



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA  
POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

**Evaluación del metabolismo de producción del glucógeno y enzimas  
CAZymes y FOLymes de *Leucoagaricus gongylophorus*.**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

**Presenta:** GABRIELA CEJAS AÑÓN

**Co-Director:** DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMÍREZ

**Co-Director:** DR. ROBERTO OLIVARES HERNÁNDEZ

**Asesor:** M. en I. Q SERGIO HERNÁNDEZ JIMÉNEZ

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE, 2021  
MÉXICO

## DEDICATORIA

*A todos aquellos que me brindaron su Sí se puede, a mi abuela Berta por su guía en la distancia.*

## AGRADECIMIENTOS

*El presente trabajo se realizó en el Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa bajo la dirección del Dr. Gabriel Viguera Ramírez y el Dr. Roberto Olivares Hernández. Además, contó para su realización con la colaboración y asesoría del Mtro. Sergio Hernández Jiménez del laboratorio de bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa.*

*Gabriela Cejas Añón contó con beca de posgrado CONACyT (CVU 1035931) para realizar este trabajo. Agradecer a los proyectos SEP-CONACyT No. 287615 y CONACyT A1-S-30750 por su financiamiento y apoyo.*



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería (PCNI) de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa. El trabajo teórico-práctico, fue conducido por el Dr. Gabriel Vigueras Ramírez y el Dr. Roberto Olivares Hernández de diciembre-2019 a diciembre-2021 en la UAM Cuajimalpa. El procedimiento experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioprocesos de la Unidad Cuajimalpa.



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, Gabriela Cejas Añón, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que éste fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'GCA', is positioned above the printed name of the student.

Gabriela Cejas Añón

Nombre y firma del alumno



## DECLARACIÓN DE NO LUCRO

“La que suscribe, Gabriela Cejas Añón, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana y Gabriela Cejas Añón.”



Gabriela Cejas Añón

Nombre y firma del alumno

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>Capítulo II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>24</b>
2.1. <i>Materiales lignocelulósicos. ....</i>	24
2.2. <i>Estructura y propiedades químicas de los materiales lignocelulósicos. ....</i>	25
2.2.1. Celulosa. ....	26
2.2.2. Hemicelulosa.....	27
2.2.3. Lignina.....	28
2.2.4. Pectina. ....	29
2.3. <i>Degradación biológica de materiales lignocelulósicos.....</i>	30
2.3.1. Hongos degradadores de la lignocelulosa. ....	31
2.4. <i>Mutualismo entre Atta mexicana y Leucoagaricus gongylophorus. ....</i>	33
2.5. <i>Capacidad metabólica de Leucoagaricus gongylophorus.....</i>	35
2.5.1. Enzimas con actividad lignocelulósica. ....	36
2.5.2. Celulasas. ....	36
2.5.3. Hemicelulasas.....	37
2.5.4. Pectinasas.....	38
2.5.5. Síntesis de glucógeno. ....	39
2.6. <i>Reconstrucción de redes metabólicas en microorganismos.....</i>	41

2.6.1. Análisis bioinformáticos de redes metabólicas. ....	43
2.6.2. Análisis de vías metabólicas. ....	44
2.6.3. Análisis de modos elementales aplicado a la ingeniería metabólica. ....	46
<b>Capítulo III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>Capítulo IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo V. HIPÓTESIS .....</b>	<b>50</b>
<b>Capítulo VI. OBJETIVO .....</b>	<b>51</b>
6.1. <i>Objetivo general.</i> .....	51
6.1.1. <i>Objetivos específicos.</i> .....	51
<b>Capítulo VII. METODOLOGÍA .....</b>	<b>52</b>
7.1. <i>Microorganismo.</i> .....	52
7.2. <i>Cultivos sumergidos.</i> .....	52
7.3. <i>Análisis de muestras.</i> .....	53
7.3.1. <i>Determinación de la concentración de CO<sub>2</sub> y biomasa en peso seco.</i> ..	53
7.3.2. <i>Análisis elemental (C, H, N y S).</i> .....	53
7.3.3. <i>Determinación de la producción de glucógeno.</i> .....	53
7.3.4. <i>Ensayos de actividad enzimática.</i> .....	54
7.4. <i>Análisis de enzimas CAZymes y FOLymes de L. gongylophorus.</i> .....	54
7.4.1. <i>Análisis filogenético de enzimas CAZymes codificadas en el genoma de L. gongylophorus LEU18496.</i> .....	55



7.5. Construcción de una red del metabolismo central del carbono de <i>L. gongylophorus</i> LEU18496. ....	55
7.6. Análisis de modos elementales (EMA). ....	56
<b>Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
8.1. Cultivo de <i>L. gongylophorus</i> en diferentes fuentes de carbono. ....	57
8.1.1. Determinación de glucógeno en cada fuente de carbono. ....	59
8.1.2. Ensayos enzimáticos. ....	61
8.2. Análisis de proteínas CAZymes y FOLymes en el genoma de <i>L. gongylophorus</i> . ....	62
8.2.1. Análisis filogenético de enzimas CAZymes. ....	64
8.3. Construcción de una red metabólica de <i>L. gongylophorus</i> . ....	67
8.4. Análisis de modos elementales. ....	74
<b>Capítulo IX. CONCLUSIONES</b> .....	<b>80</b>
<b>Capítulo X. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>82</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>83</b>
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

2.1	Porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina en diversos materiales.....	26
7.1	Medio mineral con diversas fuentes de carbono para la producción de glucógeno y enzimas.....	52
8.1	Composición elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno de diferentes sustratos expresados en % relativos.....	57
8.2	Rendimientos obtenidos a los 28 días de cultivo de <i>L. gongylophorus</i> con cada sustrato.....	61
8.3	Unidades de actividad pectinasa, xilanasas y endoglucanasas producidas por <i>L. gongylophorus</i> a los 28 días de cultivo en fuentes de carbono como pectina, carboximetilcelulosa y xilano.....	62
8.4	Distribución de las proteínas CAZymes, FOLymes y proteasas encontradas en <i>L. gongylophorus</i> LEU18496.....	64
8.5	Comportamiento de los modos elementales de mayor rendimiento teórico para cada sustrato.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

- 2.1 Análisis de una red metabólica simple. (A) Declaración del problema. El sistema consta de metabolitos internos A, B, C, D y P que están unidos a través de las reacciones internas  $r_2$ ,  $r_3$ ,  $r_5$ ,  $r_6$ ,  $r_7$ ..... 45
- 8.1 Perfiles de  $CO_2$  de *Leucoagaricus gongylophorus* LEU18496 cultivados en pectina y carboximetilcelulosa (CMC) a 10 y 20 g/L respectivamente. A: CMC 10 g/L B: CMC 20 g/L, C: Pectina 10 g/L D: Pectina 20 g/L..... 59
- 8.2 Análisis filogenético de proteínas CAZymes encontradas en *L. gongylophorus* LEU18496. Los números al lado de cada nodo, en rojo, representan una medida de soporte para el nodo, donde 1 representa el soporte máximo..... 65
- 8.3 Representación gráfica de la red metabólica del metabolismo central del carbono de *Leucoagaricus gongylophorus* a partir de la degradación de pectina, celulosa y xilano..... 68
- 8.4 Representación gráfica de los modos elementales (flechas de colores) utilizados por los sustratos pectina, celulosa y xilano en la síntesis de glucógeno realizada por *L. gongylophorus*..... 79

## ABREVIATURAS

MFA: análisis de flujo metabólico

FBA: análisis de balance de flujo

MPA: análisis de vías metabólicas

EMA: análisis de modos elementales

EM: modo elemental

GH: glicosil hidrolasas

CMC: carboximetilcelulosa

PEC: pectina

CLS: celulosa

XIL: xilano

DNS: 3.5-ácido-dinitrosialicílico

G6P: glucosa-6-fosfato

6PGL: 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona

6PGC: 6-fosfo-D-gluconato

F6P: fructosa-6-fosfato

F1.6BP: fructosa-1.6-bifosfato

DHP: dihidroxiacetona fosfato

## ABREVIATURAS

G3P: gliceraldehido-3-fosfato

3PG: 3-fosfoglicerato

2PG: 2-fosfoglicerato

Ru5P: ribulosa-5-fosfato

R5P: ribosa-5-fosfato

GLN: galacturonato

D-GLN: digalacturonato

S7P: sedoheptulosa-7-fosfato

PEP: fosfoenolpiruvato

OXA: oxalacetato

ACCoa: acetil coenzima A

CIT: citrato

ICIT: isocitrato

OG:  $\alpha$ -ceto-glutarato

Gly: glucógeno Pi: fosfato

X5P: xilulosa-5-fosfato

E4P: eritrosa-4-fosfato

MAL: malato

SUC: succinato

ATP: trifosfato de adenosina

## ABREVIATURAS

ADP: difosfato de adenosina

UTP: uridin trifosfato

UDP: uridin difosfato

pepck: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

pc: piruvato carboxilasa

hk: hexoquinasa

fbp: fructosa-1.6-bisfosfatasa

gpi: glucosa-6-fosfato isomerasa

pfk: fosfofructoquinasa

fpa: fructosa bifosfato aldolasa

egl: endoglucanasa

gls:  $\beta$ glucosidasa

htx2: transportador simporte de glucosa

htx7: transportador simporte de xilosa

xsd: 1.4-  $\beta$ -xilosidasa

xyl: endo-1.4- $\beta$ -xilanasa

xlr1: xilosa reductasa

xdh: xilitol deshidrogenasa

xlk: xilulosa quinasa

aki: trioosafosfato isomerasa

## ABREVIATURAS

ghp: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

pgk: fosfoglicerato quinasa

pgl: fosfoglicerato mutasa

eno: enolasa

pki: piruvato quinasa

aceEF: piruvato deshidrogenasa

pph: pectina esterasa

egp: endopoligalacturonasa

exp: exopoligalacturonasa

gatA: transportador siporte de galacturonato

dgr: galacturonato reductasa

lgd: galactonato deshidratasa

dha: 3-desoxi-hexilosonato aldolasa

lgr: gliceraldehído reductasa

gld: glicerol deshidrogenasa

ald: aldehído deshidrogenasa

glk: glicerato quinasa

rpe: ribulosa-5-fosfato epimerasa

rpi: ribosa-5-fosfato isomerasa

tkl: transcetolasa

## ABREVIATURAS

tal: transaldolasa

g6d: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

ppg: 6-fosfogluconolactonasa

pgd: fosfogluconato deshidrogenasa

pgm: fosfoglucomutasa

usp: UDP-glucosa pirofosforilasa

gnn: glucogenina

gls: glucógeno sintasa

glg: enzima ramificadora del glucógeno

glfA: citrato sintasa

acn: aconitasa

acg:  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa

icd: isocitrato deshidrogenasa

scs: succinilCoA sintetasa

sdh: succinato deshidrogenasa

fum: fumarato hidratasa

mdh: malato deshidrogenasa



## RESUMEN

*Leucoagaricus gongylophorus* es un hongo perteneciente a la división Basidiomycota que se encuentra en la naturaleza estableciendo una relación mutualista con hormigas cortadoras de hojas pertenecientes al género *Atta*, *Acromyces* entre otras. Se ha demostrado que este hongo es capaz de crecer sobre sustratos lignocelulósicos a partir de la secreción de enzimas CAZymes y FOLymes además de sintetizar compuestos como el glucógeno que ayudan a establecer esta simbiosis. Esta investigación tiene como objetivo evaluar el metabolismo de producción del glucógeno y enzimas CAZymes y FOLymes de *L. gongylophorus* en los sustratos modelos pectina, celulosa y xilano. Con base a los resultados obtenidos el hongo *L. gongylophorus* fue capaz de crecer en los tres sustratos lignocelulósicos modelo, alcanzando rendimientos biomasa-sustrato iguales a  $Y_{biomasa/xilano} = 0.73$  (g biomasa/g xilano),  $Y_{Biomasa/CMC} = 0.62$  (g biomasa/g CMC) y  $Y_{biomasa/pectina} = 0.44$  (g biomasa/g pectina) para cada fuente de carbono utilizada. El xilano fue el sustrato más eficiente en la formación de biomasa y la pectina el que menos favoreció la obtención de este producto. La producción de glucógeno se determinó en los tres sustratos lignocelulósicos modelos utilizados, obteniéndose el mayor contenido de glucógeno por gramos de biomasa seca  $Y_{glucógeno/biomasa} = 220.9$  (mg glucógeno/g biomasa) para los cultivos que crecieron en xilano y  $Y_{glucógeno/biomasa} = 73.5$  (mg glucógeno/g biomasa) y  $Y_{glucógeno/biomasa} = 34.6$  (mg glucógeno/g biomasa) para los cultivos de *L. gongylophorus* desarrollados en carboximetilcelulosa y pectina respectivamente. Se detectó actividad pectinasa, endo- $\beta$ -1.4-xilanasa y endo- $\beta$ -1.4-glucacanasas en todas las fuentes de carbono analizadas luego de 28 días de cultivo. Al crecer en pectina la actividad pectinasa, xilanasa y endoglucanasa determinada alcanzó valores máximos de 264.09 mU, 25.56 mU y 23.55 mU de respectivamente, demostrando que este sustrato es importante en la síntesis de este tipo de enzimas. Se llevó a cabo un análisis de enzimas CAZymes y FOLymes que resultaron en la anotación de 169 proteínas en el genoma de *L. gongylophorus* siendo mayor las proteínas incluidas en el grupo CAZymes con 128 proteínas en total mientras que sólo 36 se encontraron en el grupo FOLymes. Fue construida una red del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* que cuenta

## RESUMEN

con 58 reacciones e incluye las vías metabólicas encargadas de degradar los sustratos lignocelulósicos pectina, celulosa y xilano; además de una ruta para la síntesis de glucógeno. Con la realización de este estudio se logra la obtención de la primera red metabólica realizada para *L. gongylophorus* teniendo en cuenta la síntesis de glucógeno a partir de la degradación de sustratos lignocelulósicos modelos. El análisis de modos elementales realizado arrojó que el mayor  $Y_{P/S}$  obtenido se alcanzó al utilizar xilano como fuente de carbono, con un valor de  $Y_{\text{glucógeno/xilano}} = 2$  (mol glucógeno/ mol xilosa).

## ABSTRACT

*Leucoagaricus gongylophorus* is a fungus belonging to the Basidiomycota division that is found in nature, establishing a mutualistic relationship with leaf-cutter ants belonging to the genus *Atta*, *Acromyces* among others. This fungus has been shown to be capable of growing on lignocellulosic substrates from the secretion of CAZymes and FOLymes enzymes, as well as synthesizing compounds such as glycogen that help establish this symbiosis. This research aims to evaluate the metabolism of glycogen production and CAZymes and FOLymes enzymes of *L. gongylophorus* in the model substrates pectin, cellulose and xylan. Based on the results obtained, the fungus *L. gongylophorus* was able to grow on the three model lignocellulosic substrates, reaching biomass-substrate yields equal to  $Y_{biomass/xylan} = 0.73$  (g biomass/g xylan),  $Y_{Biomass/CMC} = 0.62$  (g biomass/g CMC) and  $Y_{biomass/pectin} = 0.44$  (g biomass/g pectin) for each carbon source used. Xylan was the most efficient substrate in the formation of biomass and pectin the one that least favored the obtaining of this product. Glycogen production was determined in the three model lignocellulosic substrates used, obtaining the highest glycogen content per grams of dry biomass  $Y_{glycogen/biomass} = 220.9$  (mg glycogen/g biomass) for the culture that grew in xylan and  $Y_{glycogen/biomass} = 73.5$  (mg glycogen/g biomass) y  $Y_{glycogen/biomasa} = 34.6$  (mg glycogen/g biomass) for the *L. gongylophorus* cultures grown in carboxymethylcellulose and pectin respectively. Pectinase, endo- $\beta$ -1,4-xylanase and endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity was detected in all carbon sources analyzed after 28 days of culture. When growing in pectin, the determined pectinase, xylanase, and endoglucanase activity reached maximum values of 264.09, 25.56 and 23.55 mU respectively, showing that this substrate is important to consider in the synthesis of this type of enzymes. An analysis of CAZymes and FOLymes enzymes was carried out, which resulted in the annotation of 169 proteins in the *L. gongylophorus* genome, the proteins included in the CAZymes group being higher with 128 proteins in total while only 36 were found in the FOLymes group. A network of the central metabolism of the carbon of *L. gongylophorus* was constructed that has 58 reactions and includes the metabolic pathways in charge of degrading the lignocellulosic substrates pectin, cellulose and xylan; as well as a route for glycogen synthesis. With this

## ABSTRACT

study, the first metabolic network carried out for *L. gongylophorus* was obtained, considering the synthesis of glycogen from the degradation of model lignocellulosic substrates. The analysis of elemental modes carried out showed that the highest theoretical  $Y_{p/s}$  obtained was reached when using xylan as a carbon source with a value of  $Y_{\text{glycogen/xylose}} = 2$  (*mol glycogen/mol xylose*).

## INTRODUCCIÓN

Actualmente los biocombustibles satisfacen parte de los requerimientos energéticos en EE. UU, Brasil, Colombia, Japón y algunos países europeos, con una tendencia al aumento en Alemania, España, Inglaterra [Hosseini, 2019]. Por lo tanto, surge el problema sobre la sustentabilidad de las materias primas que se deben usar para generar biocombustibles, ya que actualmente el bioetanol se produce a partir de biomásas alimenticias como el maíz, la caña de azúcar, la yuca, el sorgo, trigo y papa, lo cual, genera competencia con el suministro de alimentos [Cornejo *et al.*, 2019]. De ahí que los residuos lignocelulósicos sean considerados una alternativa para la obtención de bioetanol y/o como fuente de carbono alterna para ser usada en procesos de una biorrefinería [Area, 2016].

