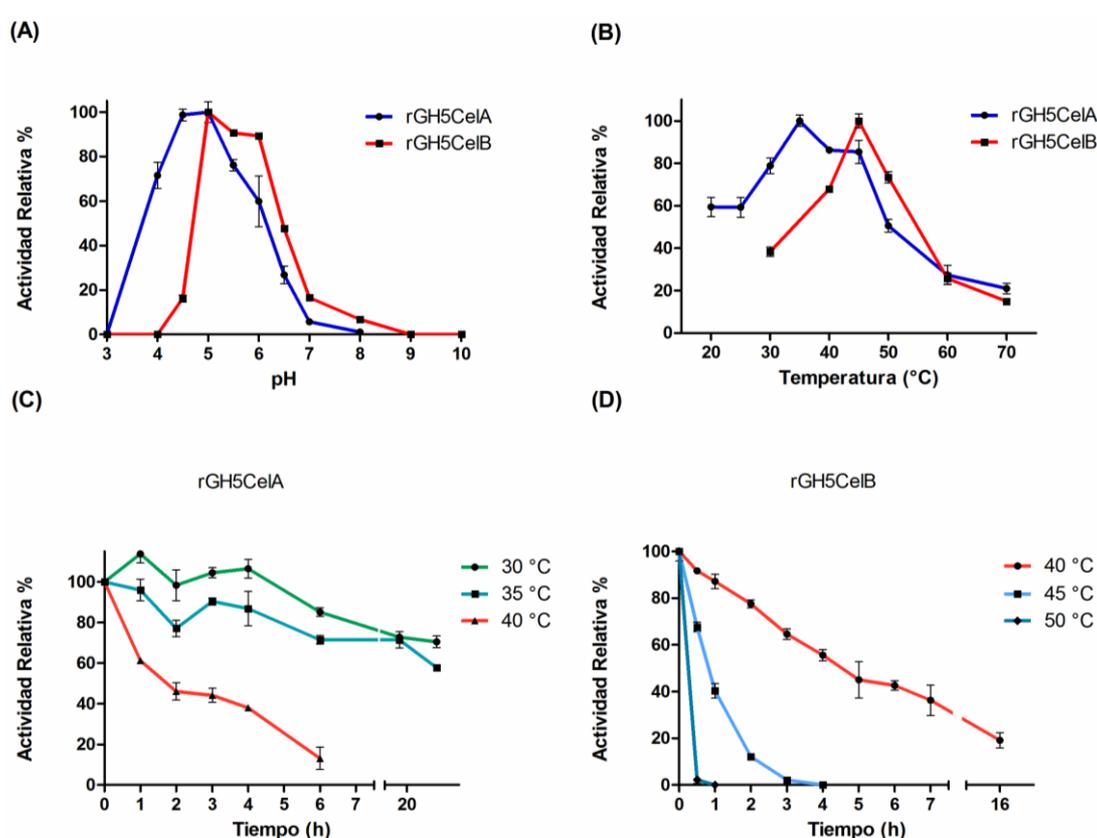


Figura III3. Perfil de actividad celobiohidrolasa de rGH5CelA y rGH5CelB. (A) Condiciones óptimas de pH. **(B)** Condiciones óptimas de temperatura. **(C)** Estabilidad térmica de rGH5CelA. **(D)** Estabilidad térmica de rGH5CelB. Los resultados corresponden al promedio y desvío estándar de tres réplicas técnicas. Dos ensayos con muestras biológicas independientes se llevaron a cabo con resultados equivalentes.

Los parámetros cinéticos para cada enzima se evaluaron realizando las reacciones enzimáticas de actividad a diferentes concentraciones de pNPC, en condiciones óptimas de reacción y durante 5-10 min (tiempo en el cual la reacción

transcurrió en la zona de V_0). La regresión no lineal aplicada a rGH5CeIA y rGH5CeIB mostró una cinética Michaeliana (hipérbola) (**Figura III4**).

Los parámetros cinéticos fueron calculados para conocer la eficiencia catalítica de ambas enzimas. Para rGH5CeIA se obtuvieron una K_M y V_{max} de 1,8 mM y 120,1 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente, y la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) de 45,7 $\text{mM}^{-1} \text{seg}^{-1}$ se calculó en base al número de recambio (K_{cat}) 81,9 seg^{-1} . En el caso de rGH5CeIB, se obtuvieron una K_M y V_{max} de 3,2 mM y 50,47 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente, y la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) de 10,50 $\text{mM}^{-1}\text{seg}^{-1}$, calculada en base al número de recambio (K_{cat}) 33,4 seg^{-1} .

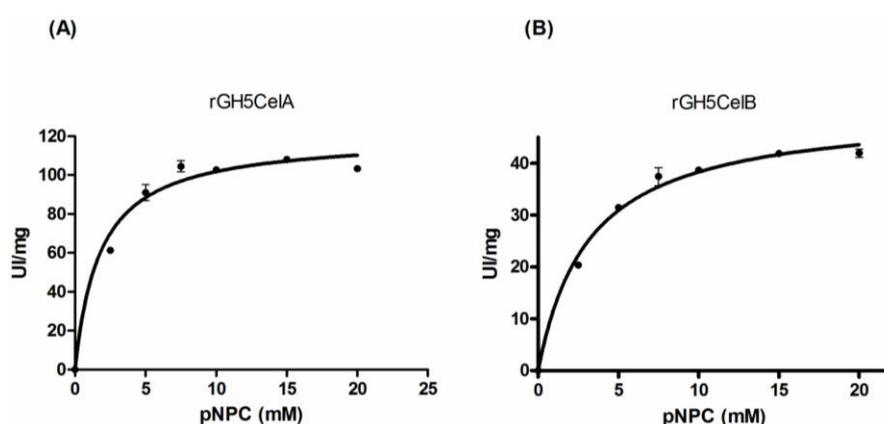


Figura III4. Cinética enzimática de rGH5CeIA y rGH5CeIB. Producto liberado en las reacciones de hidrólisis, evaluados en diferentes concentraciones de pNPC, expresados en $\mu\text{moles/min}$, de **(A)** rGH5CeIA y **(B)** rGH5CeIB.

Además, debido a que solo rGH5CeIB presentó actividad sobre CMC, se determinó el perfil de actividad en función de la temperatura y el pH de rGH5CeIB utilizando CMC como sustrato (**Figura III5A y B**). rGH5CeIB mostró actividad máxima a pH 5 y 5,5 y 45 °C, con más del 60% de actividad en un rango de temperaturas entre 30 °C y 50 °C. La enzima mantuvo más del 90% y 80% de actividad por dos horas a 40 °C y 45 °C, respectivamente. Luego de 16 h la actividad decayó al 40% a 40 °C y no presentó actividad a 45 °C. La enzima perdió toda la actividad luego de 2 h a 50 °C (**Figura III5C**).

Asimismo, se calcularon los parámetros cinéticos para conocer la eficiencia catalítica de rGH5CeIB, la K_{half} resultó 704,3 mM, la V_{max} 0,57 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y el coeficiente de Hill (η_H) 3,015. Estos resultados indicaron un comportamiento alostérico de rGH5CeIB sobre CMC, con efecto de *binding* cooperativo (**Figura III5D**).

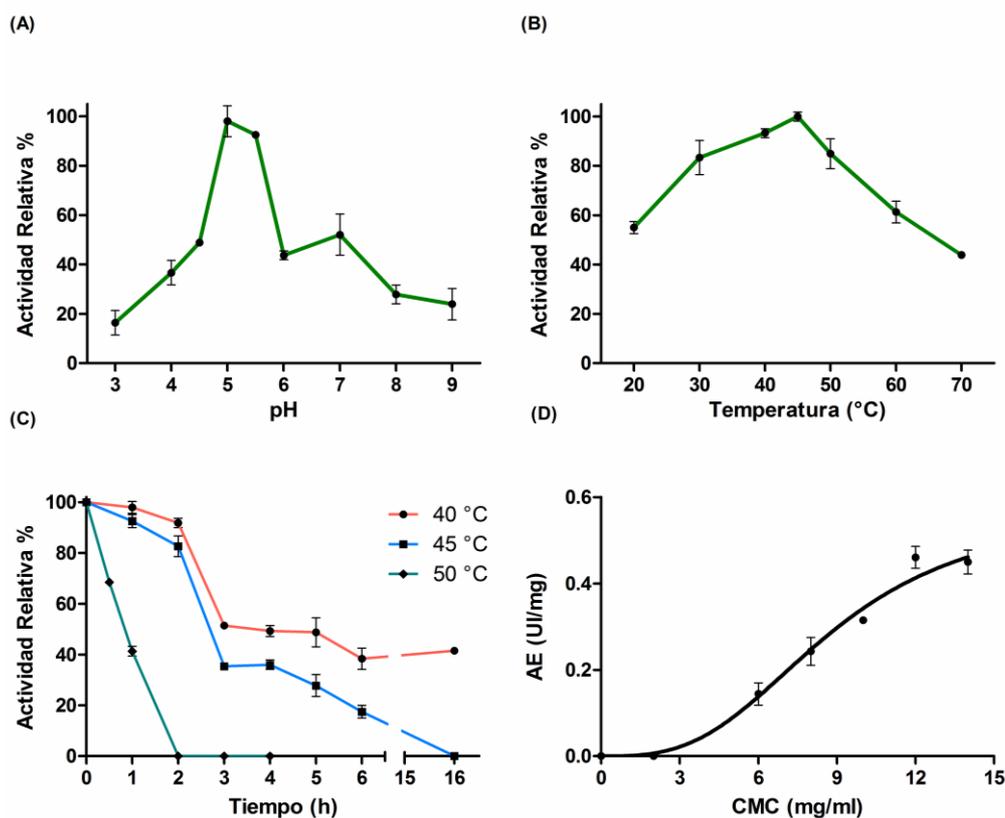


Figura III5. Perfil de actividad endoglucanasa de rGH5CelB. (A) Condiciones óptimas de pH, (B) temperatura, (C) estabilidad térmica y (D) cinética enzimática. Los resultados corresponden al promedio y desvío estándar de tres réplicas técnicas. Dos ensayos con muestras biológicas independientes se llevaron a cabo con resultados equivalentes.

III.3 Mecanismo de hidrólisis de rGH5CelA y rGH5CelB

Para determinar el mecanismo de acción de rGH5CelA y rGH5CelB se utilizó CMC, β -glucano de cebada y celooligosacáridos (COS) no ramificados, tales como celotetraosa (C4), celotriosa (C3) así como también sobre el disacárido celobiosa (C2) y se analizaron los productos generados, mediante TLC (**Figura III6**). Los resultados observados indicaron que rGH5CelA fue activa principalmente sobre C4, generando C2 como producto final de reacción (**Figura III6A**). Por otro lado, rGH5CelB hidrolizó C3 liberando C1 y C2 e hidrolizó completamente C4 generando C2 (**Figura III6B**).

En cuanto al perfil de hidrólisis de β -glucano de cebada por acción de rGH5CelA, se observó la producción de COS de GP>6, C2, C3, C4, C5 y C6 desde etapas tempranas de reacción. El perfil de hidrólisis en el tiempo mostró una disminución en los COS de GP>6 y un leve aumento de C2, C3 y C4 (**Figura III6C**). Por otro lado, rGH4CelB, presentó un perfil de hidrólisis diferente sobre β -glucano de cebada. A

recombinantes se ensayaron sobre las biomásas RM, PE y BCA pretratadas por hidrólisis ácida diluida. Se seleccionaron las condiciones de pH y temperatura definidas como favorables para ambas enzimas (pH 5, 35 °C para rGH5CelB y pH 5, 40 °C para rGH5CelA). Mediante ensayo de DNS se cuantificaron los azúcares reductores producidos por la acción de ambas enzimas. Luego de la hidrólisis de las biomásas no fue posible detectar la presencia de azúcares reductores como producto de las enzimas rGH5CelA y rGH5CelB. Esto se podría deberse a que las enzimas no son activas sobre sustratos más complejos como las biomásas lignocelulósicas.

III.5 Clasificación de rGH5CelA y rGH5CelB dentro de las subfamilias de las glicosil hidrolasas 5

En base a los resultados de la caracterización bioquímica de rGH5CelA y rGH5CelB se decidió profundizar en la clasificación en las diferentes subfamilias de GH5. Para ello se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud en el cual se incluyeron como referencias secuencias de proteínas caracterizadas depositadas en la base de datos CAZy (al mes de junio de 2018) correspondientes a las subfamilias 5, 22, 25, 26, 36, 37 y 39. Esta selección se realizó utilizando los siguientes criterios: 1) presentaban características similares a las observadas experimentalmente, 2) monoespecíficas (presencia de un solo número EC), 3) actividad endo- β -1,4-glucanasa, celodextrinasas y/o sobre polímeros del tipo β -glucanos, de origen bacterianos, 4) intracelulares, 5) provenientes de organismos no cultivables y 6) sin dominios catalíticos auxiliares. El análisis filogenético reveló que las secuencias GH5CelA y GH5CelB agruparon entre ellas y con secuencias de la subfamilia 25, con un *bootstrap* de 50% **Figura III7A**. Sin embargo, debido a que este soporte no es lo suficientemente elevado, no es posible confirmar que sean parte de la subfamilia 25 ni asegurar que sean parte de una subfamilia diferente. Posteriormente, se realizó un nuevo análisis filogenético incluyendo 80 secuencias bacterianas completas depositadas en la base de datos CAZy correspondientes a la subfamilia 25. De este nuevo árbol filogenético se observó que tanto GH5CelA como GH5CelB agruparon juntas y no agruparon con las GH5_25 identificadas hasta el momento descriptas (**Figura III7B**).

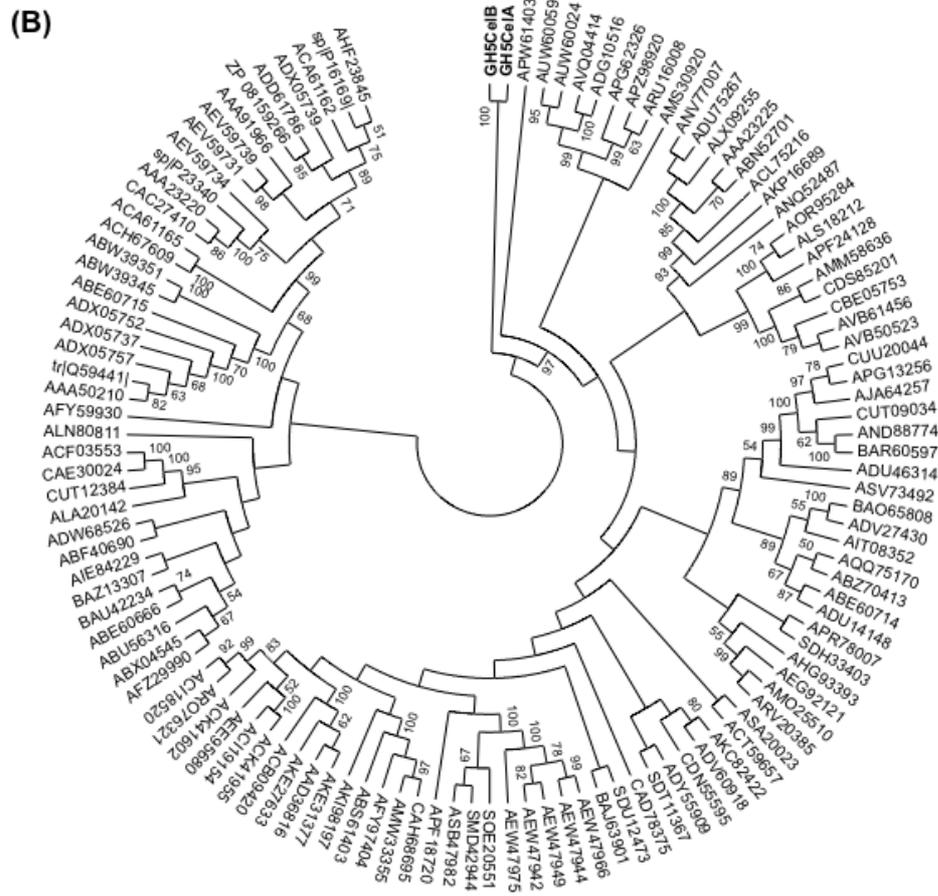
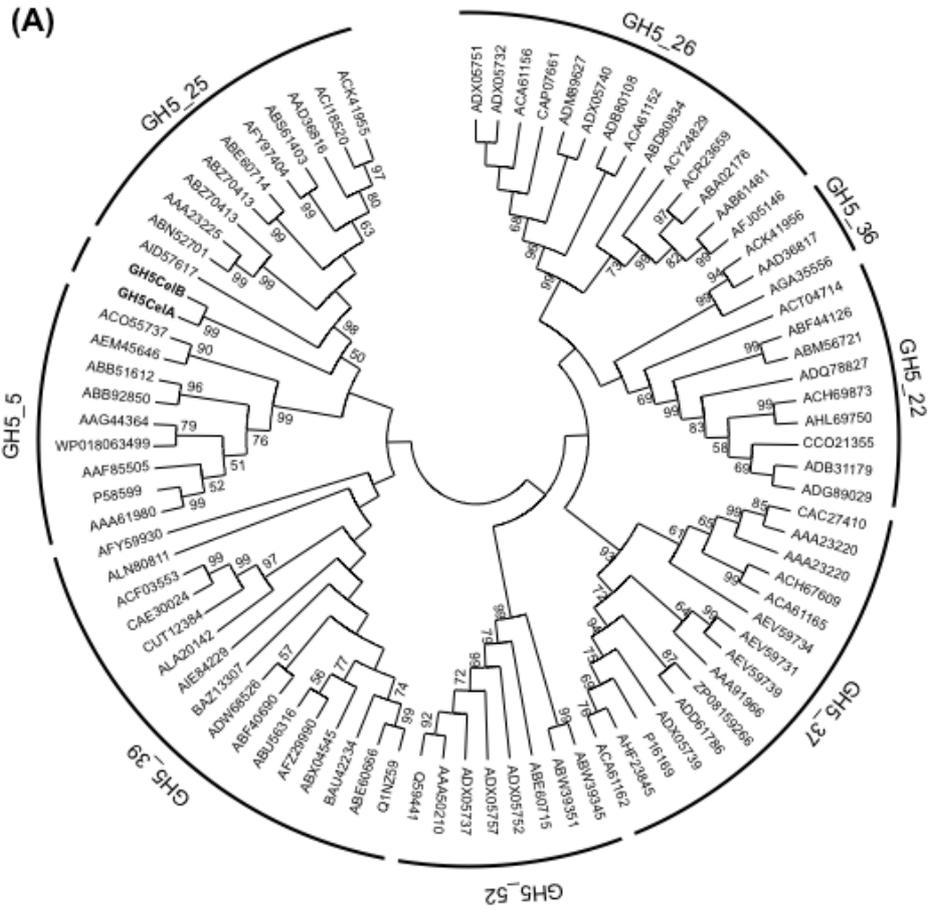


Figura III7. Análisis filogenético generado con las enzimas caracterizadas en esta tesis GH5CelA y GH5CelB y secuencias de proteínas de diferentes subfamilias de la familia GH5 (A) y (B) con secuencias proteicas de la subfamilia 25 depositadas en la base de datos CAZY. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Verosimilitud, con análisis de *p-distance* (MEGA v6). El árbol se construyó a escala, con la longitud de las ramas medidas en el número de diferencias en aminoácidos por sitio. El porcentaje de árboles en los cuales los diferentes taxones agrupan juntos se determinó a partir de un test de *bootstrap* de 1.000 réplicas y se muestran en cada rama (mayores al 50%).

III.6 Modelado molecular de GH5CelA y GH5CelB

Para dilucidar la estructura terciaria de estas proteínas, se llevó a cabo el modelado molecular de las secuencias proteicas maduras de GH5CelA y GH5CelB, usando algoritmos de la plataforma I-TASSER. Los plantados seleccionados por I-TASSER para construir cada modelo fueron para GH5CelA: 1cenA, 1cecA, 3mmuA, 4x0v, 3ncoA y para GH5CelB: 1cenA, 1cecA, 4x0v, 3ncoA y 3aofA. Luego los fragmentos de plantados que obtuvieron el máximo nivel de significancia fueron reensamblados y en una segunda ronda de simulación se refinó la topología global para generar el modelo final.

De este modo se obtuvo un modelo con un buen nivel de confianza para la proteína **GH5CelA** (parámetros *C-score* -0,13, *TM-score* 0,70±0,12, RMSD 6,9±4,1Å) el cual presentó máxima analogía estructural (*TM-score* 0,888) con el dominio endoglucanasa de *Clostridium thermocellum* generada por ingeniería genética (PDB: 1cenA). GH5CelA se ajustó al clásico dominio catalítico de las enzimas de la familia GH5: un barril (β/α)₈ (*TIM-barrel*). Por otro lado, los residuos E146 y E288 (de la proteína madura) fueron identificados como la díada catalítica (**Figura III8A-B**). Los sitios de unión a ligando de GH5CelA fueron identificados por análisis de algoritmos COACH (también en la plataforma I-TASSER), en base a 43 plantados con elevado *C-score*, siendo la más representativa una GH5 cristalizada formando un complejo con celobiosa (Q9X273, PDB: 3zarA) (**Figura III8C**).

Para la proteína madura **GH5CelB** también se obtuvo un modelo molecular, con un elevado *C-score* de 0,80, *TM-score* de 0,82±0,08 y RMSD de 4,8±3,1Å. Además, GH5CelB presentó alta analogía estructural (*TM-score* de 0,945) con el dominio endoglucanasa de una proteína de *C. thermocellum* (PDB: 1cenA), en base al alineamiento estructural entre ambas. El modelo de GH5CelB presentó también un dominio catalítico con una estructura de barril (β/α)₈ (*TIM-barrel*). Se identificaron los

aminoácidos glutámicos E130 y E272 como los involucrados en el mecanismo catalítico (**Figura III8D-E**). A partir del análisis de COACH se determinaron los sitios de unión a ligando, en base al alineamiento con 67 templados de las estructuras más similares, con elevado *C-score*, siendo la más representativa una GH5 cristalizada formando un complejo con celotriosa (P28623, PDB: 3ndzA) (**Figura III9F**).

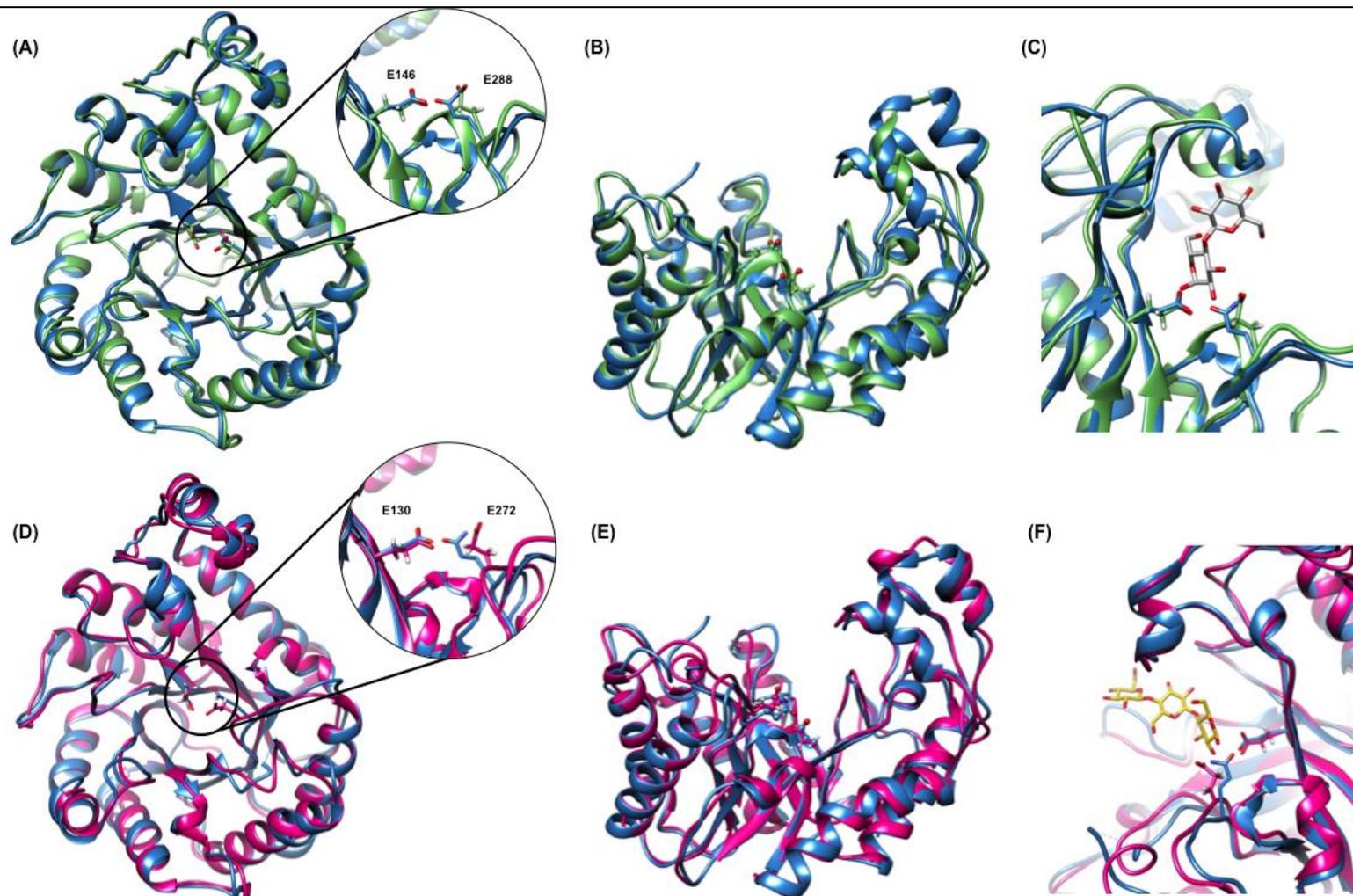


Figura III.8. Modelado molecular de GH5CelA y GH5CelB. Los modelos de GH5CelA (A, B y C) y GH5CelB (D, E y F) se generaron en I-TASSER. Se muestran los modelos superpuestos de GH5CelA (verde) y GH5CelB (rosa) con su análogo estructural más cercano PDB (azul): 3zarA y 3ndzA, respectivamente. Los residuos catalíticos de ácido glutámico se muestran para cada modelo. (B) y (E) Vista lateral evidenciando la topología típica de hendidura del sitio activo. (C) GH5CelA formando complejo con una molécula de celobiosas. (F) GH5CelB formando un complejo con una molécula de celotriosas.

III.7 Discusión

En esta sección se describió el clonado, purificación y caracterización de dos celulasas recombinantes, GH5CelA y GH5CelB, identificadas previamente a partir del análisis metagenómico (ADN total) de la microbiota intestinal de las termitas nativas de Argentina *Nasutitermes aquilinus* y *Cortaritermes fulviceps* (Soria et al., en preparación). Dado que en trabajos previos se reportó que el uso de optimización de codones mejora los rendimientos de producción de enzimas (Elena et al., 2014) se enviaron a sintetizar ambos genes con los codones optimizados para la expresión en *E. coli*.

En primer lugar se realizó el análisis de la secuencia de aminoácidos mediante BLASTP de las enzimas GH5CelA y GH5CelB. Los resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos mediante BLASTP presentaron elevada identidad con secuencias de enzimas pertenecientes a la familia GH5 de bacterias no cultivables. Las mismas fueron identificadas previamente en el análisis metagenómico de la microbiota intestinal de termita del género *Nasutitermes* (Warnecke et al., 2007). GH5CelA y GH5CelB presentaron el típico dominio catalítico correspondiente a la familia 5 de glicosil hidrolasas.

La determinación de las condiciones óptimas de reacción es un paso crítico para que ocurra una hidrólisis eficiente, por lo que es fundamental determinar los valores de pH y temperatura óptimos de rGH5CelA y rGH5CelB. En el caso de las enzimas descritas en este trabajo, rGH5CelA presentó valores de actividad celobiohidrolasa en el orden de las $42,3 \pm 2,0$ UI/mg, sobre pNPC como sustrato, a valores pH moderados (pH 4-5) y temperaturas de moderadas a bajas (25 a 40 °C), manteniendo más del 60% de actividad relativa. Por su parte, rGH5CelB también presentó actividad celobiohidrolasa ($29,2 \pm 0,4$ UI/mg) en un rango de pH 5-6 y temperaturas de 40 a 50 °C. Además, la actividad endoglucanasa de rGH5CelB, utilizando CMC como sustrato, presentó valores de pH óptimo de 5 y en un rango de temperaturas de 30 a 50 °C, manteniendo más del 75% de la actividad relativa. Los valores de pH óptimos obtenidos para rGH5CelA y rGH5CelB se encuentran dentro del rango descrito por otros autores para las GH5 (de 4 a 10), como por ejemplo, la endoglucanasa Cel5A de *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 y Cel5R identificada por

metagenómica funcional de suelo (pH 6) (Park et al., 2012; Garg et al., 2016), Xcel5A de *Xanthomonas* sp. EC102 (pH 5,5) (Woo et al., 2014), Egl2 de *Aspargillus fumigatus*, CelDZ1 de *Thermoanaerobacterium*, la endo- β -(1,4)-glucanasas KG35 y ChCel5A proveniente de *Cytophaga hutchinsonni* (pH 5) (Liu et al., 2011b; Zhu et al., 2013; Zarafeta et al., 2016; Song et al., 2017) y la endoglucanasa alcalina Egl-252 de *Bacillus* sp. KSM-N252 (pH 10) (Endo et al., 2001). rGH5CelA y rGH5CelB son activas en un rango de temperaturas comparables a las reportadas previamente para otras celulasas de la familia GH5. Las endo- β -(1,4)-glucanasas KG35 proveniente del rumen de cabra y Cel5A de *Cellvibrio mixtus* presentan actividad óptima en el rango de 30-50 °C (Voget et al., 2006; Song et al., 2017). Cel5A, una endoglucanasa proveniente de *P. xylanilyticus* KJ-03, tiene máxima actividad a 40 °C (Park et al., 2012), mientras que ChCel5A proveniente de *Cytophaga hutchinsonni* presentó una temperatura óptima de 45 °C (Zhu et al., 2013). Por otro lado, la exo/endoglucanasa ThC5A de *Thermobifida halotolerans*, una celulasa de *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 y CS10, celulasa identificada a partir del metagenoma intestinal de la mosca *Hermetia illucens*, presentaron actividad óptima a 50 °C (Lee et al., 2008, 2014b; Zhang et al., 2015).

A partir del análisis de los parámetros cinéticos de ambas enzimas, se observó que rGH5CelA siguen una cinética del tipo sigmoidea cuando se utilizó pNPC como sustrato. En cambio, rGH5CelB presentó un comportamiento alostérico, con efecto de unión cooperativa, cuando se utilizó CMC como sustrato pero no con pNPC. Esto sugiere la presencia de sitios de unión secundarios (SBSs, *secondary binding sites*) tal como se observó en una exo- β -(1,3)-glucanasa de la familia GH5, en donde el mayor contribuidor al SBS es un residuo triptófano en la posición 287, conservado en la mayoría de las GH5 (Patrick et al., 2010). Para sustratos pequeños, la unión al SBS y al sitio activo parecen ser independiente entre sí. En cambio, para sustratos más grandes, se produce la unión cooperativa y conduce a mejorar la hidrólisis de estos sustratos (Ludwiczek et al., 2007). La presencia de SBS ha sido descrita previamente en otras familias, tal como se observó en las endoxilanasas de la familia GH11 de *Bacillus circulans*, *Pseudozyma grasilensis* y *Paenibacillus* A59 (Cuyvers et al., 2011; Borges et al., 2014; Ghio et al., 2018). A su vez, se han identificado SBS en GH pertenecientes a las familias 13 y 77, entre otras (Cockburn et al., 2014). En algunas GH, los SBS compensan probablemente la ausencia de CBM adicionales. La diferencia fundamental

entre un SBS y un CBM es que los primeros se encuentran en una posición que es fija en relación con el sitio catalítico, mientras que la mayoría de los CBM están unidos a las GH mediante conexiones flexibles. Dependiendo de la funcionalidad prevista, una posición no fija pareciera ser más o menos ventajosa. En el caso de la regulación alostérica, la posición fija de un sitio de unión no catalítico es probablemente crucial. Además, por ejemplo, para orientar el sustrato hacia el surco del sitio activo, una posición aleatoria del sitio de unión no catalítica parece ser menos ventajosa (Cuyvers et al., 2012).

Se ha reportado que los dominios de unión a carbohidratos están implicados en la degradación de celulosa insoluble, y las celulasas que carecen de CBM son capaces de degradar solo las formas solubles de celulosa (Coutinho et al., 1993; Fontes et al., 1997; Bolam et al., 1998). En el análisis de secuencia de las celulasas GH5Cela y GH5CelB no se detectó ningún CBM; por lo tanto, la ausencia de este dominio podría explicar la falta de actividad enzimática hacia las formas de celulosa cristalina como Avicel, PASC y BMCC.

El mecanismo de acción de una enzima está determinado fundamentalmente por la conformación de su sitio catalítico, la cual influye en el tipo de sustrato que es capaz de internalizar para una hidrólisis eficiente. El mecanismo de rGH5Cela se estudió por medio de la visualización por TLC del patrón de productos obtenidos a partir de la hidrólisis de celooligosacáridos y β -glucano de cebada. rGH5Cela fue capaz de hidrolizar solamente celotetraosa liberando celobiosa como producto. Por otro lado, la degradación en el tiempo de β -glucano de cebada genera un patrón de corte con celobiosa, celotriosa, celotetraosa y productos de $GP \geq 5$, indicando que la enzima ataca mayormente los enlaces glicosídicos internos. La formación de oligosacáridos de alto GP pueden observarse desde etapas tempranas de reacción, y los celooligosacáridos se acumulan gradualmente a medida que transcurre el tiempo. Esta disminución en el GP de los productos en el tiempo concuerda con la caracterización de otras GH5 endo- β -1,4-glucanasas (Voget et al., 2006; Bao et al., 2011). De manera similar, para estudiar el mecanismo de reacción de rGH5CelB, se detectaron los productos de hidrólisis de celooligosacáridos, CMC y β -glucano de cebada mediante TLC. Los principales productos de hidrólisis fueron celodextrinas de cadena larga, similar a lo observado en otras GH5 endo- β -1,4-glucanasas (Voget et al., 2006; Nishida

et al., 2007; Geng et al., 2012). Sin embargo, también se detectó glucosa, celobiosa, celotriosa y celotetraosa en los productos de hidrólisis, incluso en la fase temprana de hidrólisis, lo que verificó su actividad sobre *p*NPC. A partir de la de hidrólisis de celooligosacáridos, se concluyó que celotriosa es la longitud mínima requerida para la hidrólisis. Estos resultados sugieren adicionalmente que rGH5CelB es principalmente una endo- β -1,4-glucanasa que podría unirse tanto al interior de la cadena de celulosa como a los extremos de misma y por lo tanto, producir celooligosacáridos de diferentes tamaños. La degradación adicional de β -glucano de cebada también sustenta el modo de acción endo de rGH5CelB. En comparación con CMC, la actividad de GH5CelB fue significativamente mayor sobre β -glucano de cebada con enlaces β -1,3/ β -1,4 (10/90).

La actividad celobiohidrolasa, observada para ambas enzimas sobre *p*NPC, fue confirmada mediante la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,4 de CMC, β -glucano de cebada y celotetraosa con la liberación de celobiosa como productos de reacción visualizados mediante TLC.

Las biomásas lignocelulósicas son recalcitrantes a la hidrólisis enzimática incluso luego del pretratamiento, por lo que el pH y la estabilidad térmica de las enzimas celulolíticas empleadas, en las condiciones óptimas de reacción, son parámetros importantes para que ocurra una hidrólisis eficiente. En relación a las pruebas sobre biomasa pretratada, si bien se emplearon las condiciones óptimas para cada enzima, tanto rGH5CelA como rGH5CelB no presentaron la capacidad de hidrolizar sustratos complejos como lo son el RM, PE y BCA, bajo las condiciones ensayadas. Esto podría deberse a la recalcitrancia y composición de las biomásas utilizadas y a la necesidad de utilizar un complejo enzimático para poder hidrolizarlas. Se ha reportado que para una degradación eficiente de la biomasa celulósica en azúcares simples se necesita de la acción sinérgica de endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Si bien en forma purificada estas células son ineficaces para degradar celulosa individualmente, se ha reportado que pueden realizar modificaciones altamente específicas de la celulosa que podrían ser de alto interés técnico (Henriksson et al., 2005; Srivastava et al., 2018).

Las glicosil hidrolasas de la familia 5 (GH5) son un ejemplo de familia de enzimas que presentan una gran variedad de especificidades. En la actualidad contiene

cerca de 20 actividades enzimáticas determinadas experimentalmente con un número EC (por ej: endo- β -1,4-glucanasa – 3.2.1.4; endo- β -1,4-xilanasas – 3.2.1.8; β -glucosidasa – 3.2.1.21; β -manosidasa – 3.2.1.25; glucan β -1,3-glucosidasa – 3.2.1.58; endo- β -1,4-mananasa – 3.2.1.78; entre otras). La abundancia de las enzimas GH5 en diferentes nichos ecológicos se ha destacado por su frecuente identificación en metagenomas y metatranscriptomas de diversas comunidades microbianas, incluyendo el intestino de termitas (Warnecke et al., 2007a; Elifantz et al., 2008; Hess et al., 2011; He et al., 2013), así como en genomas de organismos individuales (CAZy).