Las enzimas que participan en la degradación de la lignocelulosa se producen de especies de hongos y bacterias que degradan naturalmente la celulosa para su crecimiento y obtención de energía. Estas enzimas se utilizan principalmente en forma de cocteles de enzimas, pero tienen una especificidad limitada y su proceso de producción industrial no es económico. Las enzimas producidas comercialmente funcionan mejor en material pretratado, donde se asegura la ruptura de enlaces de lignina, propiciando una composición más homogénea que el material no tratado [Ravindran, 2016]. Por lo tanto, la eficacia de convertir todo el material lignocelulósico en un producto de valor añadido útil depende de la extensión del pretratamiento necesario y de la capacidad de estos complejos multienzimático para degradar la celulosa y hemicelulosa en monómeros más accesibles [Hasunuma *et al.*, 2013].

Para lograr este objetivo es necesario desarrollar tecnologías de producción que incluyan algunos de los siguientes elementos: tratamientos enzimáticos nuevos y efectivos, cepas mejoradas mediante ingeniería genética o comunidades microbianas que mejoren la descomposición de la biomasa vegetal para la producción de biocombustibles. De ahí que sea importante la caracterización de nuevos microorganismos con características metabólicas que satisfagan el proceso de degradación del material lignocelulósico y que existan investigaciones enfocadas a

## INTRODUCCIÓN

encontrar enzimas en diversos organismos que degradan compuestos lignocelulósicos; tales como son los hongos [Tellez-Tellez *et al.*, 2008, Díaz *et al.*, 2011, Jambulingam *et al.*, 2019].

Particularmente interesante ha resultado el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* y la asociación que existe entre las hormigas cortadoras de hojas, con el cual han establecido una relación mutualista [González Ocampo, 2018]. Este hongo basidiomiceto provee las enzimas necesarias que degradan los polímeros vegetales, y de esta forma, se liberan azúcares de los cuales una fracción es utilizada por el mismo hongo para satisfacer sus requerimientos energéticos, mientras que otra fracción es acumulada en forma de glucógeno en estructuras denominadas gonglidios, las cuales constituyen una importante fuente de energía para las hormigas [do Nascimento *et al.*, 2017, Espinoza *et al.*, 2017]. En la literatura existen reportes sobre la asociación de *L. gongylophorus* con las hormigas, sus actividades enzimáticas, sus secuencias de genes y proteínas, sin embargo, aún no se conocen todas sus capacidades metabólicas [Vigueras *et al.*, 2017].

Al igual que las herramientas experimentales, las bioinformáticas han facilitado la reconstrucción del metabolismo celular de muchos organismos a partir de la información codificada en sus genomas [Duarte *et al.*, 2007, Kumar *et al.*, 2007, Henry *et al.*, 2010, Latendresse *et al.*, 2012], lo cual, resulta muy útil para comprender las capacidades fenotípicas de estos organismos y caracterizar su metabolismo celular. En particular, el análisis de redes metabólicas se ha podido llevar a cabo por medio de modelos matemáticos. Existe un amplio uso de estos modelos para representar el metabolismo con balances de materia y que al simplificarse se tienen sistemas de ecuaciones representada por matrices estequiométricas que relacionan reacciones y metabolitos. Estos sistemas de ecuaciones matriciales se analizan mediante algoritmos que calculan balances de materia a través de las rutas metabólicas y que satisfacen condiciones termodinámicas. Dependiendo de las suposiciones que se hagan y de si se requieren datos experimentales, se han desarrollado diferentes técnicas para analizar las redes metabólicas, como el análisis de flujo metabólico (MFA, por sus siglas en inglés), el análisis de balance de flujo (FBA, por sus siglas en inglés) y el análisis de la vía metabólica (MPA, por sus siglas en inglés), incluidos los análisis de modos elementales y vías

## INTRODUCCIÓN

extremas [Stephanopoulos *et al.*, 1998, Lewis *et al.*, 2012].

Por lo anterior, nuestro proyecto persigue realizar una investigación que permita conocer las capacidades metabólicas de *L. gongylophorus*, a partir del análisis de producción de enzimas CAZymes (Carbohydrate-Active Enzymes; por sus siglas en inglés) y FOLymes (Fungal Oxidative Lignin Enzymes, por sus siglas en inglés) y glucógeno, así como, lograr una caracterización conjunta de su crecimiento en cultivo sumergido usando sustratos lignocelulósicos modelos, con la perspectiva de optimizar el uso y conocimiento de este hongo en futuras aplicaciones biotecnológicas y recuperar productos de alto valor.

## Capítulo II. ANTECEDENTES

### 2.1. Materiales lignocelulósicos.

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía y materias primas. El aprovechamiento de esta fuente no rivaliza con los productos alimenticios, ya que de esta fuente solo se emplean los residuos agrícolas, forestales y agro industriales [Ali *et al.*, 2012, Anwar *et al.*, 2014]. Los materiales lignocelulósicos contienen celulosa en combinación con hemicelulosa y lignina, donde la celulosa es el polisacárido predominante [Ali *et al.*, 2012].

En términos globales, la contribución actual de los materiales lignocelulósicos destinados como materia prima para la producción de energía es baja, sin embargo, se predice que en un futuro próximo aumente significativamente, como la búsqueda de generación de combustibles [Sims *et al.*, 2006, Yuan *et al.*, 2008, Tabatabaei *et al.*, 2019]. Existe en la naturaleza una amplia variedad de especies vegetales que pueden ser utilizadas como fuentes de bioenergéticos, sin embargo, no todas cumplen los requisitos (cultivos con balances equilibrados, en bajos costos de producción, bajos requerimientos de nutrientes, resistentes a la sequía y plagas, así como con una buena capacidad de adaptación a la manipulación) para ser una materia prima sustentable [Heaton *et al.*, 2004]. Por otra parte, la realidad en muchos casos es que algunos cultivos utilizados para la generación de energía son los mismos que se utilizan para la generación de alimentos, por lo tanto, se pueden crear problemas económicos que afectan directamente a la industria de alimentos y a la sociedad, teniéndose que aumentar la producción de los cultivos [McKendry, 2002].

El maíz es un cultivo de alto rendimiento, tiene un desarrollo óptimo en distintas condiciones ambientales y de suelo [Birch *et al.*, 2003]. En comparación con otros cultivos o residuos potenciales, la producción de etanol a partir de granos de maíz es la



## Capítulo II. ANTECEDENTES

opción más avanzada en estudio y tecnología, sin embargo, la mayor producción en la actualidad es en las economías más desarrolladas [Yuan *et al.*, 2008]. El sorgo es otro cultivo que tiene un rápido crecimiento en zonas tropicales, y es resistente a la sequía, ya que sus necesidades de agua son bajas, en comparación con el maíz. Sin embargo; se han desarrollado distintos híbridos de sorgo a través de los años para la producción de materia lignocelulósica con alto contenido de almidón y diferentes azúcares para el propósito de obtener energía [Prasad *et al.*, 2007]. Entre otros cultivos se encuentra el cáñamo que podría asumir un papel importante para la búsqueda de una materia prima más económica y su mayor contenido de celulosa (60 %) para poder competir con el maíz o el sorgo [Zhou *et al.*, 2013]. Sin embargo, este último tiene la limitación que surge de lo expuesto en la Ley Agrícola de 2014, donde el Congreso de EE. UU definió el cáñamo industrial en función del nivel de 9-tetrahidrocannabinol (THC) (menos del 0,3 % de THC en peso seco) y permitió su programa piloto agrícola por parte de la institución de investigación y el departamento de agricultura si las leyes estatales lo permiten. También se han modificado cultivos, para mejorar sus rendimientos en la producción de combustibles [Phitsuwan *et al.*, 2013].

Sin embargo, como se había mencionado anteriormente estos vegetales también son utilizados como fuente de alimento, por lo cual existe cierta preocupación en términos de sustentabilidad. De ahí que la investigación enfocada a la producción de biocombustibles de segunda y tercera generación considere utilizar materiales lignocelulósicos, tales como tallos y partes que no tengan una aplicación en la producción de alimentos, así como residuos de la industria azucarera y maderera.

### 2.2. Estructura y propiedades químicas de los materiales lignocelulósicos.

El componente principal de los materiales lignocelulósicos es la celulosa, seguida de la hemicelulosa y la lignina. La celulosa y la hemicelulosa son macromoléculas construidas a partir de diferentes azúcares; mientras que la lignina es un polímero formado de compuestos aromáticos sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides. La composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas (Tabla 2.1), incluso entre la edad y la etapa de crecimiento [Kikas *et al.*, 2016].

## Capítulo II. ANTECEDENTES

**Tabla 2.1:** Porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina en diversos materiales.

<b>Materiales Lignocelulósicos</b>	<b>Celulosa</b>	<b>Hemicelulosa</b>	<b>Lignina</b>	<b>Referencias</b>
<b>Pasto</b>	47.8 25	13.3 35.7	19.4 6.4	Li <i>et al.</i> (2009) Howard <i>et al.</i> (2003)
<b>Madera Dura</b>	40-55	24-40	18-25	Sun <i>et al.</i> (2002)
<b>Madera Suave</b>	45-50	25-35	25-35	Sun <i>et al.</i> (2002)
<b>Cáscara de frutos secos</b>	25-30	25-30	30-40	Sun <i>et al.</i> (2002)
<b>Papel</b>	85-99	0	0-15	Sun <i>et al.</i> (2002)
<b>Desechos de pulpa de papel</b>	60-70	10-20	5-10	Sun <i>et al.</i> (2002)
<b>Estiércol de ganado</b>	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7	Sun <i>et al.</i> (2002)
<b>Mazorca de maíz</b>	45	35	15	Howard <i>et al.</i> (2003)
<b>Semillas y hebras de algodón</b>	80-95	5-10	0	Howard <i>et al.</i> (2003)
<b>Hojas de residuos y desechos agrícolas comunes</b>	15-20 31	80-85 22	0 18	Howard <i>et al.</i> (2003) Merino y Cherry (2007)
<b>Pasto varilla (<i>Panicum virgatum</i>)</b>	45	31.4	12	Howard <i>et al.</i> (2003)
<b>Rastrojo de maíz</b>	41.7	20.5	18	Merino y Cherry (2007)
<b>Paja de trigo</b>	30 43	50 25	15 24	Merino y Cherry (2007)
<b>Bagazo de caña</b>	33.4	30	18.9	Howard <i>et al.</i> (2003)

### 2.2.1. Celulosa.

La celulosa es el componente más abundante de la biomasa vegetal en nuestro planeta. En los ambientes terrestres, es el producto primario de la fotosíntesis y el bio-recurso renovable más abundante (100 mil millones de toneladas secas/año) producido en la biosfera. Aunque es producido por algunos animales y pocas bacterias, se encuentra exclusivamente en todas las paredes celulares de las plantas. La celulosa no se encuentra

## Capítulo II. ANTECEDENTES

en estado puro, en la mayoría de los casos está asociada a hemicelulosa y lignina [Paudel *et al.*, 2017]. Comprende aproximadamente del 35 al 50 % del peso seco de la planta, mientras que las hemicelulosas y la lignina comprenden del 20 al 35 % y del 5 al 30 % del peso seco de la planta, respectivamente [Behera *et al.*, 2017].

La celulosa es un homopolímero lineal con fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$  compuesto por unidades de *D*-anhidroglucopiranosas, comúnmente llamadas unidades de glucosa. Las unidades de glucosa se unen mediante enlaces  $\beta$ -(1-4)-glicosídicos para formar un dímero conocido como celobiosa que es la unidad fundamental de la celulosa [Figueiredo *et al.*, 2010]. Las unidades *D*-glucosa se combinan mediante enlaces covalentes entre el grupo OH ecuatorial del carbono cuatro C-4 de una unidad de glucosa y el átomo de carbono C-1 de la siguiente unidad de glucosa para formar celulosa y se pueden caracterizar por sus propiedades como biodegradabilidad, hidrofobicidad, quiralidad y amplia capacidad de modificación química [Ioelovich, 2008, Huber *et al.*, 2012]. La celulosa contiene una gran cantidad de átomos polares de oxígeno e hidrógeno, que participan en la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares entre la misma cadena de celulosa y proporciona rigidez a las cadenas del polímero [Badger *et al.*, 2002].

### 2.2.2. Hemicelulosa.

La hemicelulosa es una clase heterogénea de polímeros que representan, del 15 al 35 % de la biomasa vegetal y que contienen pentosas ( $\beta$ -D-xilosa,  $\alpha$ -L-arabinosa), hexosas ( $\beta$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D-galactosa) y / o ácidos urónicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucurónico,  $\alpha$ -D-4-O metilgalacturónico y  $\alpha$ -D-galacturónico). También pueden estar presentes en pequeñas cantidades otros azúcares tales como  $\alpha$ -L-ramnosa y  $\alpha$ -L-fucosa y los grupos hidroxilo de los azúcares pueden estar parcialmente sustituidos con grupos acetilo [Scheller, 2010]. El xilano es el principal componente de la hemicelulosa de las paredes celulares secundarias y constituyen el 20-30 % de las plantas herbáceas y está compuesto por una cadena lineal de residuos de xilosa y diversas ramificaciones y sustituciones. Esta cadena consta de 30 a 100 unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosas con enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos y pueden presentar en su estructura arabinosa, glucosa, galactosa y

## Capítulo II. ANTECEDENTES

glucuronato en las ramas laterales unidas al carbono 3 C3 de la xilosa [Hansen and Plackett, 2008]. En algunos tejidos de gramíneas y cereales, el xilano puede representar hasta el 50 % y suelen estar disponibles en grandes cantidades como subproductos de los bosques, la agricultura, las agroindustrias, la madera y las industrias de pulpa y papel. Las hemicelulosas de tipo manano como los glucanos y los galactoglucanos son los principales componentes hemicelulósicos de la pared secundaria de las maderas blandas, mientras que en las maderas duras se producen en cantidades menores [Ebringerova, 2005]. La hemicelulosa tiene un grado de polimerización aproximado de 200 unidades, que es mucho menor que en la celulosa. Es la menos ordenada, es decir, la mayor parte es amorfa, a diferencia de la celulosa que tiene secciones cristalinas, y por consecuencia es más fácil hidrolizar la hemicelulosa a monómeros por medio de una hidrólisis ácida, alcalina o enzimática. La hidrólisis ácida de la hemicelulosa produce compuestos inhibidores de la fermentación, tales como furfural, hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos, ácido acético conocidos como inhibidores en los procesos de fermentación [Girio *et al.*, 2010].

### 2.2.3. Lignina.

La lignina es un polímero amorfo altamente ramificado presente en las plantas vasculares y representa hasta el 30 % del peso seco de la biomasa vegetal [Bugg *et al.*, 2011]. El polímero de lignina está compuesto por unidades de fenilpropano y se compone de tres tipos de monolignol que polimerizan para formar el polímero de lignina: alcohol de coniferilo con un grupo aril-OCH<sub>3</sub> (conocido como guaiacilo), alcohol sinapílico con dos grupos aril-OCH<sub>3</sub> (siringilo) y alcohol p-cumarílico sin grupos OCH<sub>3</sub> (p-hidroxifenilo) [Pérez *et al.*, 2002]. Estas unidades de fenilpropano están unidas por enlaces de  $\beta$ -aril éter, di-aril propano, bifenilo, diaril éter, fenilcumarano, espirodienona y pinosinol [Pu *et al.*, 2007]. La composición de este polímero difiere entre plantas con respecto a los tipos y cantidades de monolignol presentes, por ejemplo, la lignina de madera blanda se compone predominantemente de alcoholes de coniferilo en un (80 %), mientras que las maderas duras son 56 % de alcoholes de coniferilo y 40 % de alcoholes de sinapilo. La lignina de pasto por otro lado contiene más alcohol p-cumarílico que las maderas blandas

## Capítulo II. ANTECEDENTES

y duras (hasta un 10 %) y cantidades iguales de alcoholes de coniferilo y sinapilo [Ragauskas, 2018].

### 2.2.4. Pectina.

La pectina es una familia de polisacáridos complejos que están presentes en la pared celular vegetal primaria de las dicotiledóneas y se consideran compuestos ricos en residuos de ácido  $\alpha$ -1,4-D galacturónico. El ácido galacturónico comprende aproximadamente el 70 % de pectina y todos los polisacáridos pécticos contienen ácido galacturónico unido en la posición O-1 y O-4 [Voragen *et al.*, 2009]. Se pueden distinguir diferentes dominios de pectina, que son: homogalacturonano, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, xilogalacturonano, apiogalacturonano, arabinanos, galactano, arabinogalactano I y arabinogalactano I. El dominio más abundante en la macromolécula de pectina es el homogalacturonano, que representa aproximadamente el 60 % de todas las pectinas en las paredes celulares. La molécula de homogalacturonano consiste en una cadena lineal de unidades de ácido-1,4-D-galacturónico en la que algunos de los grupos carboxilo están esterificados con metanol y/o grupos acetilo están presentes en O-2 y/u O-3 [Thibault *et al.*, 1993]. En los casos de la manzana, los cítricos y la remolacha azucarera, la columna vertebral de los homogalacturonano está compuesta por al menos 72-100 residuos de ácido D-galacturónico. El grado de metilación, expresado como la relación entre los grupos carboxilo esterificados con metilo y la cantidad total de unidades de ácido galacturónico, es uno de los parámetros clave relacionados con la capacidad de gelificación [Filippov and Kohn, 1975].