Como se mencionó más arriba, algunas familias GH, tales como la GH5 se dividen en 51 subfamilias. La definición en subfamilias se restringe a clados filogenéticos con cinco o más miembros de diferentes organismos disponibles en las bases de datos públicas de proteínas (GenBank y UniProt) con el fin de capturar la diversidad suficiente para una definición sólida de la subfamilia. Utilizando estos criterios, la tasa de éxito global de la agrupación en subfamilias es de aproximadamente el 80%, es decir, el 20% de las secuencias de GH5 analizadas no se asignaron a subfamilias, aunque algunas de estas proteínas han sido caracterizadas a diferentes niveles (Aspeborg et al., 2012; Wei et al., 2015). Además de las designaciones taxonómicas, fueron incluidas para cada subfamilia las actividades enzimáticas determinadas experimentalmente y las estructuras 3-D. Las enzimas GH5CelA y GH5CelB no pudieron ser asignadas a una subfamilia, debido fundamentalmente a la falta de secuencias suficientemente relacionadas para definir una subfamilia con al menos cinco miembros. Las subfamilias no caracterizadas se encuentran distribuidas a lo largo del árbol filogenético de las GH5 (Aspeborg et al., 2012). Las secuencias que aún no han sido asignadas a una subfamilia, probablemente definen nuevas subfamilias a medida que el número de secuencias disponibles continúe aumentando. En el futuro, posiblemente estas subfamilias nuevas se asignarán gradualmente cuando estén lo suficientemente pobladas.

En un primer análisis filogenético GH5CelA y GH5CelB agruparon con las secuencias caracterizadas de la subfamilia 25 depositadas en la base de datos CAZy con un soporte del 50%. Sin embargo, la clasificación en subfamilia requiere un soporte superior al 80% (Chen et al., 2012a). Un segundo análisis filogenético, que incluía todas las secuencias proteicas depositadas de la subfamilia 25, se evidenció que

tanto GH5CelA y GH5CelB no pertenecerían a la misma ya que agrupaban solas en un *cluster* separado. A pesar del alto nivel de similitud en el dominio catalítico con otras GH de la familia de la 5, el análisis filogenético reveló que GH5CelA y GH5CelB están separadas filogenéticamente de las subfamilias descritas hasta el momento, indicando que podrían ser parte de una nueva subfamilia no descrita.

El modelado molecular de rGH5CelA y rGH5CelB permitió confirmar la estructura terciaria e identificar los residuos claves que forman parte del sitio activo. Las secuencias aminoacídicas de ambas enzimas presentaron un único módulo catalítico y un sitio conservado para las glicosil hidrolasas de la familia 5 (GH5). A su vez, se determinó que carecen de dominios de unión a sustratos (CBM) y presentan una estructura típica de barril (β/α)₈ (TIM-*barrel*) que consiste en un núcleo compuesto de ocho hojas- β paralelas rodeadas por ocho α -hélices, donde el sitio activo tiene una topología de hendidura (Dominguez et al., 1995; Delsaute et al., 2013). Los residuos E146 y E288 (de la proteína madura) fueron identificados como la díada catalítica de rGH5CelA, mientras que los residuos E130 y E272 en rGH5CelB. En relación a esto, los residuos de glutamato juegan un rol importante en las reacciones catalíticas mediadas por las GH5 y se encuentran conservados dentro del motivo de la familia. Los glutamatos E146 y E130 están propuestos como los residuos catalíticos donores de protones (Glu A/B) mientras que E288 y E277 como los residuos nucleofílicos (Glu Nuc) para GH5CelA y GH5CelB, respectivamente (Dominguez et al., 1995; Tseng et al., 2011; Badieyan et al., 2012)

El valor de pH en un segmento dado del intestino de las termitas influye en la acción de cualquier enzima secretada en ese lugar. Además, puede influir en la solubilidad del alimento ingerido, la toxicidad de algunas toxinas generadas, y sobre los microorganismos endosimbiontes del intestino. Trabajos previos reportaron que en el intestino posterior de termitas los valores de pH el muestran una neutralidad de 6,2 a 7,6, pero pueden sufrir alteraciones con los cambios ambientales (Navodita & Erdei, 2018). Por ejemplo, el intestino posterior de la casta obrera de la termita de *C. formosanus* exhibe un pH ácido que varía en el rango de 5-7. Esto es debido a la producción de ácido acético, que es utilizado por las termitas como una fuente de energía, como así también por la ausencia de agentes *buffers* que alteren el pH (Ke & Chen, 2014). Muchos procesos industriales que involucran celulasas utilizan

condiciones extremas de pH para evitar la contaminación por otras bacterias (Dong et al., 2010). Por lo tanto, estos procesos requieren a menudo enzimas acidófilas para degradar los sustratos. Si se utilizan enzimas neutras en los procesos, el sistema de fermentación debe ajustarse a las condiciones de pH neutro, y esto no es rentable e ineficiente para un entorno de producción (Turner et al., 2007). Por ello, las enzimas acidófilas y son estables en un amplio rango de pH y temperatura podrían utilizarse en diversos procesos industriales. El intestino de termitas, debido entre otras factores al rango de pH que presenta es considerado como un ambiente propicio para la prospección de enzimas glicosil hidrolasas con aplicaciones biotecnológicas, las cuales podrían complementar a las comerciales de origen fúngico, usualmente utilizadas.

En la actualidad, las endoglucanasas (1,3-1,4-endoglucanasas) han despertado interés debido a sus posibles aplicaciones industriales, incluyendo la conversión de biomasa en azúcares fermentables para la producción de bioetanol, la remoción de β -glucano para reducir la viscosidad e incrementar la tasa de filtración en la producción de cerveza y en la mejora en la digestibilidad en las dietas a base harina de soja o cebada utilizada en pollos y cerdos (Sun et al., 2012; Kim et al., 2013; Anwar et al., 2014; Pan et al., 2018). Su capacidad de producir celooligosacáridos (COS) a partir de biomasa también reviste interés biotecnológico. Estos oligosacáridos han sido reportados como potenciales prebióticos, regulando la composición bacteriana intestinal, modificando los procesos fermentativos y posiblemente mejorando la salud del huésped (Zhao et al., 2012; Jiao et al., 2014; Cheng et al., 2017). Debido al enlace beta-1,4-glucosídico entre los monómeros de glucosa, los COS son resistentes a las enzimas digestivas del huésped y a su vez sirven como sustrato para la microflora intestinal (Otsuka et al., 2004; Hasunuma et al., 2011; Kido et al., 2016). Las endo- β -1,4-glucanasas caracterizadas en este trabajo, al presentar perfiles de hidrólisis diferentes podrían ser utilizadas, junto a otras enzimas de forma sinérgica, en diversos procesos para la generación de productos de valor agregado a partir de biomasa lignocelulósicas. En el caso de rGH5CelA, al liberar celooligosacáridos de distintos grados de polimerización podría utilizarse para la producción de los mismos. Por otro lado rGH5CelB, al producir glucosa como producto de hidrólisis, podría ser utilizada en un complejo enzimático para la producción de bioetanol lignocelulósico.

III.8 Conclusiones

En esta sección se caracterizaron dos enzimas provenientes de la microbiota intestinal de las termitas nativas superiores de Argentina *N. aquilinus* y *C. fulviceps* se expresaron en el sistema *E. coli* y purificaron. En base a la similitud secuencia, se determinó que pertenecían a la familia GH5 y se nombraron GH5CelA y GH5CelB. Ambas enzimas recombinantes mostraron actividad a temperatura moderada y tolerancia a pHs ácidos. Los resultados relativos a la especificidad de sustrato indicarían que rGH5CelA y rGH5CelB hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos de las regiones amorfas de la celulosa y, en consecuencia, funcionan como endo- β -1,4-glucanasas. La cinética enzimática y el perfil de los productos de hidrólisis generados (COS) mostraron diferencias entre ellas, lo que podría determinar su utilización en diferentes procesos de interés biotecnológicos, como la producción de biocombustibles de segunda generación y prebióticos.

Conclusiones generales

CONCLUSIONES GENERALES

De los resultados obtenidos del presente estudio sobre “Análisis del Microbioma de Insectos: Identificación y Caracterización de Glicosil Hidrolasas” se han elaborado por capítulos las siguientes **conclusiones**:

1. Mediante la secuenciación masiva de la región hipervariable V3-V4 del gen ARNr 16S, se demostró que los cambios en la composición de la dieta influyen en la estructura de la comunidad microbiana y en el perfil de las actividades hidrolíticas presente en el intestino de *A. grandis*.
2. Se determinó que los extractos intestinales de dos termitas nativas con diferentes hábitos alimenticios, *Cortaritermes fulviceps* (suelo) y *Nasutitermes aquilinus* (madera), presentaron actividad celulolítica y hemicelulolítica. Dicha actividad se relacionó con la presencia de enzimas endógenas y de endosimbiontes. El análisis de la diversidad de microorganismos cultivables reveló la presencia de géneros bacterianos diferentes para cada especie de termita. Estos resultados constituyen una primera aproximación al estudio de los endosimbiontes bacterianos de termitas nativas argentinas, así como su posible aplicación en la degradación de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol.
3. Se clonaron y expresaron dos enzimas provenientes de la microbiota intestinal de las termitas nativas *N. aquilinus* y *C. fulviceps*. La expresión recombinante caracterización bioquímica de GH5CelA y GH5CelB, permitió confirmar la actividad endo- β -1,4-glucanasa de las mismas. Ambas enzimas mostraron actividad a temperatura moderada y tolerancia a pHs ácidos. Las diferencias encontradas en la cinética enzimática y el perfil de los celooligosacáridos generados como producto de hidrólisis, podría determinar su utilización en diferentes procesos de interés biotecnológicos como la producción de biocombustibles de segunda generación y prebióticos.

Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T., Bignell, D.E. & Higashi, M. 2000. *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht: Springer.
- Abidi, N., Cabrales, L. & Hequet, E. 2010. Fourier transform infrared spectroscopic approach to the study of the secondary cell wall development in cotton fiber. *Cellulose* 17(2): 309–320.
- Abidi, N., Hequet, E., Cabrales, L., Gannaway, J., Wilkins, T. & Wells, L.W.. 2008. Evaluating cell wall structure and composition of developing cotton fibers using Fourier transform infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis. *Appl. Polym. Sci.* 107(1): 476–486.
- Achinas, S., and Euverink, G.J.W. 2016. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electron. J. Biotechnol.* 23: 44–53.
- Adlakha, N., Rajagopa, R., Kumar, S., Reddy, V.S. & Yazdani, S.S. 2011. Synthesis and characterization of chimeric proteins based on cellulase and xylanase from an insect gut bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(14): 4859–4866.
- Anand, A.A.P., Vennison, S.J., Sankar, S.G., Prabhu, D.I.G., Vasan, P.T., Raghuraman, T., Geoffrey, C.J. & Vendan, S.E. 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J. Insect Sci.* 10(107): 107.
- Anwar, Z., Gulfranz, M. & Irshad, M. 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7(2): 163–173.
- Appel, H.M. & Martin, M.M. 1990. Gut redox conditions in herbivorous lepidopteran larvae. *J. Chem. Ecol.* 16(12): 3277–3290.
- Arias-Cordero, E., Ping, L., Reichwald, K., Delb, H., Platzer, M. & Boland, W. 2012. Comparative Evaluation of the Gut Microbiota Associated with the Below- and Above-Ground Life Stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani*. *PLoS One* 7(12).
- Aspeborg, H., Coutinho, P.M., Wang, Y., Brumer, H. & Henrissat, B. 2012. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evol. Biol.* 12(1): 1.
- Atalla, R.H., Hackney, J.M., Uhlin, I. & Thompson, N.S. 1993. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* 15(2): 109–112.
- Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B. & Paës, G. 2017. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 10(1): 1–16.
- Badieyan, S., Bevan, D.R. & Zhang, C. 2012. Study and design of stability in GH5 cellulases. *Biotechnol. Bioeng.* 109(1): 31–44.
- Bajpai, P. 2014. Xylan: Occurrence and Structure. *Xylanolytic Enzym.* (may 1997): 9–18.
- Balat, M., Balat, H. & Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34(5): 551–573.
- Ballesteros, M. 2010. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. p. 159–177. *In* Waldron, K.B.T.-B.P. (ed.), *Woodhead Publishing Series in Energy*. Woodhead Publishing.
- Bao, L., Huang, Q., Chang, L., Zhou, J. & Lu, H. 2011. Screening and characterization of a cellulase with endocellulase and exocellulase activity from yak rumen metagenome. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 73(1-4): 104–110.
- Barakat, A., de Vries, H. & Rouau, X. 2013. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresour. Technol.* 134: 362–373.

- Bastien, G., Arnal, G., Bozonnet, S., Laguerre, S., Ferreira, F., Fauré, R., Henrissat, B., Lefèvre, F., Robe, P., Bouchez, O., Noirot, C., Dumon, C. & O'Donohue, M. 2013. Mining for hemicellulases in the fungus-growing termite *Pseudacanthotermes militaris* using functional metagenomics. *Biotechnol. Biofuels* 6(1): 1–15.
- Batista-García, R.A., del Rayo Sánchez-Carbente, M., Talia, P., Jackson, S.A., O'Leary, N.D., Dobson, A.D.W. & Folch-Mallol, J.L. 2016. From lignocellulosic metagenomes to lignocellulolytic genes: trends, challenges and future prospects. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 10: 864–882.
- Bayer, E.A., Belaich, J.P., Shoham, Y. & Lamed, R. 2004. The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58(1): 521–554
- Bechtold, R., Gonzalez, A.E., Almendros, G., Martinez, M.J. & Martinez, A.T. 1993. Lignin Alteration By *Ganoderma-Australe* and Other White-Rot Fungi After Solid-State Fermentation of Beech Wood. *Holzforschung* 47(2): 91–96.
- Béguin, P. & Aubert, J. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS microbiology reviews* 13, 25.
- Ben Guerrero, E., Arneodo, J., Campanha, R.B., De Oliveira, P.A., Labate, M.T.V., Cataldi, T.R., Campos, E., Cataldi, A., Labate, C.A., Rodrigues, C.M. & Talia, P. 2015. Prospection and evaluation of (Hemi) cellulolytic enzymes using untreated and pretreated biomasses in two Argentinean native termites. *PLoS One* 10(8): 1–23.
- Ben Guerrero, E., Soria, M., Salvador, R., Ceja-Navarro, J.A., Campos, E., Brodie, E.L. & Talia, P. 2016. Effect of Different Lignocellulosic Diets on Bacterial Microbiota and Hydrolytic Enzyme Activities in the Gut of the Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). *Front. Microbiol.* 7:2093.
- Benjamino, J. & Graf, J. 2016. Characterization of the Core and Caste-Specific Microbiota in the Termite, *Reticulitermes flavipes*. *Front. Microbiol.* 7: 171
- Berlin, A. 2013. No Barriers to Cellulose Breakdown. *Science* . 342(6165): 1454–1456.
- Bertino-Grimaldi, D., Medeiros, M.N., Vieira, R.P., Cardoso, A.M., Turque, A.S., Silveira, C.B., Albano, R.M., Bressan-Nascimento, S., Garcia, E.S., de Souza, W., Martins, O.B. & Machado, E.A. 2013. Bacterial community composition shifts in the gut of *Periplaneta americana* fed on different lignocellulosic materials. *Springerplus* 2(1): 609
- Beyenbach, K.W., Skaer, H. & Dow, J.A.T. 2010. The Developmental, Molecular, and Transport Biology of Malpighian Tubules. *Annu. Rev. Entomol.* 55(1): 351–374.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18(5): 355–383.
- Bhatia, S.K., Kim, S.H., Yoon, J.J. & Yang, Y.H. 2017. Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. *Energy convers. manage.* 148:1142-1156.
- Bignell, D.E. 2011. Morphology, Physiology, Biochemistry and Functional Design of the Termite Gut: An Evolutionary Wonderland. p. 375–412. *In* Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (eds.), Springer Netherlands, Dordrecht.
- Boga, H.I. & Brune, A. 2003. Hydrogen-Dependent Oxygen Reduction by Homoacetogenic Bacteria Isolated from Termite Guts Hydrogen-Dependent Oxygen Reduction by Homoacetogenic Bacteria Isolated from Termite Guts. *Society* 69(2): 779–786.
- Bolam, D.N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P. & Gilbert, H.J. 1998. *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem. J.* 331(3): 775–781.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J. & Davies, G.J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382(3): 769–781.
- Borges, T.A., De Souza, A.T., Squina, F.M., Riaño-Pachón, D.M., Dos Santos, R.A.C., Machado,

- E., Oliveira, J.V.D.C., Damásio, A.R.L. & Goldman, G.H. 2014. Biochemical characterization of an endoxylanase from *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov. strain GHG001 isolated from the intestinal tract of Chrysomelidae larvae associated to sugarcane roots. *Process Biochem.* 49(1): 77–83.
- Boucias, D.G., Cai, Y., Sun, Y., Lietze, V.U., Sen, R., Raychoudhury, R. & Scharf, M.E. 2013. The hindgut lumen prokaryotic microbiota of the termite *Reticulitermes flavipes* and its responses to dietary lignocellulose composition. *Mol. Ecol.* 22(7): 1836–1853.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M.T. & Pont-Lezica, R. 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5(1): 212–21.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72.
- Brennan, Y., Callen, W.N., Christoffersen, L., Dupree, P., Goubet, F., Healey, S., Hernandez, M., Keller, M., Li, K., Palackal, N., Sittenfeld, A., Tamayo, G., Wells, S., Hazlewood, G.P., Mathur, E.J., Short, J.M., Robertson, D.E. & Steer, B.A.. 2004. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl Env. Microbiol* 70.
- Breznak, J.A. & Switzer, J.M. 1986. Acetate synthesis from H₂ plus CO₂ by termite gut microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(4): 623–630.
- Brune, A. 2007. Woodworker 's digest. *Nature* 450(November): 487–488.
- Brune, A. 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(3): 168–180.
- Brune, A. & Friedrich, M. 2000. Microecology of the termite gut: Structure and function on a microscale. *Curr. Opin. Microbiol.* 3(3): 263–269.
- Brune, A. & Ohkuma, M. 2010. Role of the Termite Gut Microbiota in Symbiotic Digestion. p. 439–475. *In* Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (eds.), *Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Burnum, K.E., Callister, S.J., Nicora, C.D., Purvine S.O., Hugenholtz, P., Warnecke, F., Scheffrahn, R.H., Smith, R.D. & Lipton, M.S. 2011. Proteome insights into the symbiotic relationship between a captive colony of *Nasutitermes corniger* and its hindgut microbiome. *ISME J* 5.
- Butera, G., Ferraro, C., Alonzo, G., Colazza, S. & Quatrini, P. 2016. The gut microbiota of the wood-feeding termite *Reticulitermes lucifugus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *Ann. Microbiol.* 66(1): 253–260.
- Buxton, D.R. & Redfearn, D.D. 1997. Plant Limitations to Fiber Digestion and Utilization. *J. Nutr.* 127(5): 819S–823S.
- Byeon, G.M., Lee, K.S., Gui, Z.Z., Kim, I., Kang, P.D., Lee, S.M., Sohn, H.D. & Jin, B.R. 2005. A digestive beta-glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 141(4): 418–427.
- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Watanabe H., Cano-Camacho, H. & Oyama, K. 2012. Endogenous Plant Cell Wall Digestion: A Key Mechanism in Insect Evolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43(1): 45–71.
- Calderón-Cortés, N., H. Watanabe, H. Cano-Camacho, Zavala-Páramo, G. & M. Quesada. 2010. CDNA cloning, homology modelling and evolutionary insights into novel endogenous cellulases of the borer beetle *Oncideres albomarginata chamela* (Cerambycidae). *Insect Mol. Biol.* 19(3): 323–336.
- Campbell, B.C., Bragg, T.S. & Turner, C.E. 1992. Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (Coleoptera: curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22(5): 415–421.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. & Knight, R. 2012.

Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6(8): 1621–1624

- Cardoso, A.M., Cavalcante, J.J.V., Vieira, R.P., Lima, J.L., Grieco, M.A.B., Clementino, M.M., Vasconcelos, A.T.R., Garcia, E.S., de Souza, W., Albano, R.M. & Martins, O.B. 2012. Gut bacterial communities in the giant land snail *Achatina fulica* and their modification by sugarcane-based diet. *PLoS One* 7(3): 1–6.
- de Carvalho, L.M.J., de Castro, I.M. & da Silva, C.A.B. 2008. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro- and ultra-filtration. *J. Food Eng.* 87(4): 447–454.
- Cazemier, A.E., Hackstein, J.H.P., Op den Camp, H.J.M., Rosenberg, J. & van der Drift, C. 1997. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. *Microb. Ecol.* 33: 189–197.
- Fiorani Celedon, P.A., de Andrade, A., Meireles, K.G.X., de Carvalho, M.C.D.C.G., Caldas, D.G.G., Moon, D.H., Carneiro, R.T., Franceschini, L.M., Oda, S. & Labate, C.A. 2007. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. *Proteomics* 7(13): 2258–2274.
- Chandrasekharaiah, M., Thulasi, A., Bagath, M., Kumar, D.P., Santosh, S.S., Palanivel, C., Jose, V.L. & Sampath, K.T. 2011. Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase enzyme from the symbionts of termite (*Coptotermes formosanus*) gut. *BMB Rep.* 44(1): 52–57.
- Chang, C.J., Wu, C.P., Lu, S.C., Chao, A.L., Ho, T.H.D., Yu, S.M. & Chao, Y.C. 2012. A novel exocellulase from white spotted longhorn beetle (*Anoplophora malasiaca*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42(9): 629–636.
- Chapman, R.F. 1998. *The Insects: Structure & function* (S.J. Simpson & A.E. Douglas, Eds.). 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen, H. 2014. *Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice*.
- Chen, Z., Friedland, G.D., Pereira, J.H., Reveco, S.A., Chan, R., Park, J.I., Thelen, M.P., Adams, P.D., Arkin, A.P., Keasling, J.D., Blanch, H.W., Simmons, B.A., Sale, K.L., Chivian, D. & Chhabra, S.R. 2012a. Tracing determinants of dual substrate specificity in glycoside hydrolase family 5. *J. Biol. Chem.* 287(30): 25335–25343.
- Chen, W.H., Lin, T.S., Guo, G.L. & Huang, W.S. 2012b. Ethanol production from rice straw hydrolysates by *Pichia stipitis*. *Energy Procedia* 14: 1261–1266.
- Cheng, W., Lu, J., Li, B., Lin, W., Zhang, Z., Wei, X., Sun, C., Chi, M., Bi, W., Yang, B., Jiang, A. & Yuan, J. 2017. Effect of functional oligosaccharides and ordinary dietary fiber on intestinal microbiota diversity. *Front. Microbiol.* 8(SEP): 1–11.
- Cockburn, D., Wilkens, C., Ruzanski, C., Andersen, S., Willum Nielsen, J., Smith, A.M., Field, R.A., Willemoës, M., Abou Hachem, M. & Svensson, B. 2014. Analysis of surface binding sites (SBSs) in carbohydrate active enzymes with focus on glycoside hydrolase families 13 and 77 - a mini-review. *Biol.* 69(6): 705–712.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R. & Tiedje, J.M. 2014. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42(D1): 633–642.
- Collins, T., Gerday, C. & Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(1): 3–23.
- Colman, D.R., Toolson, E.C. & Takacs-Vesbach, C.D. 2012. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol. Ecol.* 21(20): 5124–5137.
- Coutinho, J.B., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. & Miller, R.C. 1993. The nature of the cellulose-binding domain effects the activities of a bacterial endoglucanase on different forms of cellulose. *FEMS Microbiol. Lett.* 113(2): 211–217.
- Couturier, M. & Berrin, J.G. 2013. *The Saccharification Step: The Main Enzymatic Components* (V. Faraco, Ed.).

- Coy, M.R., Salem, T.Z., Denton, J.S., Kovaleva, E.S., Liu, Z., Barber, D.S., Campbell, J.H., Davis, D.C., Buchman, G.W., Boucias, D.G. & Scharf, M.E. 2010. Phenol-oxidizing laccases from the termite gut. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 723–732.
- Cunha, I.S., Barreto, C.C., Costa, O.Y.A., Bomfim, M.A., Castro, A.P., Kruger, R.H. & Quirino, B.F. 2011. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. *Anaerobe* 17(3): 118–124.
- Curtis, T.P. & Sloan, W.T. 2004. Prokaryotic diversity and its limits: Microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(3): 221–226.
- Cuyvers, S., Dornez, E., Delcour, J.A. & Courtin, C.M. 2012. Occurrence and functional significance of secondary carbohydrate binding sites in glycoside hydrolases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32(2): 93–107.
- Cuyvers, S., Dornez, E., Rezaei, M.N., Pollet, A., Delcour, J.A. & Courtin, C.M. 2011. Secondary substrate binding strongly affects activity and binding affinity of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* GH11 xylanases. *FEBS J.* 278(7): 1098–1111.
- Cvikrová, M., Malá, J., Hrubcová, M. & Eder, J. 2006. Soluble and cell wall-bound phenolics and lignin in *Ascoscalyx abietina* infected Norway spruces. *Plant Sci.* 170(3): 563–570.
- Dale C, Plague GR, Wang B, Ochman, H. & Moran, N.A. 2002. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *P Natl Acad Sci USA* 99: 12397–12402.
- Davison, A. & Blaxter, M. 2005. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. *Mol. Biol. Evol.* 22(5): 1273–1284.
- Delalibera, I., Handelsman, J. & Raffa, K.F. 2005. Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34(3): 541–547.
- Delsaute, M., Berlemont, R., Dehareng, D., Van Elder, D., Galleni, M. & Bauvois, C. 2013. Three-dimensional structure of RBcel1, a metagenome-derived psychrotolerant family GH5 endoglucanase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69(8): 828–833.
- Deusch, S., Camarinha-Silva, A., Conrad, J., Beifuss, U., Rodehutschord, M. & Seifert, J. 2017. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Front. Microbiol.* 8(Aug): 1–21.
- Dien, B.S., Cotta, M.A. & Jeffries, T.W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(3): 258–266.
- Dietrich, C., Köhler, T. & Brune, A. 2014. The cockroach origin of the termite gut microbiota: Patterns in bacterial community structure reflect major evolutionary events. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(7): 2261–2269.
- Dillon, R.J. & Dillon, V.M. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49(1): 71–92.
- Do, T.H., Nguyen, T.T., Nguyen, T.N., Le, Q.G., Nguyen, C., Kimura, K. & Truong, N.H. 2014. Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 6, 665–671.
- Doi, R.H. & Kosugi, A. 2004. Cellulosomes: Plant cell wall degrading enzyme complexes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(7): 541–551.
- Dominguez, R., Souchon, H., Spinelli, S., Dauter, Z., Wilson, K.S., Chauvaux, S., Béguin, P. & Alzari, P.M. 1995. A Common Protein Fold and Similar Active-Site in 2 Distinct Families of Beta-Glycanases. *Nature* 2(11): 983–989.
- Dong, J., Hong, Y., Shao, Z. & Liu, Z. 2010. Molecular cloning, purification, and characterization of a novel, acidic, pH-stable endoglucanase from *Marteella mediterranea*. *J. Microbiol.* 48(3): 393–398.
- Dorado, J., Almendros, G., Camarero, S., Martínez, A.T., Vares, T. & Hatakka, A. 1999. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four

- ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 25(7): 605–612.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. Isolation of DNA from fresh plant tissue. *Focus.* 12: 13-15.
- Dutta, S. & Wu, K.C.W.. 2014. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. *Green Chem.* 16(11): 4615–4626.
- Egert, M., Marhan, S., Wagner, B., Scheu, S. & Friedrich, M.W. 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* 48(2): 187–197.
- Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, J. & Kouno, K. 2012. Isolation and Characterization of Cellulose-decomposing Bacteria Inhabiting Sawdust and Coffee Residue Composts. *Microbes Environ.* 27(3): 226–233.
- Ekperigin, M.M. 2007. Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* & *Branhamella* sp. *African J Biotechnol* 6(1): 28–33.
- Elena, C., Ravasi, P., Castelli, M.E., Peirú, S. & Menzella, H.G. 2014. Expression of codon optimized genes in microbial systems: Current industrial applications and perspectives. *Front. Microbiol.* 5(Feb): 1–8.
- Elifantz, H., Waidner, L.A., Michelou, V.K., Cottrell, M.T & Kirchman, D.L. 2008. Diversity and abundance of glycosyl hydrolase family 5 in the North Atlantic Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63(3): 316–327.
- Endo, K., Hakamada, Y., Takizawa, S., Kubota, H., Sumitomo, N., Kobayashi, T. & Ito, S. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: Enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(1-2): 109–116.
- Engel, P. & Moran, N.A. 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(5): 699–735.
- Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya, L.V. & Okoh, A.I. 2017. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen* 6(1): 1–14.
- Fernández-Sandoval, M.T., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martinez, B., Bustos, P., González, V., Bolivar, F., Gosset, G. & Martinez, A. 2012. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96(5): 1291–1300.
- Ferreira-Leitao, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Nepomuceno, A.L., Molinari, H.B.C. & Bon, E.P.S. 2010. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. *Waste and Biomass Valorization* 1(1): 65–76.
- Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C. & Joshi, C.P. 2007. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian J. Plant Physiol.* 19(1): 1–13.
- Firmino, A.A.P., Campos de Assis Fonseca, F., de Macedo, L.L.P., Coelho, R.R., de Souza Jr, J.D.A.S., Togawa, R.C., Silva-Junior, O.B., Pappas-Jr, G.J., Da Silva, M.C.M., Engler, G. & Grossi-de-Sa, M.F. 2013. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *PLoS One* 8(12).
- Fischer, R., Ostafe, R. & Twyman, R.M. 2013. Cellulases from insects. p. 51–64. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.
- Fontes, L.R. & Terra, P. dos S.. 1981. A study on the taxonomy and biology of the Neotropical termite *Nasutitermes aquilinus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Rev. Bras. Entomol.* 25(3): 171–183.
- Fontes, C.M., Clarke, J., Hazlewood, G.P., Fernandes, T.H., Gilbert, H.J. & Ferreira, L. 1997. Possible roles for a non-modular thermostable and proteinase-resistant cellulase from the mesophilic aerobic soil bacterium *Cellvibrio mixtus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48(4):473-479.
- Forsberg, Z., Vaaje-kolstad, G., Westereng, B., Bunsæ, A.C., Stenstrøm, Y., Mackenzie, A., Sørli, M., Horn, S.J. & Eijsink, V.G.H. 2011. Cleavage of cellulose by a cbm33 protein.

- Protein Sci. 20(9): 1479–1483.
- Franzini, P.Z.N., Ramond, J.B., Scholtz, C.H., Sole, C.L., Ronca, S. & Cowan, D.A. 2016. The Gut Microbiomes of Two *Pachysoma* MacLeay Desert Dung Beetle Species (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) Feeding on Different Diets. PLoS One 11(8): e0161118
- Fry, S.C. 1988. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. New York 203: 333.
- Fujii, K., Ikeda, K. & Yoshida, S.. 2012a. Isolation and characterization of aerobic microorganisms with cellulolytic activity in the gut of endogeic earthworms. Int. Microbiol. 15(3): 121–130.
- Fujii, K., Oosugi, A. & Sekiuchi, S. 2012b. Cellulolytic Microbes in the Yanbaru, a Subtropical Rainforest with an Endemic Biota on Okinawa Island, Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76(5): 906–911.
- Fujita, A., Hojo, M., Aoyagi, T., Hayashi, Y., Arakawa, G., Tokuda, G. & Watanabe, H. 2010. Details of the digestive system in the midgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. J. Wood Sci. 56(3): 222–226.
- Galbe, M. & Zacchi, G. 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. Biomass and Bioenergy 46: 70–78.
- Garg, R., Srivastava, R., Brahma, V., Verma, L., Karthikeyan, S. & Sahni, G. 2016. Biochemical and structural characterization of a novel halotolerant cellulase from soil metagenome. Sci. Rep. 6(Dec): 1–15.
- Gayatri Priya, N., Ojha, A., Kajla, M.K., Raj, A. & Rajagopal, R. 2012. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. PLoS One 7(1): 1–10.
- Geib, S.M., Jimenez-Gasco, M.D.M., Carlson, J.E., Tien, M. & Hoover, K. 2009. Effect of host tree species on cellulase activity and bacterial community composition in the gut of larval *Asian longhorned* beetle. Environ. Entomol. 38(3): 686–699.
- Geib, S.M., Tien, M. & Hoover, K. 2010. Identification of proteins involved in lignocellulose degradation using in gel zymogram analysis combined with mass spectroscopy-based peptide analysis of gut proteins from larval *Asian longhorned* beetles, *Anoplophora glabripennis*. Insect Sci. v. 17: 253–264.
- Geng, A., Zou, G., Yan, X., Wang, Q., Zhang, J., Liu, F., Zhu, B. & Zhou, Z. 2012. Expression and characterization of a novel metagenome-derived cellulase Exo2b and its application to improve cellulase activity in *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96(4): 951–962.
- Ghio, S., Insani, E.M., Piccinni, F.E., Talia, P.M., Grasso, D.H. & Campos, E. 2016. GH10 XynA is the main xylanase identified in the crude enzymatic extract of *Paenibacillus* sp. A59 when grown on xylan or lignocellulosic biomass. Microbiol. Res. 186-187: 16–26.
- Ghio, S., Ontañón, O., Piccinni, F.E., Marrero Díaz de Villegas, R., Talia, P., Grasso, D.H. & Campos, E. 2018. *Paenibacillus* sp. A59 GH10 and GH11 Extracellular Endoxylanases: Application in Biomass Bioconversion. Bioenergy Res. 11(1): 174–190.
- Gilbert, H.J., Stalbrand, H. & Brumer, H. (2008). How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. Curr Opin Plant Biol, 11 (3): 338-48.
- Gilbert, J., Li, L.L., Taghavi, S., McCorkle, S.M., Tringe, S. & van der Lelie, D. 2012. Bioprospecting Metagenomics for New Glycoside Hydrolases. p. 141–151. In Himmel, M.E. (ed.), Biomass Conversion: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ.
- Gillott, C. 2005a. Food Uptake and Utilization. p. 487–513. In Entomology. Springer Netherlands.
- Gillott, C. 2005b. Entomology. Third Edition.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. & Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresour. Technol. 101(13): 4775–4800.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications) Agriculture Handbook N° 379. Agric. Res. Serv. Washingt. DC: 20

- pp.
- Golaki, B.P., Aminzadeh, S., Karkhane, A.A., Yakhchali, B., Farrokh, P., Khaleghinejad, S.H., Tehrani, A.A. & Mehrpooyan, S. 2015. Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous *Cohnella* sp. A01. *Protein Expr. Purif.* 109(Oct): 120–126.
- Grabber, J.H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* 45(3): 820–831.
- Haitjema, C.H., Solomon, K. V., Henske, J.K., Theodorou, M.K. & O'Malley, M.A. 2014. Anaerobic gut fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnol. Bioeng.* 111(8): 1471–1482.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Han, Q., Liu, N., Robinson, H., Cao, L., Qian, C., Wang, Q., Xie, L., Ding, H., Wang, Q., Huang, Y., Li, J. & Zhou, Z. 2013. Biochemical characterization and crystal structure of a GH10 xylanase from termite gut bacteria reveal a novel structural feature and significance of its bacterial Ig-like domain. *Biotechnol. Bioeng.* 110(12): 3093–3103.
- Hasunuma, T., Kawashima, K., Nakayama, H., Murakami, T., Kanagawa, H., Ishii, T., Akiyama, K., Yasuda, K., Terada, F. & Kushibiki, S. 2011. Effect of cellooligosaccharide or synbiotic feeding on growth performance, fecal condition and hormone concentrations in Holstein calves. *Anim. Sci. J.* 82(4): 543–548.
- He, S., Ivanova, N., Kirton, E., Allgaier, M., Bergin, C., Scheffrahn, R.H., Kyrpides, N.C., Warnecke, F., Tringe, S.G. & Hugenholtz, P. 2013. Comparative Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of Hindgut Paunch Microbiota in Wood- and Dung-Feeding Higher Termites. *PLoS One* 8(4).
- Hedin, P. & Lindig, O. 1978. Suppressants of gut bacteria in the boll weevil from the cotton plant. *J. Econ. Entomol.* 71: 394–396.
- Henriksson, G., Christiernin, M. & Agnemo, R. 2005. Monocomponent endoglucanase treatment increases the reactivity of softwood sulphite dissolving pulp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32(5): 211–214.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293(January): 781–788.
- Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T.W., Chokhawala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D.S., Chen, F., Zhang, T., Mackie, R.I., Pennacchio, L.A., Tringe, S.G., Visel, A., Woyke, T., Wang, Z. & Rubin, E.M. 2011. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science* (80-.). 331(6016): 463–467.
- Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T. & Sawayama, S. 2009. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresour. Technol.* 100(10): 2706–2711.
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. & Foust, T.D. 2007. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* (80-.). 315(5813): 804 LP – 807.
- Hinterstoisser, B., Jalkanen, R., Nowotny, M. & Schwanninger, M. 2001. Lignification of Scots pine trees from Arctic Circle up to timberline. *Buvisindi No.14*: 55–59.
- Hongoh, Y. 2011. Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. *Cell. Mol. Life Sci.* 68(8): 1311–1325.
- Hongoh, Y., Deevong, P., Inoue, T., Moriya, S., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., Noparatnaraporn, N. & Kudo, T. 2005. Intra- and Interspecific Comparisons of Bacterial Diversity and Community Structure Support Coevolution of Gut Microbiota and Termite Host Intra- and Interspecific Comparisons of Bacterial Diversity and Community Structure Support Coevolution of Gut Micro. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11): 6590–6599.
- Hongoh, Y., Ekpornprasit, L., Inoue, T., Moriya, S., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., Noparatnaraporn, N. & Kudo, T. 2006. Intracolony variation of bacterial gut microbiota

- among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. *Mol. Ecol.* 15(2): 505–516.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. & Eijsink, V.G. 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 5(1): 45.
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y. & Fukatsu, T. 2007. How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect-bacterium mutualism? *Mol. Ecol.* 16(24): 5316–5325.
- Huang, Y., Baker R. & Vane, L. 2010. Low-Energy Distillation-Membrane Separation Process. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49(8): 3760–3768.
- Huang, S., Sheng, P. & Zhang, H. 2012. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int. J. Mol. Sci.* 13(3): 2563–2577.
- Humbird, D., Davis, R.E., Tao, L., Kinchin, C.M., Hsu, D.D., Aden, A., Schoen, P., Lukas, J., Olthof, B., Worley, M., Sexton, D. & Dudgeon, D. 2011. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *Renew. Energy* 303(May): 147.
- Husseneder, C., Ho, H.Y. & Blackwell, M. 2010. Comparison of the Bacterial Symbiont Composition of the Formosan Subterranean Termite from its Native and Introduced Range. *Open Microbiol. J.* 4: 53–66.
- Hyodo, F., Tayasu, I., Inoue, T., Azuma, J.I., Kudo, T. & Abe, T. 2003. Differential role of symbiotic fungi in lignin degradation and food provision for fungus-growing termites (Macrotermitinae: Isoptera). *Funct. Ecol.* 17(2): 186–193.
- Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W. & Preston, J.F. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(10): 2420–2425.
- Jaishree, P., Aditi, S. & Ajit, V. 1986. In Vitro Studies of Cellulose Digesting Properties of *Staphylococcus Saprophyticus* Isolated from Termite Gut. *Curr. Sci.* 55(15): 710–714.
- Jayani, R.S., Saxena, S. & Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40(9): 2931–2944.
- Jiang, H.Y., Ma, J.E., Li, J., Zhang, X.J., Li, L.M., He, N., Liu, H.Y., Luo, S.Y., Wu, Z.J., Han, R.C. & Chen, J.P. 2017. Diets alter the gut microbiome of crocodile lizards. *Front. Microbiol.* 8(OCT): 1–11.
- Jiao, L.F., Song, Z.H., Ke, Y.L., Xiao, K., Hu, C.H. & Shi, B. 2014. Cello-oligosaccharide influences intestinal microflora, mucosal architecture and nutrient transport in weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 195: 85–91.
- Jing, H., Cockburn, D., Zhang, Q. & Clarke, A.J. 2009. Production and purification of the isolated family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi*. *Protein Expr. Purif.* 64(1): 63–68.
- Johansen, K.S. 2016. Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation. *Trends Plant Sci.* 21(11): 926–936.
- Johnson, K.S. & Barbehenn, R.V. 2000. Oxygen levels in the gut lumens of herbivorous insects. *J. Insect Physiol.* 46(6): 897–903.
- Joyson, R., Swamy, A., Bou, P.A., Chapuis, A. & Ferry, N. 2014. Characterization of cellulolytic activity in the gut of the terrestrial land slug *Arion ater*: Biochemical identification of targets for intensive study. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 177-178: 29–35.
- Joyson, R., Pritchard, L., Osemwekha, E. & Ferry, N. 2014. Metagenomic analysis of the gut microbiome of the common black slug *arion ater* in search of novel lignocellulose degrading enzymes. *Front. Microbiol.* 8: 2181.
- Juárez-Jiménez, B., Manzanera, M., Rodelas, B., Martínez-Toledo, M.V., Gonzalez-López, J., Crognale, S., Pesciaroli, C. & Fenice, M. 2010. Metabolic characterization of a strain (BM90) of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. *Biodegradation* 21(3): 475–489.