El dominio ramnogalacturonano I consta de residuos repetidos de ácido  $\alpha$ -1,4-galacturónico y  $\alpha$ -1,2-L-ramnosa. La longitud de la columna vertebral del ramnogalacturonano I es de aproximadamente 100 a 300 unidades repetidas [Talmadge *et al.*, 1973]. En el carbono C-4 de los residuos de ramnosa se unen cadenas laterales que contienen residuos de galactosa y/o arabinosa. Las cadenas laterales están compuestas por un solo residuo de azúcar o cadenas combinadas de arabinos, galactanos o arabinogalactanos [Talmadge *et al.*, 1973, Nguemazong *et al.*, 2012]. La proporción de unidades ramificadas es del 20 al 80 % y depende del origen de los

## Capítulo II. ANTECEDENTES

polisacáridos [Seymour *et al.*, 2002]. Se supone que el homogalacturonano y el ramnogalacturonano I están unidos covalentemente y que no se pueden separar sin una escisión de la cadena a partir de la acción de enzimas como la endopoligalacturonasa [Coenen *et al.*, 2007]. El ramnogalacturonano II está compuesto por una columna vertebral que consta de 7-9 residuos de ácido galacturónico ramificados con 4 cadenas laterales (en C-2 y C-3) que pueden incluir arabinosa, apiosa, fucosa, galactosa, ramnosa, ácido acérico, ácido glucurónico, ácido galacturónico, 2-O-metil-xilosa, 2-O-metil-fucosa, ácido 3-desoxi-lixo-2-heptulosárico y ácido 3-desoxi-mano-2-octulosónico [Schols, 1995].

El xilogalacturonano es un polímero que contiene un esqueleto de homogalacturonano con residuos de xilosa unidos al O-3 de algunas unidades de ácido galacturónico [Schols *et al.*, 1995]. Los arabinanos consisten en cadenas de unidades de arabinofuranosilo con residuos de  $\alpha$ -arabinofuranosilo unidos en C-2 o C-3 de la molécula de arabinosa [Whitaker, 1984]. El arabinogalactano I está compuesto por un esqueleto de residuos de  $\alpha$ -1,4-D galactopiranosilo con cadenas cortas unidas de residuos de arabinosa en el carbono C-3 de la molécula de galactosa. El arabinogalactano II contiene de manera similar cadenas de unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosilo, pero se producen enlaces glicosídicos en los carbonos C-1, C-3 y C-6 de las moléculas de galactosa [Leivas *et al.*, 2016]. Los arabinogalactanos I y II pueden ser cadenas laterales de ramnogalacturonano I [Seymour *et al.*, 2002].

### 2.3. Degradación biológica de materiales lignocelulósicos.

La biodegradación del material lignocelulósico ha sido reconocida como un tema de investigación importante durante muchos años [Hatakka, 1994, Singh and Chen, 2008]. Sus ventajas son su bajo requerimiento energético, menor costo y menor contaminación del medio ambiente en comparación con tratamientos mecánicos, químicos, térmicos y termoquímicos [Dai *et al.*, 2015, Sindhu *et al.*, 2016]. Sin embargo, la mayoría de los pretratamientos biológicos no se utilizan por varias razones, incluida la velocidad del proceso [Gu *et al.*, 2012]. En este sentido se ha intentado la obtención de enzimas con actividad sobre estos compuestos de la pared celular vegetal para acelerar este proceso

## Capítulo II. ANTECEDENTES

[Bilal *et al.*, 2017]. El pretratamiento biológico se puede entonces realizar utilizando la actividad de microorganismos, como hongos o bacterias que producen gran cantidad de estas enzimas como parte de su crecimiento en este tipo de sustratos [Zheng *et al.*, 2014].

### 2.3.1. Hongos degradadores de la lignocelulosa.

Existen tres clases de hongos que degradan los materiales lignocelulósicos en la madera, los cuales se clasifican de acuerdo con el color que toman las colonias y al tipo de material que degradan, entre los cuales se encuentran los hongos de podredumbre: blanca, marrón y blanda. [Bugg *et al.*, 2011].

Hongos de podredumbre blanca. Esta clase de descomposición es realizada por hongos que degradan celulosa, hemicelulosa, y lignina. Los basidiomicetos de pudrición blanca son los organismos que degradan la madera con mayor frecuencia, lo que a menudo da lugar a un material blanco enriquecido con celulosa. Son considerados eficientes degradadores de lignina, ya que pueden mineralizar completamente la lignina en dióxido de carbono y agua [Gao *et al.*, 2010]. Los hongos de pudrición blanca producen varios tipos de enzimas oxidativas extracelulares (oxidorreductasas) que participan en la degradación del contenido de lignina en la pared celular de una planta. Estos incluyen lacasas y peroxidasas ligninolíticas de alto potencial redox (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasas versátil). La lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa se descubrieron a mediados de la década de los 80's en el basidiomiceto de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* [Macarena *et al.*, 2005]. La lignina peroxidasa degrada unidades de lignina no fenólica (hasta el 90 % del polímero), mientras que manganeso peroxidasa genera  $Mn^{3+}$ , que actúa como un oxidante difusible en unidades de lignina fenólica o no fenólica a través de reacciones de peroxidación lipídica. Más recientemente, la peroxidasa versátil se ha descrito en *Pleurotus* y otros hongos como un tercer tipo de peroxidasa ligninolítica que combina las propiedades catalíticas de las lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y peroxidasas vegetales / microbianas [Martínez *et al.*, 2005]. *P. chrysosporium* posee más

## Capítulo II. ANTECEDENTES

de una docena de genes de peroxidasa diferentes, y es el basidiomiceto de pudrición blanca más investigado.

Hongos de podredumbre marrón. Los hongos de pudrición marrón constituyen un grupo fisiológico de basidiomicetos que degradan la madera y representan menos del 10 % de la diversidad taxonómica de los basidiomicetos que degradan la lignocelulosa. Tienen la capacidad de degradar los polisacáridos de la madera después de solo una modificación parcial de la lignina, lo que da como resultado un material marrón que consiste en lignina oxidada, y que representa una fuente potencial de compuestos aromáticos para la fracción de materia orgánica estable en los suelos forestales [Singh, 2014]. La lignina se degrada en menor extensión por hongos de pudrición marrón, a través de un mecanismo diferente al de los hongos de pudrición blanca. La descomposición de la madera en la pudrición marrón es impulsada a través de la modificación de la estructura de la lignina por desmetilación y oxidación, la degradación y la utilización de la hemicelulosa y la celulosa dejan modificada la lignina. El micelio (estructura que está compuesta por hifas) de los hongos de la pudrición marrón inicia la transformación del sustrato en la capa de madera que contiene a las células con mayor proporción de lignina. Entre los hongos de podredumbre parda más estudiados se encuentra *Gloeophyllum trabeum* y *Serpula lacrymans* que resulta ser el hongo de pudrición parda más destructivo, pudiendo degradar la celulosa y la hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas mediante la modificación de la estructura de la lignina por desmetilación y degradación oxidativa mediante el mecanismo de reacción de Fenton debido a la presencia de ácido oxálico y radicales hidroxilos [Hofrichter, 2001, Watkinson, 2012].

Hongos de podredumbre blanda. Ciertos hongos pertenecientes a la división *Ascomycota* pueden provocar una pudrición suave sobre la madera. Estos hongos están muy extendidos en la naturaleza y causan el deterioro de la madera en ambientes acuáticos y terrestres. Los hongos de pudrición blanda pueden tolerar una amplia gama de condiciones de temperatura, humedad y pH, atacando una gran variedad de sustratos de madera. Se comportan de forma activa en condiciones que no favorecen la actividad de los hongos de pudrición blanca y marrón [Goodell *et al.*, 2008]. La podredumbre



## Capítulo II. ANTECEDENTES

blanda ocurre cuando la madera tiene un alto contenido de humedad, pero no está saturada. Los hongos de pudrición blanda muestran preferencia por la celulosa y la hemicelulosa, pero no parecen degradar la lignina. Estos hongos se pueden distinguir de otros por los patrones de descomposición que producen en la madera [Blanchette *et al.*, 2004]. Algunos hongos de pudrición blanda producen cavidades dentro de las paredes secundarias de las células de la madera siguiendo la orientación microfibrilar de la celulosa que cambia en diferentes capas de las paredes celulares (ataque de tipo I), mientras que otros pueden erosionar la pared secundaria por completo (ataque de tipo II) dejando una superficie relativamente intacta [Hamed, 2013].

### 2.4. Mutualismo entre *Atta mexicana* y *Leucoagaricus gongylophorus*.

Las hormigas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, son reconocidas por formar largas filas de individuos que transportan sobre el suelo, pequeños pedazos de hojas, ramas, flores o pastos hacia el jardín del hongo, lugar en donde las hormigas tienen su colonia y cultivan a *L. gongylophorus*. Estas hormigas se encuentran distribuidas en la región neotropical entre 33°N y 44°S, en varios tipos de ecosistemas, como son desiertos, humedales, sabanas subtropicales y bosques tropicales [Brener and Ruggiero, 1994]. Desde otro punto de vista, el desarrollo que han alcanzado las colonias de hormigas del género *Atta* les permite ser comparadas con un mamífero herbívoro, en términos de biomasa colectada, por su tiempo de vida y el material consumido. Al año, las hormigas de un nido pueden cortar, cargar y procesar entre 22 y 940 kg de material vegetal en forma de millones de pedacitos de hojas y flores [Coblentz and Van Bael, 2013]. Esta cantidad puede representar 2.5 % de la vegetación a nivel de paisaje, del 12.5-15 % a nivel del área de forrajeo de un nido, o una reducción de 18 % en la cobertura arbórea [Urbas *et al.*, 2007, Leal *et al.*, 2014]. Por ello han sido descritas como los herbívoros dominantes del Neotrópico, teniendo en cuenta además el gran tamaño de las colonias que se pueden encontrar [Schultz, 2008].

En México habitan las especies, *A. mexicana*, *A. cephalotes* y *A. texana*, siendo las dos últimas menos abundantes. *A. mexicana* se distribuye a lo largo de todo el país, mientras que las otras dos especies tienen áreas de distribución más restringidas, *A.*

## Capítulo II. ANTECEDENTES

*cephalotes* se encuentra en los estados del sureste mientras que *A. texana* habita en el noreste de México llegando hasta el sur de Estados Unidos [Ríos-Casanova, 2014]. Sin embargo, en México las hormigas cortadoras de hojas han sido poco estudiadas en el ciclo que llevan en conjunto con *L. gongylophorus*, a pesar de ser un grupo con gran diversidad taxonómica y funcional, además de tener repercusiones importantes en los ecosistemas al modificar la estructura y dinámica de los suelos [Zavala-Hurtado *et al.*, 2000, Ríos-Casanova *et al.*, 2006].

El material que coleccionan las hormigas cortadoras de hojas es utilizado para cultivar a *L. gongylophorus*, un hongo con el cual han establecido una relación mutualista. Esta relación consiste en que el hongo provee las enzimas necesarias para degradar a los polímeros vegetales y de esta forma liberar azúcares, de los cuales una fracción es utilizada por el mismo hongo para satisfacer sus requerimientos energéticos, y otra fracción es acumulada en forma de glucógeno dentro de unas estructuras globulares llamados gonglidios. Las hormigas de la colonia se alimentan principalmente de gonglidios, los cuales son una fuente de glucógeno y proteínas. Estas estructuras se encuentran en forma de racimo en las puntas de las hifas del hongo, y hasta el momento no son conocidas en ningún otro hongo, por lo cual se cree que son producidas exclusivamente para el beneficio de las hormigas siendo fundamental en esta relación [Dos Santos *et al.*, 2013]. Las hormigas proporcionan el sustrato, y ayudan a dispersar las enzimas hidrolíticas producidas por el hongo y que fueron ingeridas por las hormigas, además controlan la proliferación de otros microorganismos que es llevada a cabo con ayuda de actinomicetos, que producen antibióticos [Barke *et al.*, 2010]. Schiott *et al.*, (2010) confirmaron que algunas hidrolasas pueden pasar por el intestino de las hormigas sin descomponerse químicamente, encontrando varias pectinasas, que solo se localizan cuando las hormigas tienen acceso al jardín del hongo, además los genes que codifican estas enzimas se encuentran sobreexpresados en los gonglidios, la identificación de estas enzimas se llevó a cabo por medio de dos técnicas: espectrofotometría de masas de desorción-ionización con láser asistida por una matriz por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Schiott *et al.*, 2010]. Aunque se han

## Capítulo II. ANTECEDENTES

encontrado otros microorganismos en los nidos, *L. gongylophorus* es el que se encuentra en mayor proporción, y es donde se han concentrado las investigaciones.

Este importante mutualismo es benéfico tanto para *L. gongylophorus* como para la hormiga que lo cultiva. Respecto con su forma de vida libre el principal beneficio del hongo es su prevalencia en el ecosistema, ya que al momento de fundar un nuevo hormiguero la reina recién fecundada lleva consigo al hongo, lo cual permite una transferencia de la cepa, así como una dispersión geográfica de ésta. Igualmente, para las hormigas la transferencia del hongo les confiere grandes beneficios, al conservar una cepa ya seleccionada [Miyashira *et al.*, 2010]. Sin embargo, el hongo cultivado puede ser infectado por otros hongos, por ejemplo, el hongo *Escovopsis*, el cual se encuentra frecuentemente en el jardín de *L. gongylophorus*, este micopatógeno causa infecciones que a largo plazo pueden conducir a la muerte de la colonia. Es común observar que las colonias infectadas con *Escovopsis* presentan una menor cantidad de jardín de hongo y de hormigas [Santos *et al.*, 2004]. También se ha reportado el aislamiento de levaduras del género *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Rhodotorula sp.* y *Trichosporon sp.* en las colonias de hormigas *A. sexdens* de laboratorio [Middelhoven *et al.*, 2003].

### 2.5. Capacidad metabólica de *Leucoagaricus gongylophorus*.

De Siqueira *et al.* (1998) muestran que *L. gongylophorus* presenta actividad celulasa, xilanasa, pectinasa,  $\alpha$ -amilasa y maltasa [Gomes De Siqueira *et al.*, 1998]. Bacci *et al.* (2013) reportaron las secuencias de nucleótidos y/o proteínas que codifican para celulasas, xilanasas, lacasas, endogalactanasa, pectinesterasa, rhamnogalacturonan acetilesterasa y arabinofuranosidasa [Bacci Jr *et al.*, 2013]. Aylward *et al.* (2013) reportaron el primer borrador del genoma de *L. gongylophorus*, simbionte de *A. cephalotes* originaria de Panamá. Usando herramientas de genómica y metaproteómica encontraron 145 lignocelulasas, incluyendo celulasas, lacasas, pectinasas, xilanasas y amilasas; siendo dos lacasas, una aril-alcohol oxidasa y una glioxal oxidasa las encontradas en mayor cantidad. También mencionan la forma de cómo avanza la degradación del material vegetal [Aylward *et al.*, 2013]. Todo esto muestra el interés por

## Capítulo II. ANTECEDENTES

*L. gongylophorus* como fuente de enzimas lignocelulolíticas, con potencial uso en la producción de biocombustibles entre otras aplicaciones biotecnológicas.

### 2.5.1. Enzimas con actividad lignocelulósica.

La familia de enzimas con actividad sobre carbohidratos complejos se conoce como CAZymes, las cuales, están involucradas en la biosíntesis, catabolismo y transporte de carbohidratos provenientes de polisacáridos, entre las que se encuentran celulasas, xilanasas, amilasas, pectinasas, glucosidasas, xilosidasas y ramnosidasas. Sin embargo, en varios estudios se ha demostrado que los complejos lignocelulolíticos producidos por hongos filamentosos depende en gran medida de la adsorción de las enzimas a los materiales lignocelulósicos en el proceso de hidrólisis enzimática [Kiiskinen *et al.*, 2004]. En el caso de *L. gongylophorus* dicha adsorción de las enzimas se ve facilitada por las hormigas cortadoras de hojas, dado que, estas se encargan de proporcionar al nido del hongo un material vegetal pretratado al defecar sobre las hojas [Cornejo *et al.*, 2019].

### 2.5.2. Celulasas.

La hidrólisis de celulosa por microorganismos requiere la producción de celulasas extracelulares libres o asociadas a células. Se requieren al menos tres tipos principales de enzimas para hidrolizar la celulosa: endoglucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucano-4 glucanohidrolasa (EC.3.2.1.4); exoglucanasas (EC.3.2.1.91), que incluye 1,4- $\beta$ -D-glucano glucanohidrolasa (también conocida como celodextrinasa) y 1,4- $\beta$ -D-glucano celobiohidrolasa (celobiohidrolasa); y  $\beta$ -glucosidasa (EC. 3.2.1.21) o  $\beta$ -glucósido glucohidrolasa [Payne *et al.*, 2015]. La endoglucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de regiones amorfas internas en celulosa para producir oligosacáridos de varios grados de polimerización y generar nuevos extremos de cadena. Las exoglucanasas hidrolizan la celulosa de manera progresiva a partir de los extremos reductores o no reductores de las cadenas de celulosa para generar glucosa o celobiosa como productos principales. Las exoglucanasas también pueden hidrolizar la celulosa microcristalina despegando las cadenas de celulosa de la estructura microcristalina. La  $\beta$ -glucosidasa escinde las celodextrinas solubles y la celobiosa en glucosa. La

## Capítulo II. ANTECEDENTES

combinación correcta de las actividades y el nivel de producción de cada enzima celulasa es fundamental para la utilización eficiente de la biomasa lignocelulósica [Chandel *et al.*, 2012].

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* han recibido una atención intensiva debido a su alta eficiencia de producción de celulasas secretadas. En particular, el sistema de celulasa de *Trichoderma reesei* ha sido objeto de investigación durante más de 50 años. El alto nivel de producción de mezclas complejas de celulasas producidas por especies de *Trichoderma*, que a menudo exceden los 100 g/L, es el estándar actual para la producción de celulasa comercializada [Cherry and Fidantsef, 2003]. *T. reesei* produce al menos dos exoglucanasas (CBHI y CBHII), cinco endoglucanasas (EGI, EGII, EGIII, EGIV y EGV) y dos  $\beta$ -glucosidasas (BGLI y BGLII) [Zhang, 2004]. La actividad celulasa de *T. reesei* se atribuye predominantemente a CBHI, CBHII y EGII [Nidetzky, 1994]. Aunque *T. reesei* secreta BGL, el nivel de producción de esta enzima es significativamente más bajo que el encontrado en otros hongos, como la especie *Aspergillus sp.*. Los niveles de expresión del gen BGL de *T. reesei* son presumiblemente suficientes para permitir el crecimiento celular en celulosa, pero no para permitir el uso industrial de BGL como reactivo de celulasa. Además, el BGL de *T. reesei* muestra inhibición por producto (glucosa), mientras que los de las especies de *Aspergillus* son más tolerantes a la glucosa [Van Zyl *et al.*, 2007].