- Kamm, B. & Kamm, M. 2004. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(2): 137–145.
- Kang, M.S., Im, W.T., Jung, H.M., Kim, M.K., Goodfellow, M., Kim, K.K., Yang, H.C., An, D.S. & Lee, S.T. 2007. *Cellulomonas composti* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from cattle farm compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(6): 1256–1260.
- Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S. & Tewari, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* 77: 215–227.
- Kaufman, M.G. & Klug, M.J. 1991. The contribution of hindgut bacteria to dietary carbohydrate utilization by crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 98(1): 117–123.
- Ke, J. & Chen, S. 2014. CHAPTER 10 Biological Pretreatment of Biomass in Wood-Feeding Termites. p. 177–194. *In* Biological Conversion of Biomass for Fuels and Chemicals: Explorations from Natural Utilization Systems. The Royal Society of Chemistry.
- Khianggam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K.K., Lee, K.C. & Lee, J.S. 2010. *Cohnella thailandensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium from Thai soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(10): 2284–2287.
- Kido, K., Tejima, S., Nagayama, H., Uyeno, Y., Ide, Y. & Kushibiki, S. 2016. Effects of supplementation with cellooligosaccharides on growth performance of weaned calves on pasture. *Anim. Sci. J.* 87(5): 661–665.
- Kim, D.Y., Han, M.K., Oh, H.W., Bae, K.S., Jeong, T.S., Kim, S.U., Shin, D.H., Kim, I.H., Rhee, Y.H., Son, K.H. & Park, H.Y.. 2010. Novel intracellular GH10 xylanase from *Cohnella laeviribosi* HY-21: Biocatalytic properties and alterations of substrate specificities by site-directed mutagenesis of Trp residues. *Bioresour. Technol.* 101(22): 8814–8821.
- Kim, Y.R., Kim, E.Y., Lee, J.M., Kim, J.K. & Kong, I.S. 2013. Characterisation of a novel *Bacillus* sp. SJ-10 β -1,3-1,4-glucanase isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented fish. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36(6): 721–727.
- Kim, S., Dale, B. E. & Jenkins, R. (2009). Life cycle assessment of corn grain and corn stover in the United States. *Int. J. Life Cycle Assess.* 14: 160–174.
- Kim, S.J., Lee, C.M., Han, B.R., Kim, M.Y., Yeo, Y.S., Yoon, S.H., Koo, B.S. & Jun, H.K. 2008. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 282(1): 44–51.
- King, A.J., Cragg, S.M., Li, Y., Dymond, J., Guille, M.J., Bowles, D.J., Bruce, N.C., Graham, I.A. & McQueen-Mason, S.J.. 2010. Molecular insight into lignocellulose digestion by a marine isopod in the absence of gut microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(12): 5345–5350.
- Kirsch, R., Wielsch, N., Vogel, H., Svatos, A., Heckel, D.G. & Pauchet, Y. 2012. Combining proteomics and transcriptome sequencing to identify active plant-cell-wall-degrading enzymes in a leaf beetle. *BMC Genomics* 13(1): 587.
- Köhler, T., Dietrich, C., Scheffrahn, R.H. & Brune, A. 2012. High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.* 78(13): 4691–4701.
- Köhler, T., Stingl, U., Meuser, K. & Brune, A. 2008. Novel lineages of Planctomycetes densely colonize the alkaline gut of soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Environ. Microbiol.* 10(5): 1260–1270.
- Kölsch, G. & Pedersen, B.V. 2010. Can the tight co-speciation between reed beetles (Col., Chrysomelidae, Donaciinae) and their bacterial endosymbionts, which provide cocoon material, clarify the deeper phylogeny of the hosts? *Mol. Phylogenet. Evol.* 54(3): 810–821.
- König, H., Li, L. & Fröhlich, J. 2013. The cellulolytic system of the termite gut. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(18): 7943–7962.
- Kostylev, M. & Wilson, D. 2012. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels* 3(1): 61–70.

- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. & Schloss, P.D. 2013. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V.A., Rajendhran, J. & Gunasekaran, P. 2014. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4(Suppl 1): S16-S21.
- Kuechler, S.M., Renz, P., Dettner, K. & Kehl, S. 2012. Diversity of symbiotic organs and bacterial endosymbionts of: Lygaeoid bugs of the families Blissidae and Lygaeidae (Hemiptera:: Heteroptera: Lygaeoidea). *Appl. Environ. Microbiol.* 78(8): 2648–2659.
- Kuhad, R.C., Gupta, R. & Singh, A. 2011. *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications.* Enzyme Res. 2011: 1–10.
- Kumar, A.K. & Sharma, S. 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 4(1): 7.
- Kumari, R., Sachdev, M., Prasad, R., Garg, A.P., Sharma, S., Giang, P.H. & Varma, A. 2006. Microbiology of Termite Hill (Mound) and Soil. *Intest. Microorg. Termit. Other Invertebr.* 6: 351–372.
- Laffont, E.R., Torales, G.J., Coronel, J.M., Arbino, M.O. & Godoy, M.C. 2004. Termite (Insecta, Isoptera) fauna from natural parks of the northeast region of Argentina. *Sci. Agric.* 61(6): 665–670.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 (5259): 680-685.
- Lamsal, B., Yoo, J., Brijwani, K. & Alavi, S. 2010. Extrusion as a thermo-mechanical pretreatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenergy* 34(12): 1703–1710.
- Lee, H. V., Hamid, S.B.A., Zain, S.K., Lee, H.V., Hamid, S.B.A. & Zain, S.K. 2014a. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *Sci. World J.* 2014: 1–20.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C. & Lee, J.W. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.* 99(2): 378–386.
- Lee, S.J., Kim, S.R., Yoon, H.J., Kim, I., Lee, K.S., Je, Y.H., Lee, S.M., Seo, S.J., Dae Sohn, H. & Jin, B.R. 2004. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 139(1): 107–116.
- Lee, S.J., K.S. Lee, S.R. Kim, Z.Z. Gui, Y.S. Kim, H.J. Yoon, I. Kim, P.D. Kang, H.D. Sohn, & B.R. Jin. 2005. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: Gene structure, expression, and enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 140(4): 551–560.
- Lee, C.M., Lee, Y.S., Seo, S.H., Yoon, S.H., Kim, S.J., Hahn, B.S., Sim, J.S. & Koo, B.S. 2014b. Screening and characterization of a novel cellulase gene from the gut microflora of *Hermetia illucens* using metagenomic library. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(9): 1196–1206.
- Lemke, T., Stingl, U., Egert, M., Friedrich, M.W. & Brune, A. 2003. Physicochemical Conditions and Microbial Activities in the Highly Alkaline Gut of the Humus-Feeding Larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11): 6650–6658.
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M.N.M., Rooney, D.W. & Walker, G.M. 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. J.* 156(2): 395–403.
- Leonardo, F.C., da Cunha, A.F., da Silva, M.J., Carazzolle, M.F., Costa-Leonardo, A.M., Costa, F.F. & Pereira, G.A. 2011. Analysis of the workers head transcriptome of the Asian subterranean termite, *Coptotermes gestroi*. *Bull. Entomol. Res.* 101: 383–391.
- Leser, T.D., Lincrona, R.H., Jensen, T.I.M.K. & Jensen, B.B. 2000. Changes in Bacterial Community Structure in the Colon of Pigs Fed Different Experimental Diets and after Infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8): 3290–3296.
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 2013. Expansion of the

- enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol. Biofuels* 6(1): 41.
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E. & Christou, M. 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy* 25(4): 335–361.
- Ley, R.E., Peterson, D.A. & Gordon, J.I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124(4): 837–848.
- Li, X. & Brune, A. 2005. Digestion of microbial biomass, structural polysaccharides, and protein by the humivorous larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Soil Biol. Biochem.* 37(1): 107–116.
- Li, Z.Q., Liu, B.R., Zeng, W.H., Xiao, W.L., Li, Q.J. & Zhong, J.H. 2013. Character of cellulase activity in the guts of flagellate-free termites with different feeding habits. *J. Insect Sci.* 13(37): 37.
- Liao, J.C., Mi, L., Pontrelli, S. & Luo, S. 2016. Fuelling the future: Microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(5): 288–304.
- Lima, M.A., Gomez, L.D., Steele-King, C.G., Simister, R., Bernardinelli, O.D., Carvalho, M.A., Rezende, C.A., Labate, C.A., Deazevedo, E.R., McQueen-Mason, S.J. & Polikarpov, I. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnol. Biofuels* 7(1): 10.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H. & Wang, D. 2012. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electron. J. Biotechnol.* 15(3).
- Lin, C.W., Tran, D.T., Lai, C.Y., I, Y.P. & Wu, C.H. 2010. Response surface optimization for ethanol production from *Pennisetum Alopecoider* by *Klebsiella oxytoca* THLC0409. *Biomass and Bioenergy* 34(12): 1922–1929.
- Liu, S., Lu, H., Hu, R., Shupe, A., Lin, L. & Liang, B. 2012. A sustainable woody biomass biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30(4): 785–810.
- Liu, C.J., Miao, Y.C. & Zhang, K.W. 2011a. Sequestration and transport of lignin monomeric precursors. *Molecules* 16(1): 710–727.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Xu, Y., Tang, Z., Tian, W. & Shen, Q. 2011b. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Expr. Purif.* 79(2): 176–186.
- Lo, N. & Eggleton, P. 2011. Termite Phylogenetics and Co-cladogenesis with Symbionts. p. 27–50. *In* Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (eds.), *Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Lo, N., Tokuda, G. & Watanabe, H. 2011. Evolution and Function of Endogenous Termite Cellulases. p. 51–67. *In* Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (eds.), *Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Lo, N., Watanabe, H. & Sugimura, M. 2003. Evidence for the presence of a cellulase gene in the last common ancestor of bilaterian animals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270(Suppl_1): S69–S72.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42(D1): 490–495.
- Lucena, S.A., Lima, L.S., Cordeiro, L.S., Sant’anna, C., Constantino, R., Azambuja, P., de Souza, W., Garcia, E.S. & Genta, F.A. 2011. High throughput screening of hydrolytic enzymes from termites using a natural substrate derived from sugar cane bagasse. *Biotechnol. Biofuels* 4: 51.
- Ludwiczek, M.L., Heller, M., Kantner, T. & McIntosh, L.P. 2007. A Secondary Xylan-binding Site Enhances the Catalytic Activity of a Single-domain Family 11 Glycoside Hydrolase. *J. Mol. Biol.* 373(2): 337–354.
- Luna, M.L., Giacosa, J.P.R., Giudice, G.E., Fernández, P.V., Ciancia, M. & Saparrat, M.C.N. 2015.

- Structure and chemistry of the xylem of arborescent species of *Blechnum* from South America. *IAWA J.* 36(1): 3–21.
- Lutzen, N.W., Nielsen, M.H., Oxenboell, K.M., Schulei, M. & Stentebjerg-Olese, B. 1983. Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 300: 283–291.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3): 506–577.
- MacGown, M.W. & Skorowski, P.P. 1981. Digestive Anatomy of the Adult Boll Weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74(1): 117–126.
- Maki, M.L., Broere, M., Leung, K.T. & Qin, W. 2011. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2(2): 146–154.
- Maki, M., Leung, K.T. & Qin, W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* 5(5): 500–516.
- Malgas, S., van Dyk, J.S. & Pletschke, B.I. 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31(8): 1167–1175.
- Manfredi, A.P., Perotti, N.I. & Martínez, M.A. 2015. Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. *J. Basic Microbiol.* 55(12): 1384–1393.
- Männistö, M.K. & Häggblom, M.M. 2006. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. *Syst. Appl. Microbiol.* 29(3): 229–243.
- Martínez, Á.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. & Gutiérrez, A. 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20(3): 348–357.
- Martinson, V.G., Moy, J. & Moran, N.A. 2012. Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honeybee Worker. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(8): 2830–2840.
- Masai, E., Katayama, Y. & Fukuda, M. 2007. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(1): 1–15.
- McKenna, D.D., Scully, E.D., Pauchet, Y., Hoover, K., Kirsch, R., Geib, S.M., Mitchell, R.F., Waterhouse, R.M., Ahn, S.J., Arsalá, D., Benoit, J.B., Blackmon, H., Bledsoe, T., Bowsher, J.H., A. Busch, B. Calla, H. Chao, A.K. Childers, C. Childers, D.J. Clarke, L. Cohen, J.P. Demuth, H. Dinh, H.V. Doddapaneni, A. Dolan, J.J. Duan, S. Dugan, M. Friedrich, K.M. Glastad, M.A.D. Goodisman, S. Haddad, Y. Han, D.S.T. Hughes, P. Ioannidis, J.S. Johnston, J.W. Jones, L.A. Kuhn, D.R. Lance, C.Y. Lee, S.L. Lee, H. Lin, J.A. Lynch, A.P. Moczek, S.C. Murali, D.M. Muzny, D.R. Nelson, S.R. Palli, K.A. Panfilio, D. Pers, M.F. Poelchau, H. Quan, J. Qu, A.M. Ray, J.P. Rinehart, H.M. Robertson, R. Roehrdanz, A.J. Rosendale, S. Shin, C. Silva, A.S. Torson, I.M.V. Jentzsch, J.H. Werren, K.C. Worley, G. Yocum, E.M. Zdobnov, Gibbs, R.A. & Richards, S. 2016. Genome of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*), a globally significant invasive species, reveals key functional and evolutionary innovations at the beetle-plant interface. *Genome Biol.* 17(1): 1–18.
- Mehnaz, S., Baig, D.N. & Lazarovits, G. 2010. Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Sugarcane Plants Growing in Pakistan. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(12): 1614–1623.
- Menon, V. & Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Comb. Sci.* 38(4): 522–550.
- Meriweather, M., Matthews, S., Rio, R. & Baucom, R.S. 2013. A 454 Survey Reveals the Community Composition and Core Microbiome of the Common Bed Bug (*Cimex*

- lectularius*) across an Urban Landscape. PLoS One 8(4).
- Middelbos, I.S., Boler, B.M.V., Qu, A., White, B.A., Swanson, K.S. & Fahey, G.C.. 2010. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. PLoS One 5(3).
- Mikaelyan, A., Dietrich, C., Köhler, T., Poulsen, M., Sillam-Dussès, D. & Brune, A. 2015. Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites. Mol. Ecol. 24(20): 5284–5295.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31(3):426-428.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M. & Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. Trends Food Sci. Technol. 13(6-7): 205–216.
- Moll, R.M., Romoser, W.S., Modrakowski, M.C., Moncayo, A.C. & Lerdthusnee, K. 2001. Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: Culicidae) Metamorphosis. J. Med. Entomol. 38(1): 29–32.
- Montagna, M., Chouaia, B., Mazza, G., Prosdocimi, E.M., Crotti, E., Mereghetti, V., Vacchini, V., Giorgi, A., De, A., Longo, S., Cervo, R., Lozzia, G.C., Alma, A., Bandi, C. & Daffonchio, D. 2015. Effects of the Diet on the Microbiota of the Red Palm Weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). PLoS One 10(1): 1–22.
- Montagna, M., Mereghetti, V., Gargari, G., Guglielmetti, S., Faoro, F., Lozzia, G., Locatelli, D. & Limonta, L. 2016. Evidence of a bacterial core in the stored products pest *Plodia interpunctella*: the influence of different diets. Environ. Microbiol. 18(12): 4961–4973.
- Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M. & Ardjmand, M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renew. Sustain. Energy Rev. 27: 77–93.
- Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E. & Sabree, Z.L. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS One 7(4): 1–10.
- Mueller, U.G. & Gerardo, N. 2002. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. Proc. Natl. Acad. Sci. 99(24): 15247–15249.
- Muhammad, A., Fang, Y., Hou, Y. & Shi, Z. 2017. The gut entomotype of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae) and their effect on host nutrition metabolism. Front. Microbiol. 8(Nov): 1–15.
- Naik, N., Mood, D., Venkata, M., Veeranki, D., Goud, V., Rao, S. & Benarjee, T. 2017. Dilute acid pretreatment of sorghum biomass to maximize the hemicellulose hydrolysis with minimized levels of fermentative inhibitors for bioethanol production. 3 Biotech 7(2): 1–12.
- Nakajima, H., Hongoh, Y., Noda, S., Yoshida, Y., Usami, R., Kudo, T. & Ohkuma, M. 2006. Phylogenetic and morphological diversity of Bacteroidales members associated with the gut wall of termites. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70(1): 211–218.
- Nandimath, A.P., Kharat, K.R., Gupta, S.G. & Kharat, A.S. 2016. Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. African J. Microbiol. Res. 10(13): 410–419.
- Nardi, J.B., Bee, C.M., Miller, L.A., Nguyen, N.H., Suh, S.O. & Blackwell, M. 2006. Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a subsocial beetle. Arthropod Struct. Dev. 35(1): 57–68.
- Navodita, M. & Erdei, L. 2018. Termite Gut Microbiome. p. 70–90. In Khan, M.A., Ahmad, W. (eds.), Termites and Sustainable Management Volume 1 - Biology, Social Behaviour and Economic Importance. Springer.
- Nelson, M.L. & O'Connor, R.T. 1964. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. J. Appl. Polym. Sci. 8(3): 1325–1341.
- Ni, J. & Tokuda, G. 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. Biotechnol. Adv. 31(6): 838–850.