### 2.5.3. Hemicelulasas.

En comparación con la celulosa, la estructura del xilano es extremadamente variable y depende de su origen, debido a esto, y su complejidad, la hidrólisis completa del xilano requiere una gran variedad de enzimas actuando cooperativamente. Varios microorganismos siguen diferentes estrategias para degradar la pared celular. Estas estrategias para los patógenos vegetales y los hongos filamentosos como *Cochliobolus carbonum*, *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.* vinculan la secreción de todas las hemicelulasas al mismo tiempo [Shallom, 2003]. La enzima endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas (EC 3,2,1,8) es la iniciadora de la ruptura del xilano llevando a cabo la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 en el esqueleto del xilano, produciendo xilooligómeros cortos. La mayoría de las

## Capítulo II. ANTECEDENTES

xilanasas conocidas pertenecen a las familias de las glicosil hidrolasas (GH) 10 y 11 (se conocen más de 300 secuencias de genes), y alrededor de 20 genes más de xilanasas se distribuyen entre las familias 5, 8 y 43. Las  $\beta$ -D-xilosidasas (EC 3,2,1,37) son glicosidasas de tipo exo que hidrolizan xilooligómeros cortos en unidades simples de xilosa a partir de xilooligosacáridos y xilobiosa y se encuentran en las familias (GH) 3, 39, 43, 52 y 54, mientras que para la remoción de algunos otros grupos es catalizado por  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3,2,1,55),  $\alpha$ -D-glucuronidasas (EC 3,2,1,139), acetil xilano esterasas (EC 3,1,1,72), y ácido ferúlico esterasas o cinamil esterasas (EC 3,1,1,73) [Jorgensen *et al.*, 2005].

Existen varias aplicaciones para las hemicelulasas en procesos industriales [Beg *et al.*, 2001, Subramaniyan, 2002]. La aplicación más desafiante es el desarrollo de un proceso económico que posibilite la solubilización de material lignocelulósico y de esta manera pueda ser utilizada como energía renovable y fuente de carbono [Mielenz, 2001, Galbe and Zacchi, 2002]. Las hemicelulasas se utilizan habitualmente para la mejora de la alimentación animal, en la industria de la pulpa y el papel para el bioblanqueo y la biopulpación [Suurnakki *et al.*, 1997], y para el procesamiento de harina en la industria de la panadería [Figueroa-Espinoza *et al.*, 2002].

### 2.5.4. Pectinasas.

La degradación de pectina es uno de los procesos más importantes para las plantas, ya que desempeña un papel en el alargamiento y crecimiento celular, así como en la maduración del fruto. Las pectinasas están muy extendidas en la naturaleza y son producidas por bacterias, hongos, levaduras, insectos, nemátodos y protozoos. La degradación microbiana de este polímero es importante en la patogenia de las plantas, la simbiosis y la descomposición de los depósitos de las plantas [Lang, 2000]; por lo tanto, al descomponer la pectina con fines nutricionales, las pectinasas microbianas desempeñan un papel muy importante en la naturaleza. Las enzimas son inducibles, es decir, se producen solo cuando es necesario y contribuyen al ciclo natural del carbono [Sakai *et al.*, 1993].

## Capítulo II. ANTECEDENTES

Las pectinasas se clasifican en base al mecanismo utilizado para atacar la columna vertebral del galacturonano dividiéndose en polisacárido hidrolasas, polisacáridos lisas y carbohidratos esterasas. Estos incluyen endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.1.5), exopoligalacturonasas (EC 3.2.1.67), pectato liasas (EC 4.2.2.2), pectina liasas (EC 4.2.2.10) y pectina metil esterasas (EC 3.1.11). La endopoligalacturonasa cataliza la hidrólisis aleatoria del enlace glicosídico  $\alpha$ -1,4 entre dos residuos de ácido no metilado. Estas enzimas son producidas por bacterias, hongos, levaduras y pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasa [Saad *et al.*, 2007]. Las pectina liasas degradan el polímero de pectina mediante un mecanismo de  $\beta$  eliminación para formar oligogalacturónidos insaturados [Yadav *et al.*, 2009]. Las pectina metil esterasas catalizan la esterificación de la pectina, que es ácido poligalacturónico metilado, lo que da como resultado la formación de pectina desesterificada que libera iones de hidrógeno y metanol [Laratta *et al.*, 2008]. Las pectina liasas catalizan la escisión del polímero de ácido galacturónico [Jayani *et al.*, 2005].

### 2.5.5. Síntesis de glucógeno.

Los carbohidratos de almacenamiento más comunes en hongos son el glucógeno, el glicerol, el manitol, el eritritol, el arabitol y la trehalosa [Blumenthal, 1976]. En levaduras y hongos, el glucógeno es un polímero de glucosa unido por enlaces  $\alpha$  1-4 con ramificaciones unidas por enlaces  $\alpha$  1-6, el uso del glucógeno puede tener un doble propósito: primero, como polímero de reserva de carbono y fuente de energía durante las condiciones de inanición [Meyenburg, 1969], y segundo como regulador de procesos metabólicos a través de su biosíntesis y degradación [Cameron *et al.*, 1988]. En las células eucariotas, la biosíntesis de glucógeno es iniciada por la glucogenina (Gnn), una proteína autoglicosilante que convierte la UDP-glucosa en un oligosacárido corto unido covalentemente a un residuo de tirosina de esta proteína iniciadora. Una vez que las cadenas se han extendido a 6-10 residuos de glucosa, actúan como un cebador requerido por la glucógeno sintasa (Gls) para unir moléculas de glucosa adicionales y alargarlas. Esta enzima alarga las cadenas de glucosa existentes transfiriendo un nuevo residuo de glucosa al extremo reductor libre de la cadena, siendo Gls la enzima limitante de la velocidad [Mu *et al.*, 1997].

## Capítulo II. ANTECEDENTES

La enzima está regulada negativamente por fosforilación, mediante la cual la forma fosforilada se activa a través del efector alostérico glucosa-6-P (Noventa-Jordao *et al.*, 1996). Las cadenas alargadas de glucógeno pueden tener ramificaciones que favorezcan la solubilidad de este polímero; los extremos quedan disponibles para el ataque enzimático y proporciona una rápida liberación de glucosa cuando es necesario, y una rápida resíntesis de glucógeno para el almacenamiento de la glucosa disponible. La enzima ramificadora (Gbe) forma cadenas de glucosa ramificadas transfiriendo oligómeros de alrededor de siete residuos de glucosa de una cadena a otro residuo de glucosa en una cadena diferente. La unión del oligómero está en la posición 6 de la glucosa receptora, formando así un enlace 1,6. El nivel de glucógeno en una condición dada es el resultado del equilibrio entre la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa, lo que da como resultado la biosíntesis o el catabolismo, respectivamente, de este carbohidrato de reserva, con ambas enzimas reguladas por fosforilación.

Debido a la disponibilidad de nueva información que incluye un mayor número de secuencias de genomas y de proteínas, se ha incrementado la información metabólica de varios microorganismos en las bases de datos de los últimos años. Sin embargo, la mayoría de los estudios relacionados con el glucógeno se han centrado en proteínas de mamíferos y levaduras, en comparación con otros microorganismos. No obstante, existen investigaciones que se han enfocado en el comportamiento de este polímero en hongos filamentosos, aunque en menor cuantía. Por ejemplo, un estudio que implicaba el aislamiento de 43 mutantes afectados en el metabolismo del glucógeno definió 8 genes metabólicos funcionales específicos del glucógeno en *S. cerevisiae* [Cannon *et al.*, 1994]. Si bien la alteración de cualquiera de los genes no tuvo ningún efecto sobre la acumulación de glucógeno, la eliminación simultánea eliminó la biosíntesis de glucógeno [Cheng *et al.*, 1995]. Se obtuvieron resultados similares tras la eliminación de *gnn* en *Neurospora crassa* [de Paula *et al.*, 2005]. En otro estudio realizado utilizando el patógeno del arroz *Magnaporthe oryzae*, los mutantes que carecen de los genes involucrados en el catabolismo del glucógeno, la glucógeno fosforilasa y la amiloglucosidasa, se ven alterados en la movilización de las reservas de glucógeno durante el desarrollo del apresorio, lo que lleva a una reducción significativa de la



## Capítulo II. ANTECEDENTES

capacidad de desarrollar la enfermedad del añublo del arroz. Por el contrario, la biosíntesis de glucógeno, catalizada por la glucógeno sintasa, es prescindible para la virulencia/patogenicidad ya que los mutantes de *M. oryzae* empobrecidos en glucógeno todavía causan enfermedad [Badaruddin *et al.*, 2013].

Para *L. gongylophorus* es muy escasa la investigación sobre cómo ocurre y se regula la producción de glucógeno, el conocimiento actual consiste en su presencia en las estructuras denominadas gonglidios, que se consideran hifas especializadas para esta y otras funciones en el hongo.

### 2.6. Reconstrucción de redes metabólicas en microorganismos.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación de amplio espectro ha permitido la obtención de grandes volúmenes de datos sobre la información codificada en el genoma de diferentes organismos. La exploración de esta información para comprender el principio de organización de las redes genéticas y metabólicas es una de las áreas de investigación más importantes en la era posterior a la secuenciación del genoma. De acuerdo con los diferentes criterios de anotación genética, los genes se pueden clasificar en diferentes grupos funcionales generando una gran cantidad de productos génicos que codifican a enzimas que a su vez catalizan reacciones celulares formando una compleja red metabólica. Correspondiendo a estos avances ha sido posible el estudio de las redes metabólicas como sistemas lineales y no lineales que puede estar reguladas dinámicamente [Schuster *et al.*, 2000, Zien *et al.*, 2000].

Una red metabólica se puede describir como un modelo gráfico que representa la presencia de metabolitos y enzimas catalizadoras de reacciones, así como, las relaciones sustrato-producto entre metabolitos y reacciones. Existen varios métodos y bases de datos disponibles para reconstruir redes metabólicas específicas de un organismo a partir de la información del genoma, como es el caso de KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg>), WIT ([wit.mcs.anl.gov/WIT](http://wit.mcs.anl.gov/WIT)) y EcoCyc ([biocyc.org/ecocyc/](http://biocyc.org/ecocyc/)), entre otras [Kanehisa and Goto, 2000, Overbeek *et al.*, 2000, Karp *et al.*, 2002]. Cientos de redes metabólicas se han reconstruido automáticamente con varios métodos hasta la fecha. Por ejemplo, la base de datos BioCyc contiene la

## Capítulo II. ANTECEDENTES

herramienta Pathway Tools que ha permitido construir más de 500 redes metabólicas para varios organismos [Caspi *et al.*, 2007]. Sin embargo, los métodos de reconstrucción automatizados actuales producen sólo un borrador de la red metabólica, que necesita ser curada manualmente mediante la realización adicional de homología de secuencias, búsquedas bibliográficas e inclusive generar datos experimentales [Duarte *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009].

La reconstrucción manual de una red metabólica comienza con una evaluación inicial de la integridad de la reconstrucción del borrador generado automáticamente. Cada reacción debe evaluarse por su necesidad para el modelo; estequiometría precisa; dirección de reacción y reversibilidad; y papel en la producción, uso y reciclaje de metabolitos. Otras preocupaciones incluyen la viabilidad termodinámica y las limitaciones energéticas [Haggart *et al.*, 2011]. Como parte integral de una reconstrucción exitosa, esta evaluación manual puede requerir una cantidad significativa de trabajo dedicado para completarse.

David *et al.*, 2003, identificaron la topología del metabolismo central del carbono de *Aspergillus niger* y se reconstruyó una red metabólica, integrando la información genómica, bioquímica y fisiológica disponible para este microorganismo y otros hongos relacionados [David *et al.*, 2003]. En otra investigación realizada por Samal *et al.*, 2017, se construyó una red metabólica para el hongo filamentoso *Neurospora crassa* con reacciones importantes para la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular de las plantas en azúcares simples. Para reconstruir esta red, los autores integraron información de genómica funcional, transcriptómica, proteómica, genética y caracterizaciones bioquímicas [Samal *et al.*, 2017]. Hasta la fecha no existe ninguna reconstrucción de redes metabólicas reportadas para el hongo *L. gongylophorus*, lo cual se debe a la escasa información disponible para el género *Leucoagaricus* en las bases de datos que alojan información genómica y proteómica. Sin embargo, se han desarrollado construcciones de redes para algunos hongos filamentosos, lo cual ayuda a tomar como base para la realización de nuevas redes con organismos filogenéticamente cercanos.

## Capítulo II. ANTECEDENTES

### 2.6.1. Análisis bioinformáticos de redes metabólicas.

El análisis de redes metabólicas se puede clasificar en modelos de redes metabólicas dinámicas y estructurales. Debido a la limitada información de parámetros cinéticos, el modelado de redes metabólicas estructurales se ha aplicado ampliamente para analizar el metabolismo celular en estado estacionario. Dependiendo de las suposiciones que se hagan y de si se requieren datos experimentales, se han desarrollado diferentes técnicas para analizar la invariante de las redes metabólicas, como el análisis de flujo metabólico (MFA), el análisis de balance de flujo (FBA) y el análisis de vías metabólicas (MPA), el cual incluye los análisis de modos elementales y vías extremas [Stephanopoulos *et al.*, 1998, Trinh, 2009, Lewis *et al.*, 2012].

La teoría detrás del análisis de redes metabólicas se basa en el primer principio de conservación de masas de metabolitos internos dentro de un sistema biológico [Reder, 1988]. Un sistema puede estar definido por una célula o un compartimento de células que contiene metabolitos internos. Estos metabolitos se transforman en otros a través de una red de reacciones catalizadas por enzimas. Las reacciones que transforman metabolitos dentro del sistema se definen como reacciones internas, mientras que las reacciones que involucran el transporte de metabolitos dentro y fuera del sistema se consideran reacciones de intercambio [Schilling *et al.*, 2000]. La ecuación general para describir la conservación de masas de metabolitos dentro de un sistema de volumen definido es:

$$\frac{dC}{dt} = S \cdot v - \mu C \quad (2.1)$$

donde  $C$  (mmol/L) es el vector de columna ( $m \times 1$ ) de las concentraciones internas de metabolitos;  $S$  es la matriz estequiométrica ( $m \times n$ ) de la red metabólica cuyas filas y columnas representan metabolitos y reacciones, respectivamente;  $v$  (mmol / L / h) es el vector de flujo (velocidad de reacción) ( $n \times 1$ ); y  $\mu$  (1 / h) es el efecto de dilución, por ejemplo, expansión de volumen durante el crecimiento celular. Dentro de las dimensiones de una sola célula, dado que la velocidad de dilución es mucho más lenta que la velocidad de reacción de las enzimas [Stephanopoulos *et al.*, 1998], la

## Capítulo II. ANTECEDENTES

contribución del cambio de volumen al cambio en las concentraciones de metabolitos puede considerarse insignificante. Los modelos estructurales de las redes metabólicas consideran que, en el balance, debido a la rápida tasa de renovación de los metabolitos internos, se puede suponer que no se acumulan en el sistema [Fell, 1992], además el término dilución está del orden de micromol, por lo que se puede simplificar la Ec. (2.1) a:

$$0 = S \cdot v \quad (2.2)$$

La reversibilidad de una reacción está definida por la restricción termodinámica. Si una reacción es irreversible, está obligada a realizar un flujo positivo:

$$v_i \geq 0 \quad (2.3)$$

Caso contrario puede estar en valores positivos y negativos para una reacción de carácter reversible, es decir:

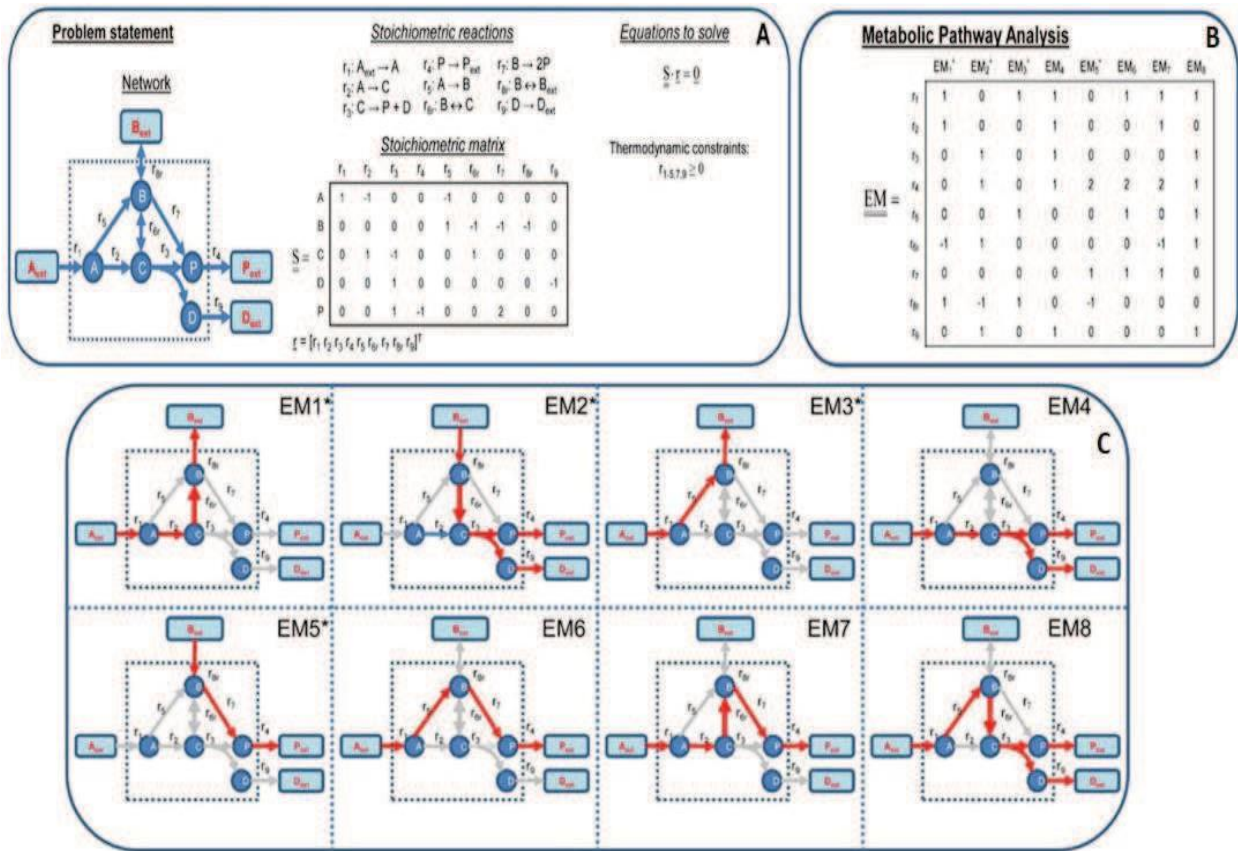
$$-\alpha \leq v_r \leq \beta \quad (2.4)$$

La Figura 2.1 A muestra un ejemplo de cómo formular el problema para una red metabólica simple. La red consta de nueve reacciones, dos de las cuales son reversibles y de nueve metabolitos, cinco de los cuales son internos. Para un metabolismo celular, es típicamente un sistema indeterminado donde el número de ecuaciones es mucho menor que el número de variables.