- Nikolova, P.V., Creagh, A.L., Duff, S.J.B. & Haynes, C.A. 1997. Thermostability and irreversible activity loss of exoglucanase/xylanase Cex from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry* 36(6): 1381–1388.
- Nishida, Y., Suzuki, K., Kumagai, Y., Tanaka, H., Inoue, A. & Ojima, T. 2007. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie* 89(8): 1002–1011.
- Oh, S.Y., Il Yoo, D., Shin, Y. & Seo, G. 2005. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydr. Res.* 340(3): 417–428.
- Ohimain, E.I., Kendabie, P. & Nwachukwu, R.E.S. 2014. Bioenergy Potentials of Elephant Grass , *Pennisetum purpureum Schumach.* *Annu. Res. Rev. Biol.* 4(13): 2215–2227.
- Ohkuma, M. 2003. Termite symbiotic systems: Efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(1): 1–9.
- Ohkuma, M., Noda, S., Hongoh, Y. & Kudo, T. 2001. Coevolution of symbiotic systems of termites and their gut microorganisms. *Ecology* 41(41): 73–74.
- Oppert, C., Klingeman, W.E., Willis, J.D., Oppert, B. & Jurat-Fuentes, J.L. 2010. Prospecting for cellulolytic activity in insect digestive fluids. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 155(2): 145–154.
- Otani, S., Mikaelyan, A., Nobre, T., Hansen, L.H., Koné, N.A., Sorensen, S.J., Aanen, D.K., Boomsma, J.J., Brune, A. & Poulsen, M. 2014. Identifying the core microbial community in the gut of fungus-growing termites. *Mol. Ecol.* 23(18): 4631–4644.
- Otsuka, M., Ishida, A., Nakayama, Y., Saito, M., Yamazaki, M., Murakami, H., Nakamura, Y., Matsumoto, M., Mamoto, K. & Takada, R. 2004. Dietary supplementation with celooligosaccharide improves growth performance in weanling pigs. *Anim. Sci. J.* 75(3): 225–229.
- Ou, S., Zhang, J., Wang, Y. & Zhang, N. 2011. Production of Feruloyl Esterase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation on Different Carbon Sources. *Enzyme Res.* 2011: 848939.
- Ovando-Chacón, S.L. & Waliszewski, K. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia.* 21(42): 113-122.
- Pan, L., Farouk, M.H., Qin, G., Zhao, Y. & Bao, N. 2018. The influences of soybean agglutinin and functional oligosaccharides on the intestinal tract of monogastric animals. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2).
- Pandey, K.K. & Pitman, A.J. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52(3): 151–160.
- Park, I.H., Chang, J., Lee, Y.S., Fang, S.J. & Cho, Y.L.i. 2012. Gene cloning of endoglucanase Cel5A from cellulose-degrading *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 and purification and characterization of the recombinant enzyme. *Protein J.* 31(3): 238–245.
- Patrick, W.M., Nakatani, Y., Cutfield, S.M., Sharpe, M.L., Ramsay, R.J. & Cutfield, J.F. 2010. Carbohydrate binding sites in *Candida albicans* exo- β -1,3-glucanase and the role of the Phe-Phe “clamp” at the active site entrance. *FEBS J.* 277(21): 4549–4561.
- Pauchet, Y., Kirsch, R., Giraud, S., Vogel, H. & Hecke, D.G. 2014. Identification and characterization of plant cell wall degrading enzymes from three glycoside hydrolase families in the cerambycid beetle *Apriona japonica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 49(1): 1–13.
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., Chauhan, R. & Ffrench-Constant, R.H. 2010. Diversity of Beetle Genes Encoding Novel Plant Cell Wall Degrading Enzymes. *PLoS One* 5(12).
- Payne, C.M., Knott, B.C., Mayes, H.B., Hansson, H., Himmel, M.E., Sandgren, M., Ståhlberg, J. & Beckham, G.T. 2015. Fungal cellulases. *Chem. Rev.* 115(3): 1308–1448.
- Pereira, S.C., Maehara, L., Machado, C.M.M. & Farinas, C.S. 2015. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* 8(1): 1–16.
- Pérez-Avalos, O., Sánchez-Herrera, L.M., Salgado, L.M. & Ponce-Noyola, T. 2008. A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in

- industrial processes at different pH. *Curr. Microbiol.* 57(1): 39–44.
- Pérez-Cobas, A.E., Maiques, E., Angelova, A., Carrasco, P., Moya, A. & Latorre, A. 2015. Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous cockroach *Blattella germanica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91(4): 1–14.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13): 1605–1612.
- Pinheiro, G.L., Correa, R.F., Cunha, R.S., Cardoso, A.M., Chaia, C., Clementino, M.M., Garcia, E.S., de Souza, W. & Frasés, S. 2015. Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica*. *Front. Microbiol.* 6(Aug): 860.
- Poletto, M., Ornaghi Júnior, H.L. & Zattera, A.J. 2014. Native cellulose: Structure, characterization and thermal properties. *Materials (Basel)*. 7(9): 6105–6119.
- Ponce-Noyola, T. & De La Torre, M. 2001. Regulation of cellulases and xylanases from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar-cane bagasse in continuous culture. *Bioresour. Technol.* 78(3): 285–291.
- Potts, R.C. & Hewitt, P.H. 1974. The partial purification and some properties of the cellulase from the termite *Trinervitermes trinervoides* (Nasutitermitinae). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem.* 47(2): 317–326.
- Pourramezan, Z., Ghezelbash, G.R., Romani, B., Ziaei, S. & Hedayatkah, A. 2012. Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite *Microcerotermes diversus* (Silvestri). *Mikrobiologija* 81(6): 796–802.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285): 59–65.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.*
- Quiroz-Castañeda, R.E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martínez, A., Folch-Mallol, J. & Martínez-Anaya, C. 2009. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electron. J. Biotechnol.* 12(4).
- Rahman, A.N., Parks, D.H., Willner, D.L., Engelbrektson, A.L., Goffredi, S.K., Warnecke, F., Scheffrahn, R.H. & Hugenholtz, P. 2015. A molecular survey of Australian and North American termite genera indicates that vertical inheritance is the primary force shaping termite gut microbiomes. *Microbiome* 3(1): 5.
- Rashamuse, K., Ronneburg, T., Sanyika, W., Mathiba, K., Mmutlane, E. & Brady, D. 2014. Metagenomic mining of feruloyl esterases from termite enteric flora. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(2): 727–737.
- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christopher, L.P. & Sani, R.K. 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour. Technol.* 101(22): 8798–8806.
- Rehman, F.U., Aslam, M., Tariq, M.I., Shaheen, A., Sami, A.J., Naveed, N.H. & Batool, A.I. 2009. Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle). *African J. Biotechnol.* 8(23): 6710–6715.
- Romano, N., Gioffré, A., Sede, S.M., Campos, E., Cataldi, A. & Talia, P. 2013. Characterization of Cellulolytic Activities of Environmental Bacterial Consortia from an Argentinian Native Forest. *Curr. Microbiol.* 67(2): 138–147.

- Rosen, M. 2014. The Future of *Biofuels*. *Biofuels*. 5(4): 351-352.
- Sabree, Z.L., Hansen, A.K. & Moran, N.A. 2012. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS One* 7(7).
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V. & Quackenbush, J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34(2): 374–378.
- Saini, J.K., Saini, R. & Tewari, L. 2015. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* 5(4): 337–353.
- Salvador, R., D. Príncipe, M. Berretta, P. Fernández, N. Paniago, A. Sciocco-Cap, & E. Hopp. 2014. Transcriptomic survey of the midgut of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Insect Sci.* 14: 219.
- Sánchez, M.M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tindall, B.J., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., Diaz, P. & Pastor, F.I.J. 2005. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(2): 935–939.
- Sánchez-Herrera, L.M., Ramos-Valdivia, A.C., De La Torre, M., Salgado, L.M. & Ponce-Noyola, T. 2007. Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(3): 589–595.
- Santo Domingo, J.W., Kaufman, M.G., Klug, M.J., Holben, W.E., Harris, D. & Tiedje, J.M. 1998. Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Mol. Ecol.* 7(6): 761–767.
- Sanyika, T.W., Rashamuse, K.J., Hennessy, F. & Brady, D. 2012. Luminal hindgut bacterial diversities of the grass and sugarcane feeding termite *Trinervitermes trinervoides*. *African J. Microbiol. Res.* 6(11): 2639–2648.
- Saratale, G.D., Saratale, R.G., Lo, Y.C. & Chang, J.S. 2010. Multicomponent cellulase production by *Cellulomonas biazotea* NCIM-2550 and its applications for cellulosic biohydrogen production. *Biotechnol. Prog.* 26(2): 406–416.
- Sasagawa, T., Matsui, M., Kobayashi, Y., Otagiri, M., Moriya, S., Sakamoto, Y., Ito, Y., Lee, C.C., Kitamoto, K. & Arioka, M. 2011. High-throughput recombinant gene expression systems in *Pichia pastoris* using newly developed plasmid vectors. *Plasmid* 65(1): 65–69.
- Scharf, M.E. 2015. Omic research in termites: An overview and a roadmap. *Front. Genet.* 6(Mar).
- Scharf, M.E. & Tartar, A. 2008. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2(6): 540–552.
- Schauer, C., Thompson, C. & Brune, A. 2014. Pyrotag sequencing of the gut microbiota of the cockroach *Shelfordella lateralis* reveals a highly dynamic core but only limited effects of diet on community structure. *PLoS One* 9(1): 1–8.
- Schloss, P.D., Delalibera Italo, J., Handelsman, J. & Raffa, K.F. 2006. Bacteria Associated with the Guts of Two Wood-Boring Beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environ. Entomol.* 35(3): 625–629.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. & Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7537–7541.
- Schuster, B.G. & Chinn, M.S. 2013. Consolidated Bioprocessing of Lignocellulosic Feedstocks for Ethanol Fuel Production. *Bioenergy Res.* 6(2): 416–435.
- Scrivener, A.M., Watanabe, H. & Noda, H. 1997. Diet and carbohydrate digestion in the yellow-

- spotted longicorn beetle *Psacotheta hilaris*. *J. Insect Physiol.* 43(11): 1039–1052.
- Sethi, A., Slack, J.M., Kovaleva, E.S., Buchman, G.W. & Scharf, M.E. 2013. Lignin-associated metagene expression in a lignocellulose-digesting termite. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43(1): 91–101.
- Shallom, D. & Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(3): 219–228.
- Shao, Y., Arias-Cordero, E., Guo, H., Bartram, S. & Boland, W. 2014. In vivo Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLoS One* 9(1): 1–13.
- Shen, H., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C. & Warren, R.A. 1995. Cellobiohydrolase B, a second exo-cellobiohydrolase from the cellulolytic bacterium *Cellulomonas fimi*. *Biochem. J.* 311: 67–74.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J.V. & Mann, M. 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1(6): 2856–2860.
- Shi, P., Tian, J., Yuan, T., Liu, X., Huang, H., Bai, Y., Yang, P., Chen, X., Wu, N. & Yao, B.. 2010. *Paenibacillus* sp. Strain E18 bifunctional xylanase-glucanase with a single catalytic domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(11): 3620–3624.
- Shimada, K. & Maekawa, K. 2010. Changes in endogenous cellulase gene expression levels and reproductive characteristics of primary and secondary reproductives with colony development of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Insect Physiol.* 56(9): 1118–1124.
- Silva, J.P.A., Mussatto, S.I., Roberto, I.C. & Teixeira, J.A. 2011. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian J. Chem. Eng.* 28(1): 151–156.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. & Mehta, P.K. 2016. Microbial Cellulases in Industrial Applications. *Ann. Appl. Bio-Sciences* 3(4): 23–29.
- Slaytor, M. 2000. Energy Metabolism in the Termite and Its Gut Microbiota. p. 307–332. *In* Abe, T., Bignell, D.E., Higashi, M. (eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Song, Y.H., Lee, K.T., Baek, J.Y., Kim, M.J., Kwon, M.R., Kim, Y.J., Park, M.R., Ko, H., Lee, J.S. & Kim, K.S. 2017. Isolation and characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase from a metagenomic library of the black-goat rumen. *Brazilian J. Microbiol.* 48(4): 801–808.
- Sorek, N., Yeats, T.H., Szemenyei, H., Youngs, H. & Somerville, C.R. 2014. The Implications of Lignocellulosic Biomass Chemical Composition for the Production of Advanced Biofuels. *Bioscience* 64(3): 192–20.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P.K., Gupta, V.K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Manikanta, A. & Ramteke, P.W. 2018. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82: 2379–2386.
- Stefanini, I. 2018. Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast* 35(4): 315–330.
- Šturcova, A., His, I., Apperley, D.C., Sugiyama, J. & Jarvis, M.C. 2004. Structural details of crystalline cellulose from higher plants. *Biomacromolecules* 5(4): 1333–1339.
- Sugimura, M., Watanabe, H., Lo, N. & Saito, H. 2003. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris*. *Eur. J. Biochem.* 270(16): 3455–3460.
- Sun, Y. & Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83(1): 1–11.
- Sun, J., Ding, S.Y. & Peterson, J.D. 2013. *Biological Conversion of Biomass for Fuels and Chemicals* (J Sun, S-Y Ding, and JD Peterson, Eds.). The Royal Society of Chemistry.
- Sun, Q., Foston, M., Meng, X., Sawada, D., Pingali, S.V., O'Neill, H.M., Li, H., Wyman, C.E., Langan, P., Ragauskas, A.J. & Kumar, R. 2014a. Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 7(1): 1–14.
- Sun, Q., Foston, M., Sawada, D., Pingali, S.V., O'Neill, H.M., Li, H., Wyman, C.E., Langan, P., Pu, Y. & Ragauskas, A.J. 2014b. Comparison of changes in cellulose ultrastructure during

- different pretreatments of poplar. *Cellulose* 21(4): 2419–2431.
- Sun, J., Wang, H., Lv, W., Ma, C., Lou, Z., Yao, H. & Dai, Y. 2012. Cloning and expression of a thermostable beta-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350. *Ann. Microbiol.* 62(3): 1235–1242.
- Sun, J. & Zhou, X.J. 2013. Lignocellulolytic Systems of Insects and their Potential for Viable Biofuels. p. 195–222. *In* Sun, J., Ding, S.-Y., Doran-Peterson, J. (eds.), *Biological Conversion of Biomass for Fuels and Chemicals: Explorations from Natural Utilization Systems*. The Royal Society of Chemistry.
- Suzuki, K., Ojima, T. & Nishita, K. 2003. Purification and cDNA cloning of a cellulase from abalone *Haliotis discus hannai*. *Eur. J. Biochem.* 270(4): 771–778.
- Swift, M.L. 1997. GraphPad Prism, Data Analysis, and Scientific Graphing. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 37(2): 411–412.
- Tagliavia, M., Messina, E., Manachini, B., Cappello, S. & Quatrini, P. 2014. The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *BMC Microbiol.* 14(1): 136.
- Tai, V. & Keeling, P.J. 2013. Termite hindguts and the ecology of microbial communities in the sequencing age. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60(4): 421–428.
- Talia, P. & Arneodo, J. 2018. Lignocellulose Degradation by Termites. p. 101–117. *In* Khan, M.A., Ahmad, W. (eds.), *Termites and Sustainable Management: Volume 1 - Biology, Social Behaviour and Economic Importance*. Springer International Publishing, Cham.
- Talia, P., Sede, S.M., Campos, E., Rorig, M., Principi, D., Tosto, D., Hopp, H.E., Grasso, D. & Cataldi, A. 2012. Biodiversity characterization of cellulolytic bacteria present on native Chaco soil by comparison of ribosomal RNA genes. *Res. Microbiol.* 163(3): 221–232.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipi, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725–2729.
- Tan, H.T., Corbin, K.R. & Fincher, G.B. 2016. Emerging Technologies for the Production of Renewable Liquid Transport Fuels from Biomass Sources Enriched in Plant Cell Walls. *Front. Plant Sci.* 7(Dec): 1–18.
- Tarayre, C., Brognaux, A., Bauwens, J., Brasseur, C., Mattéotti, C., Millet, C., Destain, J., Vandenberg, M., Portetelle, D., De Pauw, E., Eric, H., Francis, F. & Thonart, P. 2014. Isolation of amylolytic, xylanolytic, and cellulolytic microorganisms extracted from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis* by means of a micro-aerobic atmosphere. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30(5): 1655–1660.
- Tartar, A., Wheeler, M.M., Zhou, X., Coy, M.R., Boucias, D.G. & Scharf, M.E. 2009. Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Biotechnol. Biofuels* 2(i): 25.
- Teather, R.M. & Wood, P.J. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(4): 777–780.
- Teixeira, R.S., Silva, A.S., Moutta, R.O., Ferreira-Leitão, V.S., Barros, R.R., Ferrara, M. & Bon, E.P. 2014. Biomass pretreatment: a critical choice for biomass utilization via biotechnological routes. *BMC Proc.* 8(Suppl 4): O34.
- Thompson, C.L., Wang, B. & Holmes, A.J. 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME J.* 2(7): 739–48.
- Timung, R., Naik Deshavath, N., Goud, V.V. & Dasu, V.V. 2016. Effect of Subsequent Dilute Acid and Enzymatic Hydrolysis on Reducing Sugar Production from Sugarcane Bagasse and Spent Citronella Biomass. *J. Energy* 2016: 1–12.
- Tokuda, G., Lo, N., Watanabe, H., Arakawa, G., Matsumoto, T. & Noda, H. 2004. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. *Mol. Ecol.* 13(10): 3219–3228.
- Tokuda, G., Saito, H. & Watanabe, H. 2002. A digestive β -glucosidase from the salivary glands