### 2.6.2. Análisis de vías metabólicas.

En contraste con las técnicas anteriores, el análisis de vías metabólicas puede identificar todos los vectores de flujo metabólico que existen en una red metabólica sin requerir el conocimiento de tasas de flujo fijas o imponer ninguna función objetivo para el metabolismo celular, como es el caso del análisis de balance de flujo (FBA). Las soluciones de la ecuación (2.2) junto con la desigualdad (2.3) y (2.4) constituyen el espacio de flujo admisible que también se conoce como el cono poliédrico convexo

[Rockafellar, 2015]. La desigualdad (2.3) y (2.4) representan la restricción de factibilidad termodinámica; o restricción de signo [Klamt, 2003]. El número de estas soluciones es infinito.



**Figura 2.1:** Análisis de una red metabólica simple. (A) Declaración del problema. El sistema consta de metabolitos internos A, B, C, D y P que están unidos a través de las reacciones internas  $r_2$ ,  $r_3$ ,  $r_5$ ,  $r_6$ ,  $r_7$ . A partir de las reacciones estequiométricas, se puede configurar una matriz estequiométrica S para los metabolitos internos donde las filas corresponden a los metabolitos internos y las columnas representan las reacciones. (B) Al usar METATOOL, el análisis de modo elemental identifica ocho modos elementales únicos enumerados en la forma de matriz EM donde las filas corresponden a reacciones y las columnas representan modos elementales. (C) Representación gráfica de modos elementales para la red metabólica simple. Modificada de Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. (p.813-826), [Trinh *et al.*, 2009], Applied microbiology and biotechnology, 81(5).

Sin embargo, las restricciones adicionales sobre el espacio de flujo admisible, como la no descomponibilidad y la independencia sistemática, pueden formar un conjunto finito de soluciones. La aplicación de estas restricciones adicionales da como resultado técnicas diferentes, pero estrechamente relacionadas, para el análisis de vías

## Capítulo II. ANTECEDENTES

metabólicas, incluido el análisis de modo elemental y el análisis de vías extremas [Schuster *et al.*, 2002].

Un modo elemental es un conjunto mínimo de reacciones que pueden operar en estado estable, mientras que el conjunto de vías extremas es el subconjunto sistémicamente independiente de los modos elementales. En otras palabras, los modos elementales representan los caminos compuestos por la sucesión de varias reacciones, las cuales, involucran el consumo de metabolitos externos dando lugar a productos de interés, tal cual se representa en la Figura 2.1 C. En una representación matemática multidimensional donde cada eje corresponde a un flujo de reacción, todas las posibles distribuciones de flujo en estado estacionario se encuentran dentro de un cono de flujo multidimensional. Los caminos extremos forman los bordes de este cono, y los modos elementales adicionales pueden estar en la superficie o en el interior del cono [Schuster *et al.*, 2002, Pfeiffer *et al.*, 1999]. Con base en estas características, el análisis de modo elemental calcula todas las soluciones en el espacio de flujo admisible resolviendo la ecuación (2.2) junto con la restricción termodinámica (2.3) y (2.4) y una restricción adicional de no descomponibilidad, dando lugar a una matriz estequiométrica que relaciona los modos elementales (EM, por sus siglas en inglés) con las reacciones químicas utilizadas en el análisis Figura 2.1 B. El criterio de no descomponibilidad implica que, si se elimina alguna de sus reacciones, un modo elemental (EM) no podrá transitar el camino de reacciones en estado estable, es decir que su función ya no estará disponible para la red y se interrumpirá automáticamente toda la ruta [Schuster *et al.*, 2002].

### 2.6.3. Análisis de modos elementales aplicado a la ingeniería metabólica.

La capacidad de expresar todas las capacidades metabólicas de una célula en términos de unidades funcionales elementales hace que EMA sea una herramienta poderosa para la ingeniería metabólica [Trinh, 2012]. El análisis de modos elementales se puede aprovechar para realizar una caracterización sistemática de fenotipos celulares [Kurata *et al.*, 2007], análisis de propiedades de redes metabólicas, identificación de dianas farmacéuticas o terapéuticas [Beuster *et al.*, 2011] y diseño racional de cepas

## Capítulo II. ANTECEDENTES

para aplicaciones de ingeniería metabólica. Esta última aplicación incluye considerar si una célula es capaz de producir un metabolito de interés a partir de un sustrato dado. Si hay al menos un EM (o una combinación de EM) que conecta el sustrato y el producto de interés, la estrategia de producción es posible. De esta forma, la eficiencia (estequiométrica) de conversión se puede calcular fácilmente siguiendo la cadena de reacciones en un modo elemental. Al hacerlo, se puede identificar el modo con el rendimiento teórico máximo lo que puede ser validado experimentalmente para comprobar la similitud de la predicción con el análisis *in silico* [Trinh *et al.*, 2009].

La primera aplicación informada del análisis de modo elemental a un sistema biológico real es la optimización de la producción de 3-desoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato (DAHP), un precursor de las vías de síntesis de aminoácidos de tirosina, fenilalanina y triptófano en *Escherichia coli* [Liao *et al.*, 1996]. Con las mejoras en el desarrollo de softwares para el análisis de modo elemental [Klamt, 2003, Kamp, 2006], se han analizado *in silico* redes metabólicas más complicadas de diferentes microorganismos para diseñar cepas eficientes y robustas para producir productos y seguido de experimentos *in vivo* para confirmar la predicción. Por ejemplo, el análisis de modo elemental también se ha aplicado para predecir la síntesis anaeróbica de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en una cepa transgénica de *Saccharomyces cerevisiae* [Carlson *et al.*, 2002], la síntesis óptima de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* [Vijayasankaran *et al.*, 2005], la producción óptima de L-metionina en *E. coli* y *Corynebacterium glutamicum* [Kromer *et al.*, 2006], y la producción de cianoficina en cepas recombinantes *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* [Diniz *et al.*, 2006]. Sin embargo, el análisis de modos elementales enfocado a la caracterización y diseño de cepas para hongos filamentosos es limitada, más aún, no existe ningún análisis de este tipo realizado para el hongo *L. gongylophorus*.

### Capítulo III. JUSTIFICACIÓN

En la UAM-Cuajimalpa se identificó y obtuvo la secuencia del genoma de *L. gongylophorus* (LEU18496, GenBank: KJ419350.1) un hongo endémico simbiote de *A. mexicana*, proveniente de Xalapa, Veracruz. Este hongo fue capaz de crecer sobre sustratos lignocelulósicos en cultivo sólido y sumergidos, y a partir de estos cultivos se han obtenido extractos enzimáticos con actividad endoglucanasa, xilanasas y lacasa [Vigueras *et al.*, 2017, Maya-Yescas *et al.*, 2021]. Recientemente se han obtenido avances en la obtención de un ensamble y anotación funcional del genoma de *L. gongylophorus*, como un paso inicial para la reconstrucción de la red metabólica.

Aprovechando las ventajas de estos avances y del modelado matemático de redes metabólicas, con la presente propuesta se busca evaluar la capacidad que tiene *L. gongylophorus* como sistema biológico de crecer en distintos sustratos y así poder aprovechar su potencial metabólico en la producción de productos como el glucógeno y enzimas con actividad lignocelulósica. Además, se busca potenciar el conocimiento sobre este hongo y de esta forma también aprovechar la producción enzimática para el ablandamiento de residuos lignocelulósicos.



## Capítulo IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cómo será la distribución de proteínas CAZymes y FOLymes en este hongo al crecer en distintos sustratos?
2. ¿Cuál es el conjunto de enzimas que participan en la síntesis de glucógeno en *L. gongylophorus*?
3. ¿Cuáles son las posibles vías de degradación de los sustratos celulosa, pectina y xilano?
4. ¿Qué tan eficiente es *L. gongylophorus* en aprovechar los sustratos celulosa, xilano y pectina en la síntesis de glucógeno?

## Capítulo V. HIPÓTESIS

La producción de glucógeno y las actividades enzimáticas de enzimas CAZymes realizados por *Leucoagaricus gongylophorus* están en función del sustrato lignocelulósico modelo utilizado.

## Capítulo VI. OBJETIVO

### 6.1. Objetivo general.

Evaluar el metabolismo de producción del glucógeno y enzimas CAZymes y FOLymes de *Leucoagaricus gongylophorus* a partir de sustratos lignocelulósicos modelo.

#### 6.1.1. Objetivos específicos.

1. Construir la red metabólica del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* para el análisis de la síntesis de glucógeno a partir de sustratos lignocelulósicos modelo.
2. Evaluar el metabolismo de producción de glucógeno utilizando análisis de modos elementales.
3. Identificar enzimas CAZymes y FOLymes codificadas en el genoma de *L. gongylophorus* utilizando alineamiento de secuencias.
4. Caracterizar el crecimiento de *L. gongylophorus* en cultivos sumergidos y determinar los rendimientos de producción de glucógeno a partir de sustratos lignocelulósicos modelo.
5. Realizar ensayos enzimáticos de actividades CAZymes (Endoglucanasa, Xilanasas, Pectinasa) para obtener las unidades de actividad volumétrica y específica.

## Capítulo VII. METODOLOGÍA

### 7.1. Microorganismo.

Se utilizó la cepa del hongo simbiote *L. gongylophorus* LEU 18496 aislado del nido de la hormiga cortadora de hojas *Atta mexicana* [Vigueras *et al.*, 2017] y fue propagada en agar extracto de malta modificado (MEA-LP), que contiene (g/L): extracto de malta (20), peptona bacteriológica (5), extracto de levadura (2) y agar (20), el pH se ajustó a 5,0 [Miyashira *et al.*, 2010]. Los cultivos fueron incubados a 27 °C ± 1 °C. La cepa fúngica fue conservada a -80 °C en tiras de papel de filtro con glicerol al 20 % (v / v).

### 7.2. Cultivos sumergidos.

Se utilizó el medio mineral reportado por [Ezekiel *et al.*, 2010], que fue modificado con la composición mostrada en la Tabla 7.1 y contiene 4 mL/L de los siguientes elementos trazas (g/L): FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O(0,015); MnSO<sub>4</sub>(0,012); ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O(0,013); CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O(0,0023) y CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O(0,0015).

**Tabla 7.1:** Medio mineral con diversas fuentes de carbono para la producción de glucógeno y enzimas.

Componente	Concentración (g/L)
Sulfato de amonio	1,5
Urea	0,3
Dihidrógeno Fosfato de Potasio	2,0
Cloruro de calcio dihidratado	0,36
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,3
Sulfato de calcio dihidratado	0,25
Pectina	20
Xilano	20
Carboximetilcelulosa	20

Se realizaron cultivos en estado sumergido utilizando frascos Erlenmeyer de 200 mL, con 50 mL del medio mineral propuesto en la Tabla 7.1 y 20 g/L de Carboximetilcelulosa (CAS No. 9000-11-7), Pectina (CAS No.9000-69-5) y Xilano (CAS No. 8068-05-1) como sustratos modelos. Los cultivos fueron incubados a 27 ° C ± 1 ° C, 150 rpm de agitación

## Capítulo VII. METODOLOGÍA

y el pH se ajustó a 5,0. Además se realizaron cultivos de cada sustrato con concentraciones de 10 y 20 g/L en frascos con tapa de 500 mL para la obtención de los perfiles de CO<sub>2</sub>.

### 7.3. Análisis de muestras.

Las muestras obtenidas de los cultivos realizados a 20 g /L con cada sustrato se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 10 min (centrífuga minispin Eppendorf 5452, USA); el sobrenadante se utilizó para la determinación de actividad enzimática y se utilizó el pellet para la cuantificación de glucógeno y biomasa.

#### 7.3.1. Determinación de la concentración de CO<sub>2</sub> y biomasa en peso seco.

Las concentraciones de CO<sub>2</sub> se monitorizaron en fase gaseosa utilizando los sensores (K33-ICB 10 % CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> Meter, EE. UU) con un sistema de adquisición de datos mediante interfaz USB.

La biomasa resultante de los cultivos se centrifugó a 12, 000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf 5810, USA) y el pellet secado en el horno (FE-291-Felisa) a 60 ° C por 30 minutos y pesado en una balanza analítica (Ohaus, Adventurer-pro).

#### 7.3.2. Análisis elemental (C, H, N y S).

Se realizó análisis elemental (C, H, N y S) para cada fuente de carbono utilizando un analizador elemental (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Reino Unido). Las muestras de sustrato se colocaron en cápsulas de estaño a las que se les añadió pentóxido de vanadio (relación en peso 1:1). Los cromatogramas se calibraron frente a un patrón de metionina y los resultados se expresaron en porcentaje en peso de cada elemento.

#### 7.3.3. Determinación de la producción de glucógeno.

La determinación directa de glucógeno se realizó utilizando el kit (SIGMA MAK016) para lo cual se utilizaron 250 mg de biomasa. Las muestras de biomasa fueron suspendidas en 10 mL de agua destilada, se homogenizaron en vortex durante 5 min, posteriormente las muestras se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5

## Capítulo VII. METODOLOGÍA

min para inactivar las enzimas, después se sonicaron a 4 °C por 20 min, finalmente se centrifugaron a 12, 000 rpm por 5 min y se tomaron 25 µL del sobrenadante para llevar a cabo el ensayo para la determinación de glucógeno de acuerdo con el protocolo del kit. La curva estándar utilizada fue la propuesta en el propio kit y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 7.3.4. Ensayos de actividad enzimática.

Los ensayos enzimáticos de actividades, endoglucanasa, pectinasa y xilanasa, se determinaron por método espectrofotométrico para determinar las unidades de actividad específica (U/mg proteína). Las unidades de actividad enzimática endoglucanasa, pectinasa y xilanasa se determinaron mediante la liberación de azúcares reductores por el método DNS [Miller, 1959]. A partir de la mezcla de 100 µL de extracto enzimático con 1000 µL de sustrato (CMC, 2g / L; Xilano 2 g/L; Pectina, 2 g/L) en buffer acetato 0.1 M pH 4.8 para las actividades endoglucanasa y xilanasa, y buffer fosfato 0,1 M pH 7,5 para actividad pectinasa y 2 mL H<sub>2</sub>O de agua desionizada, los tubos fueron incubados a 50 °C durante 30 minutos, y se analizaron los controles sin extracto enzimático o sustrato.

La unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que cataliza un µmol de glucosa, xilosa y ácido galacturónico por minuto según las condiciones del ensayo. La curva estándar de ácido galacturónico utilizada fue la propuesta por [Abdulridha and Jebur, 2020]. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 7.4. Análisis de enzimas CAZymes y FOLymes de *L. gongylophorus*.

Utilizando el ensamblaje del genoma de *L. gongylophorus* analizado por el grupo de investigación de la UAM-C, se seleccionaron un conjunto de secuencias de proteínas CAZymes y FOLymes anotadas de referencia para varios hongos en la base de datos NCBI [Schoch *et al.*, 2020]. Con estas secuencias se creó una base de datos local, que permitió realizar un alineamiento de secuencias proteína-proteína utilizando la herramienta EggNog mapper [Huerta-Cepas *et al.*, 2019].

## Capítulo VII. METODOLOGÍA

### 7.4.1. Análisis filogenético de enzimas CAZymes codificadas en el genoma de *L. gongylophorus* LEU18496.

Secuencias de enzimas pertenecientes al grupo CAZymes encontradas a partir del ensamble genómico de *L. gongylophorus* LEU18496 y otras secuencias de diferentes especies de hongos se utilizaron como base para la construcción de los árboles filogenéticos. Las secuencias se alinearon usando MUSCLE [Edgar, 2004], implementado en el software Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/index.cgi>) [Dereeper *et al.*, 2008] con los siguientes parámetros: máximo número de iteraciones 16 y remoción de posiciones con gaps. Los análisis filogenéticos se realizaron en PhyML utilizando la prueba de aproximación de máxima verosimilitud (SK-like) [Jones *et al.*, 1992] utilizando el modelo basado en matriz de Jones-Taylor-Thornton (JTT) y 100 réplicas de bootstrap [Felsenstein, 1985] para cada análisis. El árbol inicial se dibujó a escala, aplicando los algoritmos de unión de vecinos y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo JTT y la topología con valores de probabilidad logarítmicos superiores. Los árboles se visualizaron y editaron utilizando el programa Interactive Tree of Life (iTOL) (<https://itol.embl.de/tree/>).