- of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1681–1689.
- Tokuda, G. & Watanabe, H. 2007. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biol. Lett.* 3(3): 336–9.
- Tokuda, G., Watanabe, H., Hojo, M., Fujita, A., Makiya, H., Miyagi, M., Arakawa, G. & Arioka, M. 2012. Cellulolytic environment in the midgut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. *J. Insect Physiol.* 58(1): 147–154.
- Tokumoto, H., Wakabayashi, K., Kamisaka, S. & Hoson, T. 2002. Changes in the sugar composition and molecular mass distribution of matrix polysaccharides during cotton fiber development. *Plant Cell Physiol.* 43(4): 411–418.
- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M. & Negro, M.J. 2011. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. *Biofuels*: 149–176.
- Tseng, C.W., Ko, T.P., Guo, R.T., Huang, J.W., Wang, H.C., Huang, C.H., Cheng, Y.S., Wang, A.H.J. & Liu, J.R. 2011. Substrate binding of a GH5 endoglucanase from the ruminal fungus *Piromyces rhizinflata*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67(10): 1189–1194.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R. & Gordon, J.I. 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 1(6): 6ra14.
- Turner, P., Mamo, G. & Karlsson, E.N. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.* 6: 1–23.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P. & Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46(4): 327–338.
- Uchima, C.A. & Arioka, M. 2012. Expression and One-Step Purification of Recombinant Proteins Using an Alternative Episomal Vector for the Expression of N-Tagged Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(2): 368–371.
- Uddin, M.M., Hasan Chowdhury, M.M., Mojumder, S. & Sikdar, D. 2012. Multiple Endo- β -1,4-glucanases Present in the Gut Fluid of a Defoliating Beetle, *Podontia quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pakistan J. Biol. Sci.* 15(7): 333–340.
- Upton, B.M. & Kasko, A.M. 2016. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective. *Chem. Rev.* 116(4): 2275–2306.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S.J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V.G.H. 2010. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science* (80-.). 330(6001): 219 LP – 222.
- Valencia, A., Alves, P.A. & Siegfried, B.D. 2012. Molecular cloning and functional characterization of an endogenous endoglucanase belonging to GHF45 from the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. 513: 260-267.
- Vanholme, B., Desmet, T., Ronsse, F., Rabaey, K., Van Breusegem, F., De Mey, M., Soetaert, W. & Boerjan, W. 2013. Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. *Front. Plant Sci.* 4: 174.
- Ventorino, V., Aliberti, A., Faraco, V., Robertiello, A., Giacobbe, S., Ercolini, D., Amore, A., Fagnano, M. & Pepe, O. 2015. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Sci. Rep.* 5: 8161.
- Viikari, L., Vehmaanperä, J. & Koivula, A. 2012. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy* 46: 13–24.
- Vilanova, C., Marco, G., Domínguez-Escribà, L., Genovés, S., Sentandreu, V., Bataller, E., Ramón, D. & Porcar, M. 2012. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: Potential sources of extreme cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy* 45: 288–294.
- Voget, S., Steele, H.L. & Streit, W.R. 2006. Characterization of a metagenome-derived

- halotolerant cellulase. *J. Biotechnol.* 126(1): 26–36.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. & Cole, J.R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Wang, Y., Gilbreath, T.M., Kukutla, P., Yan, G. & Xu, J. 2011. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One* 6(9): 1–9.
- Wang, Y. & Qian, P.Y. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One* 4(10).
- Wang, Q., Qian, C., Zhang, X.Z., Liu, N., Yan, X. & Zhou, Z. 2012. Characterization of a novel thermostable β -glucosidase from a metagenomic library of termite gut. *Enzyme Microb. Technol.* 51(6-7): 319–324.
- Wang, Y., Su, L., Huang, S., Bo, C., Yang, S., Li, Y., Wang, F., Xie, H., Xu, J. & Song, A. 2016. Diversity and resilience of the wood-feeding higher termite *Mironasutitermes shangchengensis* gut microbiota in response to temporal and diet variations. *Ecol. Evol.* 6(22): 8235–8242.
- Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S.G., Podar, M., Martin, H.G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N.C., Matson, E.G., Ottesen, E.A., Zhang, X., Hernandez, M., Murillo, C., Acosta, L.G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B.D., Chang, C., Rubin, E.M., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Hugenholtz, P. & Leadbetter, J.R. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450(7169): 560–565.
- Watanabe, H., Nakamura, M., Tokuda, G., Yamaoka, I., Scrivener, A.M. & Noda, H. 1997. Site of secretion and properties of endogenous endo- β -1,4-glucanase components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese subterranean termite. *Insect Biochem Mol Biol* 27: 305–313.
- Watanabe, H. & Tokuda, G. 2001. Animal cellulases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58(9): 1167–1178.
- Watanabe, H. & Tokuda, G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annu Rev Entomol* 55.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. & Barton, G.J. 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9): 1189–1191.
- Wei, Y.D., Lee, K.S., Gui, Z.Z., Yoon, H.J., Kim, I., Je, Y.H., Lee, S.M., Zhang, G.Z., Guo, X., Sohn, H.D. & Jin, B.R. 2006a. N-linked glycosylation of a beetle (*Apriona germari*) cellulase AgEGase II is necessary for enzymatic activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36(6): 435–441.
- Wei, Y.D., Lee, K. S., Gui, Z.Z., Yoon, H.J., Kim, I., Zhang, G.Z., Guo, X., Sohn, H.D. & Jin, B.R. 2006b. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 145(2): 220–229.
- Wei, Y.D., Lee, S.J., Lee, K.S., Gui, Z.Z., Yoon, H.J., Kim, I., Je, Y.H., Guo, X., Sohn, H.D. & Jin, B.R. 2005. N-glycosylation is necessary for enzymatic activity of a beetle (*Apriona germari*) cellulase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329(1): 331–336.
- Wei, Y., Zhou, H., Zhang, J., Zhang, L., Geng, A., Liu, F., Zhao, G., Wang, S., Zhou, Z. & Yan, X. 2015. Insight into dominant cellulolytic bacteria from two biogas digesters and their glycoside hydrolase genes. *PLoS One* 10(6): 1–19.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697–703.
- Willis, J.D., Klingeman, W.E., Oppert, C., Oppert, B. & Jurat-Fuentes, J.L. 2010. Characterization of cellulolytic activity from digestive fluids of *Dissosteira carolina* (Orthoptera: Acrididae). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 157(3): 267–272.
- Willis, J.D., Oppert, B., Oppert, C., Klingeman, W.E. & Jurat-Fuentes, J.L. 2011. Identification, cloning, and expression of a GHF9 cellulase from *Tribolium castaneum* (Coleoptera:

- Tenebrionidae). *J. Insect Physiol.* 57(2): 300–306.
- Wilson, D.B. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125: 289–297.
- Wilson, D.B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(3): 259–263.
- Whitman, T., Yanni, S. & Whalen, J. (2011). Life cycle assessment of corn stover production for cellulosic ethanol in Quebec. *Can. J. Soil Sci.* 91: 997–1012.
- Woo, M.H., Chang, Y.H., Lee, H.S., Pak, P.J., Kim, J.S. & Chung, N. 2014. First Thermostable Endo- β -1,4-Glucanase from Newly Isolated *Xanthomonas* sp. EC102. *Protein J.* 33(1): 110–117.
- Xia, D., Wei, Y., Zhang, G., Zhao, Q., Zhang, Y., Xiang, Z. & Lu, C. 2013. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the beetle *Batocera horsfieldi*. *Gene* 514(1): 62–68.
- Xu, Y., Buss, E.A. & Boucias, D.G. 2016a. Environmental transmission of the gut symbiont *Burkholderia* to phloem-feeding *Blissus insularis*. *PLoS One* 11(8): 1–19.
- Xu, Y., Buss, E.A. & Boucias, D.G. 2016b. Culturing and characterization of gut symbiont *Burkholderia* spp. from the Southern chinch bug, *Blissus insularis* (Hemiptera: Blissidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 82(11): 3319–3330.
- Xu, L., Lou, Q., Cheng, C., Lu, M. & Sun, J. 2015. Gut-Associated Bacteria of *Dendroctonus valens* and their Involvement in Verbenone Production. *Microb. Ecol.* 70(4): 1012–1023.
- Yang, J. & Zhang, Y. 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 43(Web Server issue): W174–81.
- Yin, L.J., Huang, P.S. & Lin, H.H. 2010. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* Sp. YJ5. *J. Agric. Food Chem.* 58(17): 9833–9837.
- Yokoe, Y. 1964. Cellulase activity in the termite, *Leucotermes speratus*, with new evidence in support of a cellulase produced by the termite itself. *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Tokyo* 14: 115 – 120.
- Yun, J.H., Roh, S.W., Whon, T.W., Jung, M.J., Kim, M.S., Park, D.S., Yoon, C., Do Nam, Y., Kim, Y.J., Choi, J.H., Kim, J.Y., Shin, N.R., Kim, S.H., Lee, W.J. & Bae, J.W. 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(17): 5254–5264.
- Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N. & Faruq, G. 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 66: 751–774.
- Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergdottir, S.R., Ladoukakis, E., Isupov, M.N., Chatziioannou, A., Peng, X., Littlechild, J.A., Skretas, G. & Kollis, F.N. 2016. Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. *PLoS One* 11(1): 1–18.
- Zhang, D., Allen, A.B. & Lax, A.R. 2012a. Functional analyses of the digestive β -glucosidase of Formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). *J. Insect Physiol.* 58(1): 205–210.
- Zhang, D., Lax, A.R., Henrissat, B., Coutinho, P., Katiya, N., Nierman, W.C. & Fedorova, N. 2012b. Carbohydrate-active enzymes revealed in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) transcriptome. *Insect Mol. Biol.* 21(2): 235–245.
- Zhang, Y.H.P. & Lynd, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88(7): 797–824.
- Zhang, F., Zhang, X.M., Yin, Y.R. & Li, W.J. 2015. Cloning, expression and characterization of a novel GH5 exo/endoglucanase of *Thermobifida halotolerans* YIM 90462Tby genome mining. *J. Biosci. Bioeng.* 120(6): 644–649.
- Zhang, P., Yuan, Y., Du, Y. & Li, J.J. 2018. Heterologous expression and biochemical characterization of a GHF9 endoglucanase from the termite *Reticulitermes speratus* in

- Pichia pastoris*. BMC Biotechnol. 18:35.
- Zhao, P.Y., Jung, J.H. & Kim, I.H. 2012. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. J. Anim. Sci. 90(3): 833–839.
- Zhou, X., Smith, J.A., Oi, F.M., Koehler, P.G., Bennett, G.W. & Scharf, M.E. 2007. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. Gene 395(1-2): 29–39.
- Zhu, J.Y. & Pan, X.J. 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. Bioresour. Technol. 101(13): 4992–5002.
- Zhu, Y., Zhou, H., Bi, Y., Zhang, W., Chen, G. & Liu, W. 2013. Characterization of a family 5 glycoside hydrolase isolated from the outer membrane of cellulolytic *Cytophaga hutchinsonii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97(9): 3925–3937.

Anexo

Tabla A1. Soluciones, *buffers* y medio de cultivo

	Componentes	Volumen, masa o concentración
Soluciones y <i>buffers</i>		
Solución fisiológica	NaCl	9 g/L
Reactivo Ácido dinitrosalicílico (DNS)	Agua destilada	141,6 mL
	3,5- Ácido dinitrosalicílico	1,06 g
	NaOH	1,98 g
	Tartrato de sodio y potasio	30,6 g
	Fenol (50 °C)	0,76 mL
Buffer de muestra (zimografía)	Metabisulfito de sodio	0,83 g
	Tris-HCl pH 6.0	50 mM
	EDTA	8,2 mM
	SDS	1% (p/v)
	Azul de bromofenol	0,025% (p/v)
Buffer de equilibrio (2D)	Tris-HCl pH 8,8	50 mM
	Urea	6 M
	Glicerol	30% (v/v)
	SDS	2% (p/v)
	DTT	1% (p/v)
Buffer de rehidratación (2D)	Urea	8 M
	CHAPS	2% (p/v)
	Azul de bromofenol	0,025% (p/v)
	IPG <i>buffer</i> pH 4-7	0,5%
	DTT	20 mM
Buffer de lisis	Tris-HCl pH 7	20 mM
	KCl	20 mM
	EDTA	1 mM
	Igepal	0,2% (v/v)
	DTT	1 mM
	Imidazol	10 mM
	Inhibidor de proteasas	0,1% (v/v)
Buffer de lavado	Tris-HCl pH 7	20 mM
	KCl	20 mM
	EDTA	1 mM
	Igepal	0,1% (v/v)
	Imidazol	20 mM
Buffer de elución	Tris-HCl pH 7	20 mM
	KCl	20 mM
	EDTA	1 mM
	Igepal	0,1% (v/v)
	Imidazol	250 mM
Solución TFBI pH (5,8)	KCH ₃ CO ₂	30 mM
	CaCl ₂ .2H ₂ O	10 mM
	MnCl ₂ .4H ₂ O	50 mM
Solución TFBII pH (6,5)	Mops	10 mM
	CaCl ₂ .2H ₂ O	75 mM
	KCl	10 mM
	Glicerol	15% (v/v)
TBS Tween 20	Tris-HCl pH 7,5	100 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1%
Buffer fosfatasa alcalina	Tris-HCl pH 9	0,1 mM

(BREFA)		
	NaCl	0,1M
	MgCl ₂	25 mM
Medios de cultivo		
Medio mínimo (MM)* (pH7)	K ₂ HPO ₄	1,67 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,87 g/L
	NaCl	0,05 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g/L
	NH ₄ Cl	1 g/L
	CaCl ₂	0,04 g/L
	FeCl ₃	0,004 g/L
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005 g/L
	Biotina	0,01 g/L
	Ácido nicotínico	0,02 g/L
	Ácido pantoténico	0,01 g/L
Luria Bertani (LB) (pH7)	Triptona	10 g/L
	Extracto de levadura	5 g/L
	NaCl	10 g/L

*Hankin & Anagostakis, 1977

En los medios que así lo requirieron, se agregó (p/v): extracto de levadura 0,1% (EL, Bacto), Carboximetilcelulosa 1% (CMC, Sigma), Xilano (de abedul) 0,5% (XI, Sigma), Avicel 0,5% (AV, Fluka), Bagazo de caña de azúcar 0,5% (BCA), Pasto de Elefante 0,5% (PE) y Agar bacteriológico 1,5% (Bacto).

Tabla A2. Lista de secuencias de ARNr 16S obtenidas de la bibliotecas de clones CMC *N. aquilinus* (CMC-NA) y CMC *C. fulviceps* (CMC-FA).

Número de clon	Número de Acceso	Género más cercano	Identidad (%)	Número acceso Genbank
CMC-NA 11	KJ933511	<i>Cohnella</i> sp.	97	GQ284473
CMC-NA 23	KJ933518	<i>Burkholderia ferrariae</i>	97	AB537487
CMC-NA 31	KJ933512	<i>Cohnella</i> sp.	97	GQ284473
CMC-NA 35	KJ933513	<i>Cohnella damuensis</i>	96	EU912527
CMC-NA 38	KJ933514	<i>Cohnella</i> sp.	96	GQ284473
CMC-NA 54	KJ933515	<i>Cohnella damuensis</i>	96	EU912527
CMC-NA 68	KJ933516	<i>Cohnella damuensis</i>	95	EU912527
CMC-NA 85	KJ933519	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	KC832934
CMC-NA 98	KJ933520	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	KC832934
CMC-NA 160	KJ933517	<i>Cohnella</i> sp.	98	GQ284473
CMC-CF 2	KJ933521	<i>Paenibacillus favisporus</i>	98	EU798300
CMC-CF 62	KJ933510	<i>Acinetobacter genomosp.</i>	99	FJ694759
CMC-CF 74	KJ933522	<i>Paenibacillus soli</i>	96	NR043708
CMC-CF 80	KJ933523	<i>Paenibacillus xylanisolvens</i>	96	AB495094
CMC-CF 86	KJ933524	<i>Paenibacillus cineris</i>	99	NR042189
CMC-CF 89	KJ933525	<i>Paenibacillus cineris</i>	97	NR042189
CMC-CF 95	KJ933526	<i>Paenibacillus cineris</i>	99	NR042189
CMC-CF 100	KJ933527	<i>Paenibacillus cineris</i>	99	NR042189
CMC-CF 120	KJ933528	<i>Paenibacillus favisporus</i>	95	AY308758
CMC-CF 140	KJ933529	<i>Roseomonas</i> sp.	96	HQ588850

Tabla A3. Identificación de proteínas correspondientes a las bandas que presentaron actividad en los zimogramas, mediante espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF.

Banda ID	Número banda	Nombre/Descripción Proteína	Especies	Número Acceso	PM Teórico (kDa)	Péptidos <i>matches</i> (#)	Score	Cobertura Secuencia (%)	Identidad (%)
A1	NSAg58	S-layer homology domain-containing protein carbohydrate ABC transporter permease DEAD/DEAH box helicase, partial hypothetical protein BOC59_18540	<i>Cohnella</i> sp. CIP 111063	WP_094049646.1	56,43	R.ENRTLNSFVETVLGNYAKR.E K.RENRTLNSFVETVLGNYAK.R	26,5	47	70
			<i>Cohnella</i> sp. CIP 111063	WP_094049874.1	33		52,8	61	75
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PLK94679	147,73		42,8	80	55
			<i>Burkholderia pseudomallei</i>	ARM01788		29,1	66	64	
A2	NSAg57	ACT domain-containing protein ACT domain-containing protein	<i>Cohnella</i> sp. OV330	WP_090115601	15,95	M.KEETFYLVREDVLPDAMR.K	36,7	85	65
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PCQ22018	16,83		39,7	100	56
A3	FIAg38	collagenase ACT domain-containing protein	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	WP_038737440	70,95		26,5	50	57
			<i>Bacillales</i>	WP_053434259	16,61	K.EETFYLVREDVLPDAMRK.T	50,7	80	88
A4	FIAg36	urea ABC transporter permease subunit UrtC enoyl-CoA hydratase ACT domain-containing protein	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_067662214	39,16		28,6	65	63
			<i>Roseomonas stagni</i>	WP_092957408	28,16	R.SAFYKYRDAVFPFYTVMVK.E	54,5	65	80
			<i>Bacillales</i>	WP_062177217	16,5		41,5	90	43
A5	NIAg40	DNA polymerase I DNA polymerase I ABC transporter ATP-binding protein hypothetical protein alpha-ketoglutarate dehydrogenase	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_086212796	101,31		60,8	61	49
			<i>Roseomonas deserti</i>	WP_076957161	71,94		50,1	67	42
			<i>Cohnella</i> sp. OV330	WP_090116142	65,78	R.GQDVLQAAYAK.A	26,9	34	89
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_101968233	27,5	K.ALRGTVRFDGR.S	29,9	50	69
			<i>Burkholderia</i> sp.	AOJ85299	99,77		32,5	73	65
A6	NIAg38	hypothetical protein undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransferase	<i>Cohnella panacarvi</i>	WP_035119420	13,64	K.IFAVLPLFFSWVPIFTWK.R	28,6	60	59
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_040212086	52,25		30,8	85	55