### 7.5. Construcción de una red del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* LEU18496.

La construcción de la red metabólica del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* se realizó a partir de una búsqueda de información recopilada a través de un extenso estudio de la literatura, incluidos artículos científicos y bases de datos en línea de las enzimas que eran de nuestro interés. La integración de diferentes tipos de información genómica, bioquímica y fisiológica, y de datos referentes a microorganismos relacionados (hongos filamentosos) fue crucial para llevar a cabo la construcción, dado que la información disponible inicialmente para *L. gongylophorus* es escasa. Además, se extrapolaron algunos datos de la reconstrucción metabólica a escala genómica desarrollada para *Saccharomyces cerevisiae* [Forster *et al.*, 2003].

A partir de las secuencias de enzimas anotadas se realizó un alineamiento de secuencias proteína-proteína utilizando la herramienta blastp con las tres anotaciones

## Capítulo VII. METODOLOGÍA

que existen en NCBI para el género *Leucoagaricus*. De la misma manera se realizó un segundo alineamiento utilizando el ensamble de *L. gongylophorus* obtenido por nuestro grupo de investigación con el objetivo de verificar la presencia de estas enzimas en el genoma del hongo.

### 7.6. Análisis de modos elementales (EMA).

EMA fue implementado utilizando la herramienta METATOOL versión 5.1. El programa incluye la organización de enzimas reversible/irreversible, metabolitos internos/externos y el grupo de reacciones que forman parte del modelo [Kamp, 2006]. Los resultados se analizaron utilizando Excel para la clasificación y el filtrado de modos.



## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Cultivo de *L. gongylophorus* en diferentes fuentes de carbono.

Se realizaron cultivos del hongo en los sustratos pectina, carboximetilcelulosa y xilano a 20 g/L demostrando la capacidad de *L. gongylophorus* de crecer en estos sustratos. El mayor crecimiento se obtuvo en el sustrato xilano obteniéndose valores de biomasa en peso seco de 0.730 g, seguido por 0.620 g obtenidos en carboximetilcelulosa y 0.44 g en pectina a los 28 días de cultivo. Un patrón similar se obtuvo al determinar los rendimientos biomasa-sustrato, el mayor rendimiento encontrado involucró al xilano seguido de la carboximetilcelulosa y la pectina con valores de  $Y_{\text{biomasa/xilano}} = 0.73$  (g biomasa/g xilano),  $Y_{\text{biomasa/CMC}} = 0.62$  (g biomasa/g CMC) y  $Y_{\text{biomasa/pectina}} = 0.44$  (g biomasa/g pectina) respectivamente Tabla 8.2. A partir de los resultados planteados anteriormente se puede establecer que la capacidad de crecimiento de *L. gongylophorus* cambia al utilizar diversas fuentes de carbono por lo que, de acuerdo con estos valores, se puede considerar que utilizar xilano como sustrato es una elección importante si se desea producir biomasa fúngica a partir de *L. gongylophorus*.

Debido a que la naturaleza química compleja de los sustratos modelos utilizados, fue estimado el % de carbono presente en las fuentes de carbono utilizadas. En la Tabla 8.1 se muestra la composición estimada de estas fuentes determinada mediante los análisis elementales CHONS, de acuerdo con estas técnicas se pueden apreciar diferencias en cuanto a la cantidad de carbono en las mismas.

**Tabla 8.1:** Composición elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno de diferentes sustratos expresados en % relativos.

CHNS			
Sustratos	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno
CMC	40.24	5.91	ND*
Xilano	38.48	5.49	ND*
Pectina	43.65	6.04	ND*

ND\*: no detectado.

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

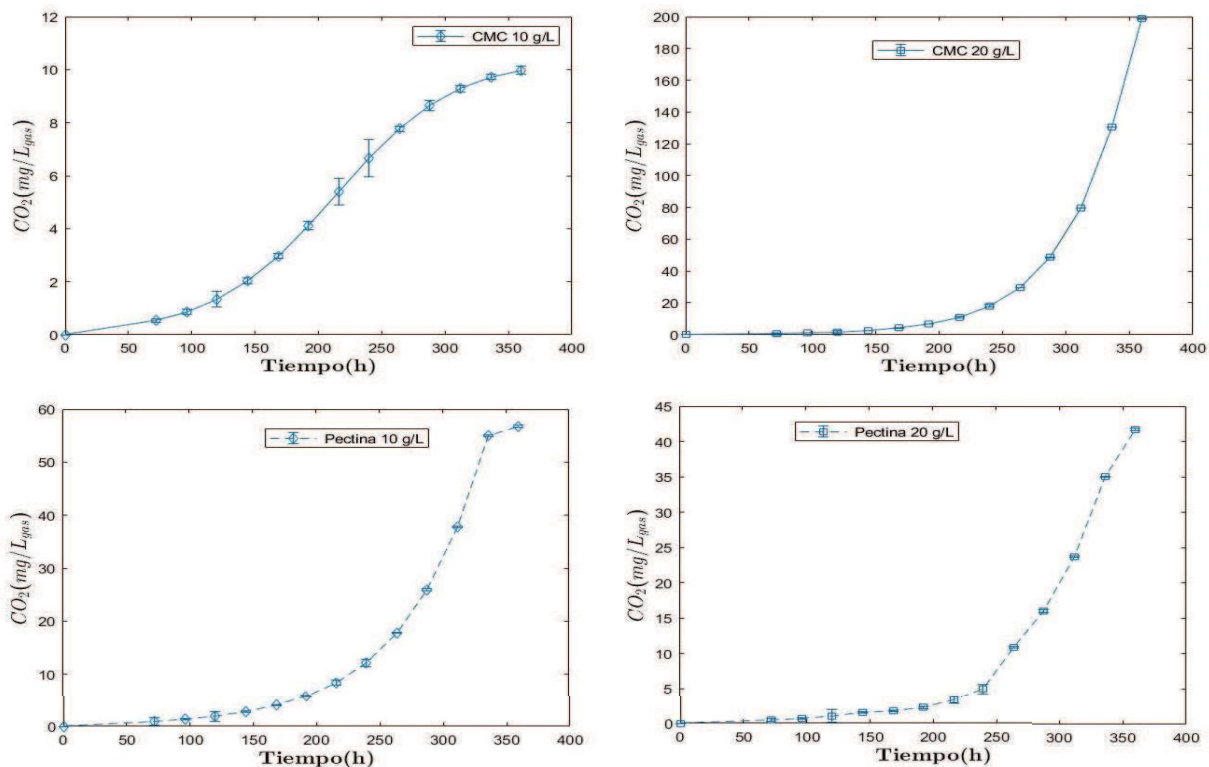
Teniendo en cuenta los resultados porcentuales expresados en la Tabla 8.1, fueron recalculados los rendimientos biomasa-sustrato para equilibrar las cantidades de carbono presente en el medio y poder descartar el posible efecto de que una mayor disponibilidad de carbono en el medio incrementara la producción de biomasa. A continuación, se presentan los valores obtenidos de  $Y_{\text{biomasa/pectina}} = 1$  (g biomasa/gC pectina),  $Y_{\text{biomasa/xilano}} = 1.89$  (g biomasa/gC xilano) y  $Y_{\text{biomasa/CMC}} = 1.54$  (g biomasa/gC CMC) respectivamente. De esta forma es posible apreciar el mismo patrón de rendimientos de acuerdo con la cantidad de carbono total presente en el medio. Cabe destacar que, debido a la condición experimental considerada inicialmente, *L. gongylophorus* tuvo una mayor disponibilidad de carbono al crecer en pectina como sustrato; sin embargo, esto no le atribuye una mayor eficiencia en la formación de biomasa. Estos resultados se muestran similares a las investigaciones realizadas por Gomes De Siqueira *et al.*, 1998 y Silva *et al.*, 2006 los cuales concluyeron que la pectina resultó la fuente de carbono menos eficiente en la formación de biomasa para ambas cepas de *L. gongylophorus* estudiadas [Gomes De Siqueira *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 2006]. La discusión aportada por estos investigadores ante dicho resultado se basó en la baja eficiencia de crecimiento a partir del ácido galacturónico que constituye el componente principal de la pectina [Voragen *et al.*, 2009].

La Figura 8.1 muestra los perfiles de CO<sub>2</sub> obtenidos a partir de los cultivos realizados en los sustratos pectina y carboximetilcelulosa a 10 y 20 g/L, con un tiempo de cultivo de 400 horas. En estos perfiles se muestra como la acumulación de CO<sub>2</sub> fue mayor para la CMC con una concentración de 20 g/L. La concentración de CO<sub>2</sub> alcanzada por los cultivos que utilizaron carboximetilcelulosa fue cuatro veces mayor que el CO<sub>2</sub> generado con pectina en las mismas condiciones (20 g/L) alcanzando valores de 198.6 mg/L<sub>gas</sub> y 41.7 mg/L<sub>gas</sub> respectivamente, sin embargo; se debe considerar que para estos cultivos que utilizaron 20 g/L de cada sustrato no se observa la fase de meseta en la acumulación de CO<sub>2</sub> a las 400 horas de cultivo, por lo que es probable que el CO<sub>2</sub> continúe aumentando luego de este tiempo.

Por otro lado, para los cultivos que contenían los sustratos a una concentración menor (10 g/L) el comportamiento fue diferente. La concentración de CO<sub>2</sub> alcanzada por los

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cultivos que utilizaron pectina fue cinco veces mayor que la obtenida al utilizar CMC, con valores de 57 y 10 mg/Lgas respectivamente para cada sustrato. Este resultado puede explicarse por la característica de la pectina de ser un sustrato con alta viscosidad a altas concentraciones [Filippov and Kohn, 1975], lo cual, puede repercutir en una disminución de la velocidad de transferencia de nutrientes y oxígeno y de esta forma verse afectada la formación de  $\text{CO}_2$  y biomasa [García-Ochoa *et al.*, 2010]. Es por esto, que consideramos que al disminuir la concentración de pectina en el medio se obtienen valores mayores de  $\text{CO}_2$ , sin embargo, sería interesante la obtención de datos de biomasa utilizando estos sustratos a 10 g/L y de esta manera poder hacer una comparación con respecto a estos resultados.



**Figura 8.1:** Perfiles de  $\text{CO}_2$  de *Leucoagaricus gongylophorus* LEU18496 cultivados en pectina y carboximetilcelulosa (CMC) a 10 y 20 g/L respectivamente. CMC 10 g/L, CMC 20 g/L, Pectina 10 g/L, Pectina 20 g/L.

### 8.1.1. Determinación de glucógeno en cada fuente de carbono.

A partir de los cultivos de *L. gongylophorus* realizados se cuantificó la producción de glucógeno en las tres fuentes de carbono utilizadas a 20 g/L. La mayor concentración de

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

glucógeno se observó en los cultivos con xilano seguido de la carboximetilcelulosa y la pectina. En este sentido los contenidos de glucógeno por gramos de biomasa seca fueron de:  $Y_{\text{glucógeno/biomasa}} = 220.9$  (mg glucógeno/g biomasa),  $Y_{\text{glucógeno/biomasa}} = 73.5$  (mg glucógeno/g biomasa) y  $Y_{\text{glucógeno/biomasa}} = 34.6$  (mg glucógeno/g biomasa) para los cultivos de *L. gongylophorus* desarrollados en xilano, carboximetilcelulosa y pectina respectivamente, comprobándose entonces que la producción de este polímero varía con la fuente de carbono utilizada. Los resultados obtenidos en esta investigación son comparables con los reportados por Saavedra-Molina *et al.*, en 2018 quienes determinaron el contenido de glucógeno intracelular de una cepa de *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526 cultivada en medios sólidos abundantes en residuos lignocelulósicos. Los valores reportados en este trabajo para el contenido de glucógeno también variaron en función del medio utilizado obteniendo un valor máximo de 106.9 mg/g de biomasa seca y un mínimo de 51.3 mg/g de biomasa seca [Saavedra-Molina *et al.*, 2018]. En otro estudio realizado por González-Márquez *et al.*, en 2015 determinaron el contenido de glucógeno intracelular y extracelular de una cepa de *Lentinula edodes* cultivada en medio sólido a distintas concentraciones de Ftalato de dietilhexilo (DEHP), un compuesto presente en los plásticos y que se considera tóxico para la salud humana. Se observó entonces que a mayores concentraciones de este compuesto se obtuvo proporcionalmente mayor contenido de glucógeno extracelular con un valor de 650 mg/g de biomasa seca y a menores concentraciones de DEHP se redujo a 300 mg/g de biomasa seca [González-Márquez *et al.*, 2015]. Por lo tanto, las concentraciones obtenidas en este trabajo se encuentran en el rango de lo observado para otros hongos filamentosos pertenecientes a la división *Basidiomycota* y que tienen la capacidad de degradar materiales lignocelulósicos.

Extrapolando estos resultados a los valores de biomasa obtenidos en cada sustrato, se determinaron los rendimientos glucógeno-biomasa y glucógeno-sustrato tal cual se muestra en la Tabla 8.2. Los rendimientos glucógeno-sustrato fueron  $Y_{\text{glucógeno/CMC}} = 118.6$  (mg glucógeno/g CMC) para los cultivos obtenidos utilizando carboximetilcelulosa como única fuente de carbono,  $Y_{\text{glucógeno/pectina}} = 64.21$  (mg glucógeno/g pectina) en pectina y  $Y_{\text{glucógeno/xilano}} = 302.6$  (mg glucógeno/g biomasa) en xilano.

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede observar entonces que para los cultivos que contienen xilano se obtuvo el mayor  $Y_{\text{glucógeno/biomasa}}$ , siendo 6 veces mayor que el rendimiento obtenido para los cultivos que utilizaron pectina como sustrato, mientras que el  $Y_{\text{glucógeno/xilano}}$  fue cinco veces mayor que el  $Y_{\text{glucógeno/pectina}}$ . Estos resultados indican que el xilano constituye la fuente de carbono más eficiente para la obtención de este producto. Por otro lado, es apreciable cómo se distribuye el carbono presente en el medio teniendo en cuenta los  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/x}$  para cada fuente de carbono, evidenciándose un mejor aprovechamiento del carbono en xilano con un 95 % del carbono utilizado en la síntesis de glucógeno; mientras que la CMC y la pectina dirigen menos cantidad de carbono a la síntesis de este compuesto. El resto del carbono no utilizado según el balance debió ser empleado en algunos metabolitos no cuantificados en este trabajo.

**Tabla 8.2:** Rendimientos obtenidos a los 28 días de cultivo de *L. gongylophorus* con cada sustrato.

Sustratos	$Y_{x/s}(mg/g)$	$Y_{p/s}(mg/g)$	$Y_{p/x}(mg/g)$	Balance de Carbono (%)
CMC	$620 \pm 12$	$118.6 \pm 14.5$	$73.5 \pm 7.3$	69
Xilano	$730 \pm 5$	$302.6 \pm 12.5$	$220.9 \pm 10.7$	95
Pectina	$440 \pm 18.3$	$64.2 \pm 3.1$	$34.6 \pm 2.3$	57

### 8.1.2. Ensayos enzimáticos.

El hongo *L. gongylophorus* produjo enzimas con actividad pectinasa, xilanasa y celulasa en todas las fuentes de carbono analizadas luego de 28 días de cultivo en medio mínimo con los sustratos carboximetilcelulosa, xilano y pectina (Tabla 8.3). La actividad pectinasa aparece en mayores cantidades, seguida de la actividad xilanasa y endoglucanasa. Sumando las cantidades de unidades enzimáticas producidas, la producción de pectinasa fue aproximadamente 11 veces mayor que la xilanasa y casi 20 veces mayor que la actividad endoglucanasa. La producción de pectinasa fue mayor en el sustrato pectina, seguido del xilano y la carboximetilcelulosa. La actividad endo- $\beta$ -1.4-xilanasa también se obtuvo con mayor concentración en el sustrato pectina seguido de la carboximetilcelulosa; sin embargo, las miliunidades de enzima obtenidas para esta actividad fue menor cuando se utilizó xilano como sustrato. La enzima endo- $\beta$ -1.4-

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

glucanasa se produjo escasamente en la mayoría de los sustratos probados, con excepción del sustrato pectina donde se obtuvieron 23.55 mU de enzima Tabla 8.3.

En varias investigaciones se ha comprobado la presencia de enzimas con actividad sobre carbohidratos en especies de hongos pertenecientes al género *Leucoagaricus* sp., como es el caso de amilasas, xilanasas, quitinasas, pectina esterasa, pectato liasa, endoglucanasa, beta-glucosidasa, etc. [Gomes De Siqueira *et al.*, 1998, Bacci Jr *et al.*, 2013, Aylward *et al.*, 2013]. Se han informado capacidades similares en el metabolismo de polisacáridos para la cepa B1-97 de *L. gongylophorus* simbionte de la hormiga *Atta sexdens*, en el estudio realizado por Silva *et al.*, 2006, la actividad pectinasa determinada también fue mayor con respecto a las demás y los mejores sustratos para la producción de xilanasas fueron la pectina, la celulosa y el almidón, mientras que la glucosa y el xilano no indujeron la producción de esta enzima. Para el caso que incluye la actividad celulasa sucedió algo similar con nuestro trabajo debido a que se produjo escasamente en todos los sustratos analizados, aunque su actividad no se detectó en xilano [Silva *et al.*, 2006]. Estos resultados demuestran la capacidad de *L. gongylophorus* de degradar materiales lignocelulósicos a partir de la síntesis de enzimas con actividad sobre carbohidratos complejos.

**Tabla 8.3:** Unidades de actividad pectinasa, xilanasas y endo-glucanasa producidas por *L. gongylophorus* a los 28 días de cultivo en fuentes de carbono como pectina, carboximetilcelulosa y xilano.

Fuente de carbono	Actividad enzimática (mU) $\pm$ DE			
	n=3	Endo- $\beta$ -1.4-glucanasa	Endo- $\beta$ -1.4-xilanasas	Pectinasa
CMC		1.45 $\pm$ 0.15	13.73 $\pm$ 2.65	97.22 $\pm$ 5.9
Xilano		0.56 $\pm$ 0.05	4.82 $\pm$ 2.35	145.62 $\pm$ 3.8
Pectina		23.55 $\pm$ 8	25.56 $\pm$ 12.25	264.09 $\pm$ 21

### 8.2. Análisis de proteínas CAZymes y FOLymes en el genoma de *L. gongylophorus*.

Utilizando el ensamblaje genómico obtenido por nuestro grupo de investigación fue llevada a cabo una búsqueda de proteínas con actividad CAZymes y FOLymes que constituyen grupos de proteínas que participan en la degradación de material

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

lignocelulósico y que a su vez son sintetizadas por un gran número de hongos capaces de degradar estos sustratos. Se encontraron 169 proteínas CAZymes, FOLymes y posibles proteasas en el ensamble de *L. gongylophorus* de acuerdo con una base de datos creada para el alineamiento de secuencias proteína-proteína (Tabla 8.4.) Se puede apreciar la cantidad de estos grupos enzimáticos siendo mayor las proteínas incluidas en el grupo CAZymes con 128 proteínas en total mientras que solo 36 se encuentran en el grupo FOLymes. Se conoce que *L. gongylophorus* como parte de la simbiosis de la que forma parte, coloniza un hábitat compuesto fundamentalmente por material lignocelulósico. Durante esta colonización, el hongo secreta cócteles enzimáticos conocidas como CAZymes por lo que es de esperar mayor abundancia relativa de estas proteínas en el ensamble genómico [Martínez *et al.*, 2004, Aragona *et al.*, 2014].

Estos resultados se muestran similares a los obtenidos por Aylward *et al.*, 2013 quienes reportaron la presencia de enzimas CAZymes, FOLymes y proteasas a partir de un ensamble metagenómico de *L. gongylophorus* simbiote de la hormiga *A. cephalotes* donde la mayor abundancia relativa de proteínas encontradas la obtuvo el grupo CAZymes [Aylward *et al.*, 2013]. El análisis de familias de CAZymes encontradas mostró que la superfamilia GH (Hidrolasas) se encuentra ampliamente representada, el gran número encontrado se corresponde con la gran variedad de procesos metabólicos a los cuales están asociadas estas enzimas [Casa Villegas, 2018] y a la poca anotación funcional que se puede encontrar en bases de datos para enzimas pertenecientes al género *Leucoagaricus*.

Por otro lado, fueron encontradas proteínas pertenecientes a familias de enzimas que participan en la degradación de sustratos lignocelulósicos: la familia GH74 que interviene en la formación de celobiosa como parte de la degradación de celulosa, la familia PE implicada en la degradación de pectina y la familia GH3 que interviene en la degradación de xilano. Varias investigaciones han demostrado la capacidad de *L. gongylophorus* de crecer en diferentes sustratos lignocelulósicos [Silva *et al.*, 2006, Viguera *et al.*, 2017, Maya-Yescas *et al.*, 2021], lo que explica el hecho de que estas enzimas estén presentes en el ensamble de este hongo. Otros investigadores como Ike *et al.*, en 2015 demostraron la presencia de enzimas FOLymes en *L. gongylophorus*, como parte de su estudio

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

caracterizaron dos lacasas [Ike *et al.*, 2015], lo cual, corrobora lo obtenido en este estudio donde fueron identificadas 19 lacasas en la anotación realizada. Estas enzimas son conocidas por su capacidad de eliminar componentes tóxicos presentes en el medio y así favorecer el crecimiento del organismo que la produce en los sustratos de esta naturaleza [Reinhammar, 2018], de ahí, que resulte importante su síntesis por *L. gongylophorus*.

**Tabla 8.4:** Distribución de las proteínas CAZymes, FOLymesy proteasas encontradas en *L. gongylophorus* LEU18496.

Grupo	Familia	Anotación	Cant.
CAZymes	GH	Hidrolasa	66
	GH1	Glucoliasa	5
	GH3	Glucosidasa/Xilosidasa	15
	GH5	Celulasas	4
	GH15	Glucoamilasa	5
	GH18	Quitinasa	2
	GH35	Galactosidasa	7
	GH43	Arabinogalactanasa	2
	GH74	Endoglucanasa	3
	PL1	Pectina/Pectato liasa	1
	CE5	Cutinasa	2
	PL4	Ramnogalacturano endoliasa	1
	A	Amilasa	3
	MN	Manosiltransferasa	2
	R	Reductasa	2
	PE	Pectinasa	2
	E	Estearasa	6
FOLymes	GO	Glioxil oxidasa	5
	LO	Lacasa	19
	GH15	Peroxidasa	12
Proteasas	GH15	Proteasas	5

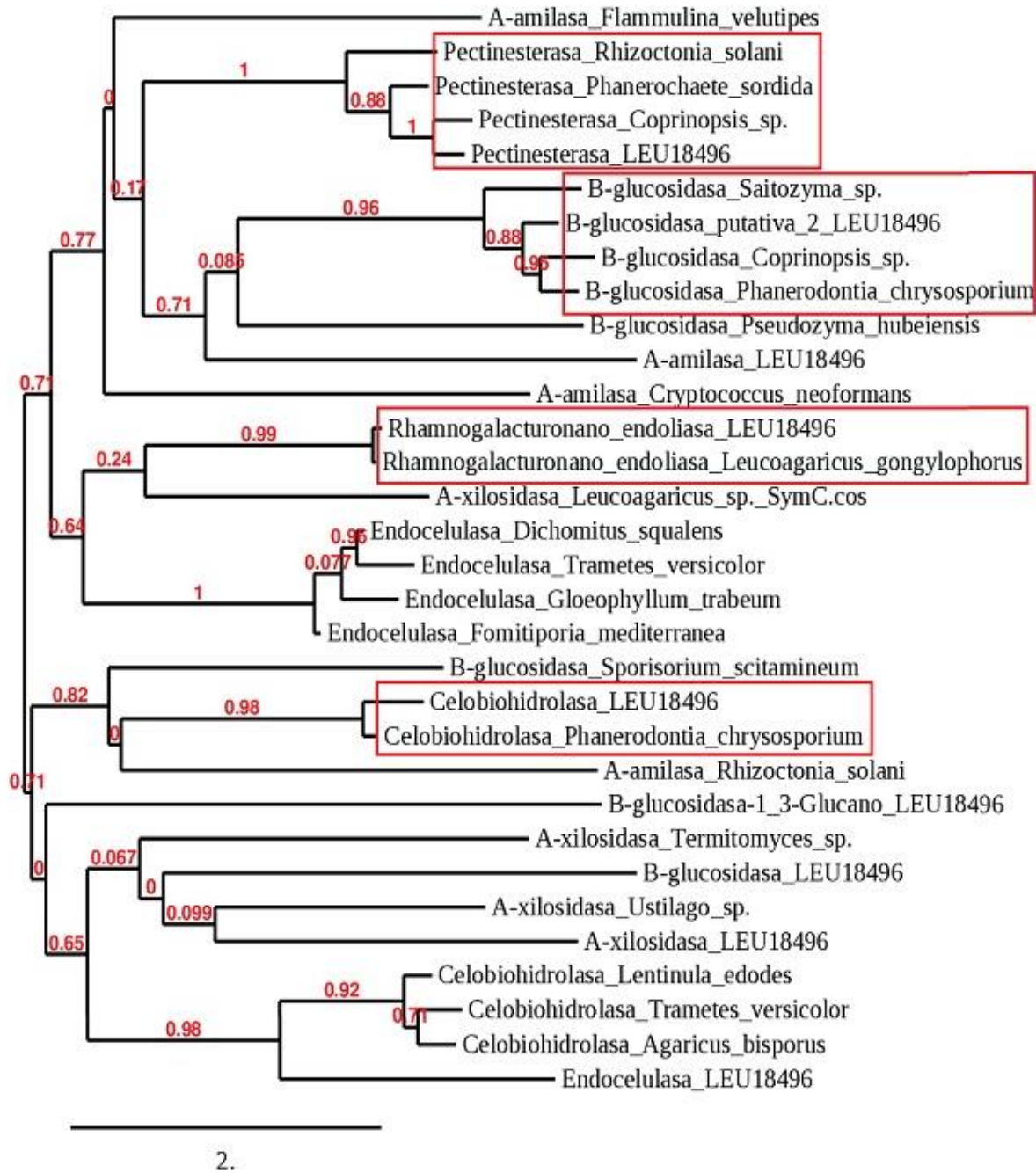
### 8.2.1. Análisis filogenético de enzimas CAZymes.

El árbol filogenético realizado se construyó utilizando el programa PhyML perteneciente a Phylogeny.fr, esta herramienta utiliza el método de máxima verosimilitud para encontrar homología entre las secuencias [Dereeper *et al.*, 2008]. La visualización del conjunto de proteínas analizadas se llevó a cabo utilizando TreeDyn [Chevenet *et al.*,



## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2006], una herramienta que permite la representación de un árbol a partir de una matriz de visualización de patrones estableciendo un tronco común y subdividiendo en ramas los elementos analizados a partir de su homología.



**Figura 8.2:** Análisis filogenético de proteínas CAZymes encontradas en *L. gongylophorus* LEU18496. Los números al lado de cada nodo, en rojo, representan una medida de soporte para el nodo, donde 1 representa el soporte máximo.

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversos autores han utilizado filogenia de proteínas para determinar antepasados comunes entre diferentes familias proteicas [Tan *et al.*, 2016], Crawford *et al.*, en 2004 por ejemplo, estudiaron genes pertenecientes a la familia glicosil hidrolasa (GH9) para conocer la conservación filogenética de estos y la variación de la posición de ciertos intrones [Crawford *et al.*, 2004]. Otros como Labourel *et al.*, en 2020 estudiaron monoxigenasas líticas de polisacaridos (LPMOs) para determinar la conservación filogenética del dominio catalítico de unión a cobre como marcador de estas enzimas y poder determinar nuevas familias de estas [Labourel *et al.*, 2020].

A partir de la lista de proteínas anotadas en la Tabla 8.4 con función CAZymes, se buscaron sus secuencias de aminoácidos para determinar la relación con enzimas reportadas para otras especies de hongos, analizar su antepasado común y rectificar la función que le fue otorgada. Como se puede apreciar en la Figura 8.2 el árbol de máxima verosimilitud (ML) sugiere que todas las proteínas con función CAZymes poseen un antepasado común por lo que se puede determinar que todas las enzimas analizadas comparten esta función a partir de un dominio ampliamente conservado [Lin *et al.*, 2020]. En este análisis fueron incluidas enzimas con función  $\alpha$ -amilasa, pectinesterasa,  $\beta$ -glucosidasa, rhamnogalacturano endoliasa, endocelulasa, celobiosa hidrolasa y xilosidasa; como se puede apreciar los diversos grupos enzimáticos se separaron en ramas independientes permitiendo construir clados específicos de acuerdo con su actividad. Se encontró que la rama que involucra a la proteína con función rhamnogalacturano endoliasa de *L. gongylophorus* LEU18496 comparte un ancestro común bastante cercano con la proteína descrita para *L. gongylophorus* AC12 con respecto a las demás proteínas, en este caso el cambio genético representado por la longitud de la rama es muy pequeño, lo que se vincula con el hecho de que ambas proteínas pertenecen a la misma especie y que se encuentren muy relacionadas filogenéticamente, de esta forma; se corrobora la anotación funcional realizada previamente. Se observó además que la pectín esterasa de *L. gongylophorus* se agrupó con varias proteínas pertenecientes al mismo grupo de hongos como *Rhizoctonia solani*, *Phanerochaete sordida* y *Coprinopsis*, la pectín esterasa de interés comparte según lo observado un ancestro común lejano con los dos primeros hongos mencionados, sin

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

embargo; se encuentra filogenéticamente cercana al ancestro común que comparte con la pectín esterasa de *Coprinopsis*, la distancia filogenética de ambas proteínas con respecto a su nodo interior es pequeña y el soporte del nodo se considera alto con un porcentaje de 100 % [Felsenstein, 1993] por lo que se considera que ambas proteínas están relacionadas filogenéticamente.

Otras de las familias de proteínas analizadas fueron las celobiosa hidrolasas, enzimas encargadas de degradar la celobiosa perteneciente a la celulosa. La celobiosa hidrolasa anotada para *L. gongylophorus* en la sección anterior diverge a partir de un ancestro común de la celobiosa hidrolasa reportada para *Phanerochaete chrysosporium* LOCUS XY L5P HACH, un *Agaromyces* saprófito que degrada material lignocelulósico [Huy *et al.*, 2015]; esta última proteína se encuentra más cerca filogenéticamente de dicho ancestro que la hidrolasa de *L. gongylophorus*, sin embargo; la distancia sigue siendo pequeña para ambas y el soporte de dicho nodo se considera alto con un porcentaje del 98 % [Felsenstein, 1993], por lo tanto se considera que existe una estrecha relación entre ambas proteínas; esto último, puede estar vinculado al hecho de que *Phanerochaete chrysosporium* es un hongo perteneciente a la división *Basidiomycota* y que se ubica en el grupo de hongos de podredumbre blanca, características que comparte *L. gongylophorus*.

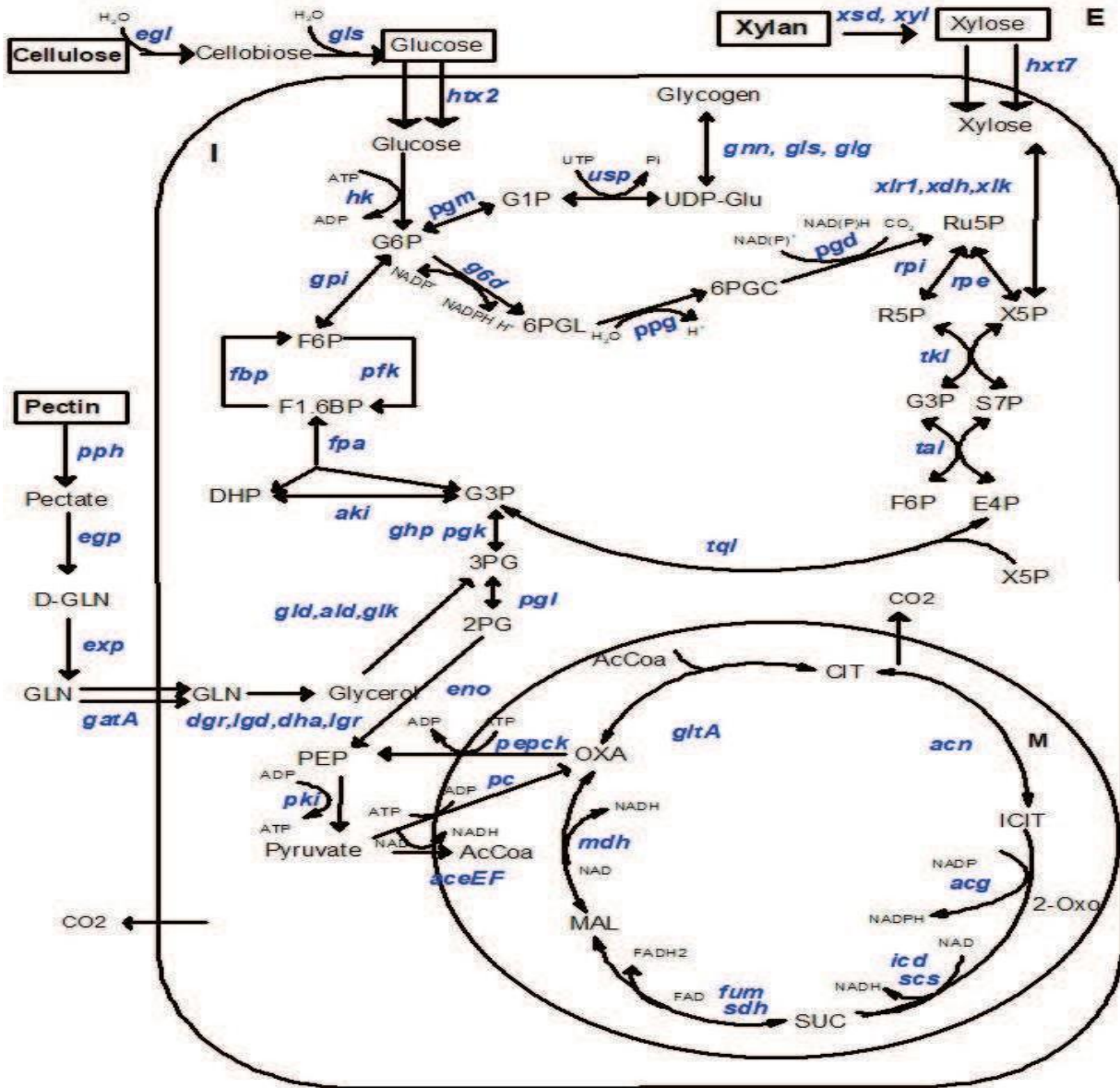
Este análisis nos permitió reportar la congruencia, así como, las relaciones de discordancia entre las secuencias de proteínas de diferentes especies de hongos con *L. gongylophorus*, además, de reflejar las asociaciones taxonómicas entre hongos estrechamente relacionados de acuerdo con diversos parámetros, como el consumo de sustratos lignocelulósicos.