A7	NSAg90	MFS transporter NifU family protein	<i>Burkholderia</i> sp.	WP_062001767	24,42		32	45	89
			<i>Cohnella</i> sp.	WP_094050128	9,68	K.YGVEARLK.E R.LKGACGSCPSSLATLK.Y K.GACGSCPSSLATLKYGVEARLK.E R.LKGACGSCPSSLATLKYGVEAR.L	74,3	97	51
A8	NSCMC90	NifU family protein carbohydrate ABC transporter permease	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PCQ21396	8,8		35,8	86	49
			<i>Cohnella panacarvi</i>	WP_035121549	33	M.RLQSLVLAYNLGNLWR.R	27,8	72	69
A9	NS57CMC	transposase hypothetical protein chemotaxis protein CheA C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AKD43320			28,6	61	82
			<i>Burkholderia cepacia</i>	WP_069273943	19,36		30,8	66	83
A10	NS120CMC	hypothetical protein transcriptional regulator, AraC family DUF2935 domain- containing protein	<i>Cohnella sp.</i>	WP_090117005	79,31	R.DTTDGASPNR.T	26,9	60	73
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KMH74532	18,59	M.PPSAPQDRR.W		26,5	48
A11	NS127CMC	transposase hypothetical protein ribokinase	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	KGW45362	18,81		33,7	96	50
			<i>Cohnella panacarvi</i>	WP_027086391	29,92	R.AIVSHFERQNAVQVITRK.N	25,2	90	58
A12	NS71CMC	transposase hypothetical protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AFJ11386	46,97		28,2	57	67
			<i>Burkholderia cenocepacia</i>	WP_034188747	84,37		29,5	95	52
A13	NS67CMC	DNA-binding response regulator	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_071006764	31,68	R.GDVGCATAPDALHARSAACRIR.D	26,5	83	64
			<i>Burkholderia pseudomallei</i>	ONC34365	14,3	R.LRGDVGCATAPDALHARSAACR.I		50,1	100
A14	NSZ127	S-layer homology domain- containing protein DEAD/DEAH box helicase, partial	<i>Cohnella sp. CIP 111063</i>	WP_094049646	56,43	K.RENRTLSNFVETVLGNYAK.R	26,5	47	80
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PLK94679	147,73		27,8	80	55
A13	NS67CMC	DUF2935 domain- containing protein	<i>Burkholderia metallica</i>	WP_084636098	6,38		29,1	66	64
			<i>Cohnella sp. OV330</i>	WP_090116524	25,41	R.RCAADPFPAR.V	23,5	62	60
A14	NSZ127	hypothetical protein hypothetical protein S-layer homology domain- containing protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_050339555	17,82		25,7	87	47
			<i>Burkholderia ubonensis</i>	KVZ39897	14,3		31,2	95	57
A14	NSZ127	DEAD/DEAH box helicase, partial	<i>Cohnella sp. CIP 111063</i>	WP_094049646	56,43	R.ENRTLSNFVETVLGNYAKR.E	26,5	47	70
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PLK94679	147,73		27,8	80	55

		DUF2935 domain-containing protein	<i>Burkholderia metallica</i>	WP_084636098	6,38		29,1	66	64
A15	NSZ120	N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase	<i>Cohnella thermotolerans</i>	WP_027091168	44,99	R.KELLDNIMPFWTKHSMDK.Q	23,9	46	44
						K.AKVWFELKLDYTWTHFK.D			
A16	NSZ90	L-rhamnose isomerase	<i>Cohnella panacarvi</i>	WP_027084735	46,42	R.AMVEALDAASQARDVDEYTR.L	29,1	100	58
		hypothetical protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_080933575	21,01		31,6	68	73
		FAD-linked oxidase	<i>Burkholderia pseudomultivorans</i>	WP_069245319	147,29		34,1	86	65
A17	NSZ71	acetyl-CoA C-acyltransferase	<i>Cohnella</i> sp. OV330	WP_090114929	43,34	R.GMGTVWRAEDELGRVAVK.E	26,9	73	73
		serine/threonine protein kinase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OON54479	39,16		30,8	91	62
		pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	<i>Burkholderia</i> sp. OK233	WP_097391899	42,9		29,9	34	100
A18	NSZ67	ACT domain-containing protein	<i>Cohnella</i> sp. OV330	WP_090115601	15,95	K.EETFYLVREDVLPDAMRK.T	45,1	96	38
						M.KEETFYLVREDVLPDAMR.K			
						R.SAFYKYRDAVFPFYTMVK.E			
		ACT domain-containing protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PCQ22018	16,83		52	83	45
A19	NSZ57	sugar ABC transporter permease	<i>Cohnella thermotolerans</i>	WP_027092234	32,01	R.AGFVVPLLVRAGFVVPLLVR.A	26,1	75	48
		ABC transporter permease	<i>Klebsiella michiganensis</i>	AJZ88321	43,12		25,9	87	58
		ABC transporter permease	<i>Burkholderia cepacia</i>	WP_059708834	30,36		29,1	87	48
A20	NIZ40	hypothetical protein	<i>Cohnella thermotolerans</i>	WP_027092057	39,71	R.MGYLAKEGLQLSGGTCQTPEK.G	25,4	43	57
		AraC family transcriptional regulator	<i>Klebsiella oxytoca</i>	WP_064290050	30,25		26,9	60	73
		amino acid ABC transporter substrate-binding protein	<i>Burkholderia ambifaria</i>	WP_057924485	29,04		29,1	91	57
A21	FIZ40	ACT domain-containing protein	<i>Paenibacillus ginsengihumi</i>	WP_019533503	17,16	M.KEETFYLVREDVLPDAMR.K	43,9	92	37
						R.SAFYKYRDAVFPFYTMVK.E			
		branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	<i>Roseomonas</i> sp. TAS13	WP_075823089	31,46		23,9	47	53
A22	NS90	catalase/peroxidase HPI	<i>Cohnella panacarvi</i>	WP_027084604	80,08	K.IQGEFNNGGKK.I	36,2	91	39
						K.EGKGAGTVPDAHDPGK.K			
						K.VLAALEKIQGEFNNGGKK.I			

						K.GGDAITSGLEVIWTSTPTK.W			
						R.DFVAAWQKVMELDRFDLK.-			
		catalase/peroxidase HPI	<i>Klebsiella aerogenes</i>	WP_049060299	57,2		43,9	65	42
		catalase/peroxidase HPI	<i>Burkholderia glumae</i>	WP_015878121	79,97		48,1	91	45
A23	NS120	glycosyl hydrolase family 88	<i>Cohnella thermotolerans</i>	WP_027091704	40,37	R.STLLTFGGAYSNHIRAVAAAGR.A	25,2	50	75
		aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	<i>Klebsiella oxytoca</i>	WP_064290489	43,67		28,6	66	57
		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase	<i>Burkholderia contaminans</i>	WP_047853376	32,12		29,9	75	56
A24	NS127	sensor histidine kinase	<i>Cohnella laeviribosi</i>	WP_019004573	66,55	K.QAANSLVTETSQYVFVFCR.S	24	90	56
		ABC transporter permease	<i>Burkholderia ubonensis</i>	WP_095401389	26,4		31,2	76	69
		hypothetical protein	<i>Klebsiella michiganensis</i>	WP_047684886	115,62		24,4	80	56
B1	NS	S-layer homology domain-containing protein	<i>Cohnella</i> sp. CIP 111063	WP_094049646	56,43	K.RENRTLNSNFVETVLGNYAK.R	26,5	47	70
		DEAD/DEAH box helicase, partial	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PLK9467	147,73		27,8	80	55
		DUF1778 domain-containing protein	<i>Burkholderia metallica</i>	WP_084636098	6,38		29,1	66	64
B2	FIAg	hypothetical protein	<i>Paenibacillus odorifer</i>	WP_076296348	35,31	K.RENRTLNSNFVETVLGNYAK.R	30,8	80	65
		SCPU domain-containing protein	<i>Acinetobacter defluvii</i>	WP_065993232	19,36		28,6	80	65
		hypothetical protein	<i>Roseomonas rosea</i>	WP_073136620	9,24		27,8	57	53
B6	FI42CMC	Paenibacillus sp.	Acyl-CoA dehydrogenase	WP_083436189	62,59	K.IVRDLRVHR.I R.ILEGTNEIMR.L	34,6	73	58
		Acinetobacter baumannii	Acyl-CoA dehydrogenase	SCZ17897	42,57		32,3	20	76
		Roseomonas stagni	Acyl-CoA dehydrogenase	WP_092956943	42,02		40,4	42	87

^a Base de datos *Cohnella* (Uniprot)

^b Base de datos *Klebsiella* (Uniprot)

^c Base de datos *Burkholderia* (Uniprot)

* Solo se agregaron las secuencias peptídicas más largas.

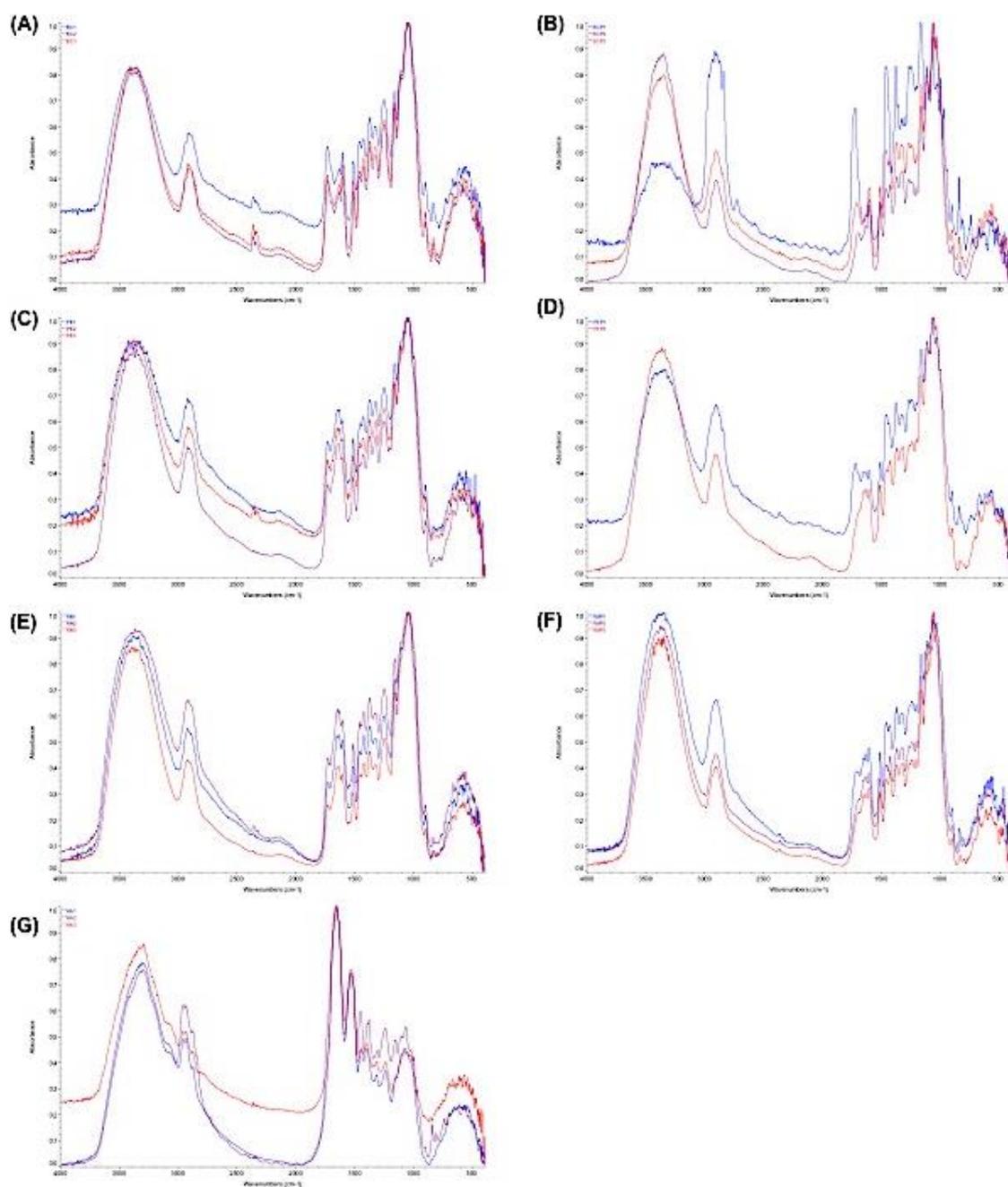


Figura A1. Espectros FT-IR. (A) Bagazo de caña de azúcar no tratado (BCA) **(B)** Bagazo de caña de azúcar pretratado (BCA-P) **(C)** Pasto elefante no tratado (PE) **(D)** Pasto elefante pretratado (PE-P) **(E)** Rastrojo de maíz no tratado (RM) **(F)** Rastrojo de maíz pretratado (RM-P) **(G)** Harina de algodón (HA).

Tabla A4. Distribución de OTUs compartidas a lo largo de las réplicas biológicas de *A. grandis* alimentado con las dietas artificiales HA, RM y PE.

OTUs	Phylum	Familia	Género
Harina de algodón (HM)			
0001	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0002	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
0004	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Delftia</i> sp.
0006	Firmicutes	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i> sp.
0007	Firmicutes	Paenibacillaceae	<i>Fontibacillus</i> sp.
0008	Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
0011	Actinobacteria	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i> sp.
0014	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0015	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0016	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
0018	Proteobacteria	no clasificado	no clasificado
0020	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
0022	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.
0024	Firmicutes	Paenibacillaceae	<i>Cohnella</i> sp.
0030	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.
0031	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i> sp.
0032	Proteobacteria	Hydrogenophilaceae	<i>Hydrogenophilus</i> sp.
0041	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
0048	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Undibacterium</i> sp.
0062	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Cloacibacterium</i> sp.
0071	Firmicutes	Enterococcaceae	no clasificado
0109	Proteobacteria	no clasificado	no clasificado
0144	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0170	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0173	Proteobacteria	no clasificado	no clasificado
0218	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	no clasificado
0291	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0362	Proteobacteria	Comamonadaceae	no clasificado
Rastrojo de maíz (RM)			
0001	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0002	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
0003	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0004	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Delftia</i> sp.
0005	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0006	Firmicutes	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i> sp.
0007	Firmicutes	Paenibacillaceae	<i>Fontibacillus</i> sp.
0008	Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
0009	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0010	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0011	Actinobacteria	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i> sp.
0012	Fibrobacteres	Fibrobacteraceae	no clasificado
0013	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0014	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0015	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0017	Spirochaetes	Spirochaetaceae	no clasificado
0021	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0022	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.
0023	Firmicutes	Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> sp.
0025	Proteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i> sp.
0027	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.

0029	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0031	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i> sp.
0035	Proteobacteria	no clasificado	no clasificado
0036	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i> sp.
0038	Firmicutes	Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> sp.
0043	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0049	Spirochaetes	Spirochaetaceae	no clasificado
0050	Fibrobacteres	Fibrobacteraceae	no clasificado
0051	Firmicutes	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> sp.
0053	Actinobacteria	no clasificado	no clasificado
0054	Acidobacteria	Holophagae_no clasificado	no clasificado
0056	Fibrobacteres	Fibrobacteraceae	no clasificado
0057	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0058	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0064	Fibrobacteres	Fibrobacteraceae	no clasificado
0066	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0068	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0070	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0071	Firmicutes	Enterococcaceae	no clasificado
0072	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0074	Proteobacteria	Rhizobiaceae	no clasificado
0079	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0080	Firmicutes	Family XI	<i>Anaerococcus</i> sp.
0081	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0082	Firmicutes	Family XIII	no clasificado
0083	Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i> sp.
0084	Spirochaetes	Spirochaetaceae	no clasificado
0085	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0088	Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	<i>Tannerella</i> sp.
0089	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0096	Fibrobacteres	no clasificado	no clasificado
0100	Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	<i>Tannerella</i> sp.
0102	Chlorobi	no clasificado	no clasificado
0104	Planctomycetes	Planctomycetaceae	no clasificado
0105	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0106	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0110	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0113	Firmicutes	Lachnospiraceae	no clasificado
0117	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0121	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0122	Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	no clasificado
0128	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0129	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0130	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0131	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0132	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0133	Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	no clasificado
0138	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0139	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0141	Firmicutes	Family XIII	no clasificado
0142	Actinobacteria	no clasificado	no clasificado
0143	Spirochaetes	Leptospiraceae	no clasificado
0144	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0147	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0148	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0150	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0154	no clasificado	no clasificado	no clasificado

0157	Firmicutes	Lachnospiraceae	no clasificado
0159	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0166	Firmicutes	Family XIII	no clasificado
0167	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0168	Firmicutes	Family XIII	no clasificado
0169	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0174	Firmicutes	Family XI	<i>Peptoniphilus</i> sp.
0185	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0189	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0193	Proteobacteria	Methylophilaceae	<i>Methylophilus</i> sp.
0194	Firmicutes	Syntrophomonadaceae	no clasificado
0195	Firmicutes	no clasificado	no clasificado
0200	Firmicutes	no clasificado	no clasificado
0201	Firmicutes	Peptococcaceae	no clasificado
0202	Bacteroidetes	Cytophagaceae	Spirosoma sp.
0203	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0204	Spirochaetes	Spirochaetaceae	no clasificado
0206	Firmicutes	Christensenellaceae	no clasificado
0212	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0225	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0229	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0233	Firmicutes	Clostridiaceae_1	no clasificado
0234	Synergistetes	Synergistaceae	no clasificado
0238	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0240	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0241	Firmicutes	Bacillaceae	no clasificado
0243	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0244	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0246	Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i> sp.
0248	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0252	Cyanobacteria	no clasificado	no clasificado
0256	Fibrobacteres	no clasificado	no clasificado
0260	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0261	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0263	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0264	Planctomycetes	Planctomycetaceae	no clasificado
0265	Proteobacteria	Acetobacteraceae	<i>Acidicaldus</i> sp.
0270	Firmicutes	Christensenellaceae	no clasificado
0271	Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Anaerotruncus</i> sp.
0273	Firmicutes	Peptococcaceae	<i>Dehalobacterium</i> sp.
0281	Fibrobacteres	no clasificado	no clasificado
0287	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0300	Tenericutes	Mollicutes_RF9_no clasificado	no clasificado
0304	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0305	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0306	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0308	Parcubacteria	no clasificado	no clasificado
0309	Bacteroidetes	no clasificado	no clasificado
0316	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0321	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0322	Tenericutes	Mollicutes_RF9_no clasificado	no clasificado
0325	no clasificado	no clasificado	no clasificado
0328	Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i> sp.
0341	Bacteroidetes	Rikenellaceae	no clasificado
0343	Firmicutes	Lactobacillales_no clasificado	no clasificado
0372	Actinobacteria	no clasificado	no clasificado
0401	no clasificado	no clasificado	no clasificado

0406	Proteobacteria	no clasificado	no clasificado
0425	Firmicutes	Ruminococcaceae	no clasificado
0432	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0436	Spirochaetes	Spirochaetaceae	no clasificado
0445	Firmicutes	Peptococcaceae	<i>Sporotomaculum</i> sp.

Pasto elefante (PE)

0001	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0002	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
0003	Spirochaetes	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i> sp.
0004	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Delftia</i> sp.
0006	Firmicutes	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i> sp.
0007	Firmicutes	Paenibacillaceae	<i>Fontibacillus</i> sp.
0008	Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
0011	Actinobacteria	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i> sp.
0014	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0015	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.
0018	Proteobacteria	no clasificado	no clasificado
0022	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.
0032	Proteobacteria	Hydrogenophilaceae	<i>Hydrogenophilus</i> sp.
0033	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Geobacillus</i> sp.
0036	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i> sp.
0039	Actinobacteria	Intrasporangiaceae	no clasificado
0044	Proteobacteria	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i> sp.
0046	Actinobacteria	no clasificado	no clasificado
0055	Actinobacteria	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i> sp.
0060	Firmicutes	no clasificado	no clasificado
0092	Firmicutes	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> sp.
0144	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
0173	Proteobacteria	no clasificado	no clasificado
0214	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	no clasificado