### 8.3. Construcción de una red metabólica de *L. gongylophorus*.

Para analizar la producción de glucógeno durante el crecimiento en diferentes fuentes de carbono fue construida una red metabólica del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus*. En esta, fueron incluidas las enzimas involucradas en el metabolismo de degradación de los sustratos lignocelulósicos utilizados en esta investigación. Debido a la escasa anotación funcional de *L. gongylophorus*, fue necesario tomar como modelo

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de referencia otros microorganismos como *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* y *Leucoagaricus leucothites*.



**Figura 8.3:** Representación gráfica de la red metabólica del metabolismo central del carbono de *Leucoagaricus gongylophorus* a partir de la degradación de pectina, celulosa y xilano.

En la Figura 8.3 se puede apreciar una representación esquemática de la red metabólica construida que cuenta con 58 reacciones y contempla las vías catabólicas presentes en *L. gongylophorus* para llevar a cabo la degradación de sustratos lignocelulósicos (Anexo A). La reconstrucción metabólica tiene como función representar

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

una descripción detallada del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus*, teniendo en cuenta el metabolismo de carbohidratos y la degradación de los sustratos pectina, xilano y celulosa, así como la síntesis del glucógeno.

La información ómica disponible en diferentes bases de datos como NCBI [Schoch *et al.*, 2020] y Uniprot [uni, 2021] acerca de *L. gongylophorus* es aún limitada por lo que la anotación de las reacciones metabólicas presentes en esta red fue realizada mediante inferencia basada en homología [Loewenstein *et al.*, 2009]. Los alineamientos de secuencias proteína-proteína realizados utilizando la herramienta BLASTp [Mahram and Herbordt, 2015] evidenciaron la presencia en *L. gongylophorus* de todas las reacciones incluidas en la Figura 8.3 (Anexo A). El 66 % de las reacciones anotadas presentaron una homología proteína-proteína superior al 60 % de identidad y conservan su dominio proteico de acción. Para las proteínas con % de identidad inferiores se llevó a cabo una búsqueda de dominios conservados para poder asignar la función por homología. La búsqueda fue restringida a las especies del género *Leucoagaricus* presentes en la base de datos de NCBI [Schoch *et al.*, 2020] y la distribución según especies fue la siguiente: 21 % de *L. gongylophorus*, 67 % *L. SymC.cos* y 11 % *L. leutothites*; cabe mencionar que el mayor número de proteínas reportadas para estas especies en esta base de datos es de 12,834 para *L. SymC.cos*, el cual es un hongo perteneciente al género *Leucoagaricus* que no se ha identificado hasta especie pero que si fue aislado como simbionte de la hormiga *Cyphomyrmex costatus*.

A continuación, analizaremos las principales características del modelo metabólico construido al nivel de las principales vías del metabolismo de producción de glucógeno durante el crecimiento en diferentes sustratos lignocelulósicos:

- Consumo de sustratos lignocelulósicos En este proyecto de investigación fueron utilizadas diversas fuentes de carbono para analizar la producción de glucógeno. Las vías de degradación de celulosa, pectina y xilano incluidas en este modelo se explican a continuación:

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Celulosa

Para el análisis del consumo de celulosa, la vía metabólica anotada fue tomada como referencia de los estudios realizados por [Vigueras *et al.*, 2017] quienes reportaron el crecimiento de *L. gongylophorus* en celulosa como fuente de carbono y además comprobaron la presencia de actividad enzimática endoglucanasa. Esta enzima es la encargada de la conversión de celulosa a celobiosa y presentó un 100 % de identidad con una endoglucanasa reportada para *Trametes versicolor*. La celobiosa es un dímero de glucosa, por lo que la formación de glucosa mediante una  $\beta$ -glucosidasa fue el siguiente paso en la construcción de la red metabólica planteada. Esta enzima también se encontró en *L. gongylophorus* con un 100 % de identidad.

### 2. Pectina

La degradación enzimática de pectina es llevada a cabo por diversos complejos proteicos heterólogos llamados pectinasas [Gomes *et al.*, 2009]. En la base de datos KEEG [Kanehisa and Sato, 2020] se encuentra reportada la vía metabólica anotada en nuestra reconstrucción que contempla la degradación a través de los intermediarios pectato y galacturonato. Por otro lado, Adalberto *et al.*, en 2016 demostraron el crecimiento en pectina y caracterizaron una exo poligalacturonasa de *L. gongylophorus*, simbionte de *Atta sexdens* [Adalberto *et al.*, 2016] aunque no reportaron secuencia de nucleótidos o aminoácidos. La homología encontrada utilizando herramientas bioinformáticas con enzimas de referencia ampliamente caracterizadas de *T. máxima* fue relativamente bajo con un valor de 42.54 % para la pectinestirasa incluida en la red metabólica y no se encontró homología con secuencia reportada para *L. gongylophorus* en la base de datos NCBI, sin embargo, fue encontrada en *L. SymC.cos*, simbionte de la hormiga *Cyphomyrmex costatus*; basados en estas evidencias teórico-experimentales y la presencia de dominios conservados fue anotada la reacción. Para los siguientes pasos catalíticos en la degradación de este sustrato fueron incluidas las enzimas endo y exo poligalacturonasa que presentaron homología de 68.87 % y 62.17 % con *L. gongylophorus* de acuerdo con los alineamientos presentados en el Anexo B.

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3. Xilano

Diversos investigadores han reportado el consumo de xilano como fuente de carbono para el crecimiento de diferentes especies de hongos y levaduras, algunos de estos microorganismos son: *A. niger*, *A. fumigatus*, *N. crassa*, *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. viride*, *P. janthinellum*, *P. wortmanni*, y *F. oxysporum* [Abdel Sater and El Said, 2001, Den Haan and Van Zyl, 2003].

De Menezes *et al.*, en 2009 utilizaron los hongos de pudrición blanca *Pleurotus sp.* BCCB068 y *Pleurotus thailandia* para degradar el xilano de avena-espelta bajo fermentación sumergida durante un período de 40 días [De Menezes *et al.*, 2009]. De esta forma determinaron las actividades de los productos de degradación del xilano en *Pleurotus sp.* BCCB068 y *P. thailandia*, tales como, endo 1,4- $\beta$ -xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas, alcanzando el 75,1 % y el 73,4 %, respectivamente. Por otro lado, Maya-Yescas *et al.* en 2021 reportaron el crecimiento de *L. gongylophorus* en xilano como sustrato en cultivos sumergidos, además de comprobar actividad enzimática xilanasas [Maya-Yescas *et al.*, 2021]. Estas evidencias experimentales fueron utilizadas para el análisis mediante alineamiento de secuencias de las principales enzimas encargadas de degradar xilano: endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y las  $\beta$ -D-xilosidasas [Den Haan and Van Zyl, 2003]. Utilizando enzimas de referencia de *Trametes versicolor* se obtuvieron porcentajes de identidad de 63 y 56 % para *L. gongylophorus* y dominios catalíticos conservados, lo que permitió adicionar estas reacciones de degradación de este compuesto a la red metabólica planteada en la Figura 8.3.

- Síntesis de glucógeno

La vía de síntesis de glucógeno anotada en esta red coincide con lo reportado para células eucariotas. La glucogenina (*gnn*) es la proteína iniciadora encargada de extender los primeros residuos de glucosa que actúan como cebador para la glucógeno sintasa (*gls*), que, a su vez, es la enzima encargada de elongar las cadenas de glucosa existentes transfiriendo un nuevo residuo de glucosa al

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

extremo reductor libre de la cadena [Farkas *et al.*, 1991, Roach and Skurat, 1997, Roach *et al.*, 2012], tal cual se muestra en la Figura 8.3.

Los alineamientos de secuencia realizados para las proteínas que intervienen en la síntesis de este polímero, como la proteína iniciadora glucogenina, la glucógeno sintasa (*gls*) y la enzima ramificadora (*glg*) se realizaron tomando como referencia la información disponible en la base de datos NCBI para el hongo filamentoso *Neurospora crassa* OR74A [Galagan *et al.*, 2003]. Los porcentajes de identidad obtenidos fueron de 41 %, 66 % y 68 % respectivamente involucrando a *L. SymC.cos*.

### ▪ Metabolismo central del carbono

Las vías metabólicas centrales de *L. gongylophorus* reportadas en esta construcción son: glicólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la ruta de las pentosas fosfato (PP) y diversas vías anapleróticas. Cuando la célula crece de forma exponencial en un sustrato, requiere poder reductor para obtener energía. Este poder reductor en la célula se presenta en forma de cofactores como el NADH y FADH<sub>2</sub> y generalmente se utilizan para generar ATP y suplir los demás requerimientos de energía de las células. El metabolismo central del carbono es el encargado de generar el poder reductor necesario en la célula, por tanto, la estequiometría de producción de estos compuestos depende del nivel del metabolismo central a la cual se incorporen los diversos sustratos utilizados y la vía metabólica que favorezca. Todas las reacciones pertenecientes al metabolismo central presentaron homología de secuencias con *L. gongylophorus*, estas reacciones se encuentran altamente conservadas evolutivamente por lo que existe poca variación interespecies [Peregrín-Álvarez *et al.*, 2009], esta afirmación se ve reflejada en los porcentajes de identidad obtenidos.

La síntesis del glucógeno comienza con el metabolito glucosa 6-fosfato que es un intermediario de la vía glicolítica/gluconeogénica [Pilkis *et al.*, 1988]. Al igual que muchos otros microorganismos, *L. gongylophorus* transforma celulosa en monómeros de glucosa y utiliza la vía glicolítica para obtener los restantes



## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

intermediarios involucrados en la síntesis de biomasa y glucógeno. La pectina se incorpora al metabolismo central al transformarse en glicerol, el cual es considerado un sustrato gluconeogénico [Nicol *et al.*, 2012], por lo que se incorpora a la vía gluconeogénica a partir de la formación de glicerol 3-fosfato, para a su vez formar precursores primordiales como glucosa 6-fosfato y fructosa-6-fosfato. Por otro lado, la utilización de sustratos como xilano, se incorporan al metabolismo al nivel de la vía de las pentosas fosfatos de forma tal que se obtienen los intermediarios de la síntesis de glucógeno mediante interconversión de hexosas y pentosas al formar glicerol-3-fosfato a partir de eritrosa 4-fosfato como se aprecia en la Figura 8.3.

Las enzimas que son esenciales para el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicos como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (EC 4.1.1.32), la piruvato carboxilasa (PC) (EC 6.4.1.1) y la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP) (EC 3.1.3.11) mostraron resultados satisfactorios en el alineamiento. La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa convierte el oxaloacetato intermediario del ciclo del TCA en fosfoenolpiruvato, sin pasar por el piruvato producido por la piruvato quinasa en el punto final de la glicólisis. La fructosa-1,6-bisfosfatasa, el paso final e irreversible en la formación de monofosfato de hexosa, convierte la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato, pasando la enzima glucolítica fosfofructoquinasa y la piruvato carboxilasa se encarga de la formación de oxalacetato que a su vez se incorpora al ciclo del TCA [Kubicek-Pranz *et al.*, 1990, Mlakar y Legisa, 2006]. Las otras enzimas necesarias son reversibles y se comparten con la glicólisis. Los resultados que indican la presencia de estas enzimas sugieren que *L. gongylophorus* puede ser capaz de crecer en presencia de sustratos gluconeogénicos como es el caso del glicerol. Además de que estas enzimas reponen los intermediarios de carbono utilizados en las vías biosintéticas y aseguran que el ciclo del TCA sea funcional.

Con los resultados anteriormente planteados se logra la obtención de la primera red metabólica realizada para *L. gongylophorus* teniendo en cuenta la síntesis de glucógeno

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a partir de la degradación de sustratos lignocelulósicos modelo y aportando información sobre las enzimas involucradas en cada reacción planteada.

### 8.4. Análisis de modos elementales.

Con base en lo propuesto en la reconstrucción de la red, el modelo realizado utilizando análisis de modos elementales contó con 48 reacciones, dada la simplicidad de algunas reacciones que fueron consideradas que involucran la acción de varias enzimas. De estas reacciones, 26 se clasificaron como reversibles y 22 como irreversibles, además se tuvo en cuenta la compartimentalización celular. Como resultado del análisis se obtuvieron 273 modos, de los cuales 107 estuvieron involucrados en la síntesis de glucógeno a partir de los sustratos modelos utilizados, por consiguiente, las enzimas involucradas en la síntesis de este compuesto estuvieron presentes en estos modos tal cual se muestra en la Tabla 8.5. El xilano (XIL) fue el sustrato más utilizado en la síntesis de glucógeno en este análisis, involucrando a 50 modos elementales e implicado con los otros sustratos utilizados en la síntesis de este polímero, en otros 26 modos. El segundo sustrato más utilizado fue la pectina (PEC) donde en 25 modos se utilizaron una cantidad de moles del sustrato en la síntesis del compuesto de interés, seguido por la celulosa (CLS) con 6 modos elementales.

A partir de lo anterior se seleccionaron los modos elementales con mayor rendimiento para cada sustrato, siendo mayor el rendimiento teórico glucógeno-xilosa con un valor de  $Y_{\text{glucógeno/xilosa}} = 2$  (mol glucógeno/mol xilosa). Los rendimientos obtenidos para los productos de degradación de los sustratos pectina y celulosa con respecto a la síntesis de glucógeno (Gly) fueron iguales con un valor de 0.5 (mol glucógeno/mol sustrato). Por otro lado, los rendimientos teóricos de producción de glucógeno obtenidos a partir del consumo de varios sustratos fueron menores con valores de 0.4 (mol glucógeno/mol sustrato) y 0.3 (mol glucógeno/mol sustrato) para pectina-xilano y celulosa-xilano respectivamente.

Este análisis ha sido utilizado por varios investigadores con diferentes objetivos, uno de ellos es el diseño racional de cepas con mejores capacidades metabólicas para la

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

producción de un metabolito, lo que también permite evaluar las condiciones óptimas de obtención de estos productos.

**Tabla 8.5:** Comportamiento de los modos elementales de mayor rendimiento teórico para cada sustrato.

No	Sustrato	Reacciones globales	Y*	Y**
29	PEC	1.16 GLN [e] + 59.5 Pi + 14 OG + 1.16 UTP = 0.58 Gly[e] + 7 ICIT + 24.5 SUC + 0.58 UDP	0.5	0.14
30	PEC	1.16 GLN [e] + 21 Pi + 14 OG + 1.16 UTP = 0.58 Gly[e] + 3.5 CO <sub>2</sub> + 21 SUC + 0.58 UDP		
93	PEC	1.06 GLN [e] + 105.8 Pi + 1.06 UTP = 0.53 Gly[e] + 6.41 ICIT + 9.62 SUC + 12.83 OG + 0.53 UDP		
96	PEC	GLN[e] + 12 ICIT + UTP = 0.5 Gly[e] + 9 CO <sub>2</sub> + 12 OG + 0.5 UDP		
165	CLS	GLU[e] + UTP = 0.5 Gly[e] + 0.5 UDP	0.5	0.39
14	XIL	2.4 Xyl[e] + 28.8 Pi + 12 OG + 9.59 UTP = 4.79 Gly[e] + 9.59 CO <sub>2</sub> + 12 SUC + 4.79 UDP	2.0	1.96
210	PEC + XIL	GLN [e] + 0.5 Xyl[e] + Pi + 2.5 ICIT + 1.25 UTP = 0.62 Gly[e] + 2 CO <sub>2</sub> [e] + 2.5 OG + 0.62 UDP	0.4	-
54	CLS + XIL	13GLU[e] + 3.25Xyl[e] + 13Pi + 6.5ICIT + 3.25OG + 9.75 UTP = 4.87 Gly[e] + 22.7SUC + 4.87UDP	0.3	-

\*Y<sub>P/S</sub>(mol/mol) teóricos; \*\*Y<sub>P/S</sub>(mol/mol) experimentales.

Carlson *et al.*, 2002 por ejemplo utilizaron este análisis para estudiar un modelo de vías metabólicas de un sistema recombinante de *S. cerevisiae* que fue diseñado genéticamente para producir el compuesto poli-β-hidroxibutirato (PHB). Las reacciones en la red realizada por estos investigadores conectan la producción y/o consumo de ocho metabolitos externos que incluyen glucosa, acetato, succinato, PHB, CO<sub>2</sub>, glicerol, etanol y trifosfato de adenosina (ATP), de forma tal que el análisis de modos elementales del sistema de referencia arrojó 241 reacciones que combinan a los ocho metabolitos. Sin embargo, al incluir las vías características de la cepa recombinante de *S. cerevisiae* y alterar el modelo propiciando las condiciones donde el PHB se acumula, el análisis reveló 20 modos elementales, de los cuales 7 producen PHB con un rendimiento teórico

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PHB/carbono de 0.67 ( $Cmol/Cmol$ ) [Carlson *et al.*, 2002]. Esta investigación resulta similar a la nuestra en el sentido de que se enfoca en la evaluación de un sistema eucarionte y en la producción de un metabolito a partir del consumo de diferentes sustratos. Sin embargo, los estudios enfocados en el uso de análisis de modo elemental son escasos para hongos filamentosos, lo que reafirma la importancia de su utilización en este trabajo.

Chen *et al.*, en 2010 utilizaron análisis de modos elementales para analizar el potencial metabólico del glicerol como fuente de carbono durante la producción de succinato en condiciones anaeróbicas o aeróbicas utilizando como modelo la bacteria *E. coli* [Chen *et al.*, 2010]. Estos investigadores llegaron a la conclusión de que, aunque los rendimientos máximos teóricos de succinato en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas son de 1.0 mol/mol de glicerol, la condición aeróbica era más favorable para la producción de succinato debido que la presencia de oxígeno impactaba positivamente en la estructura de la red. Li *et al.*, en 2012 construyeron una red metabólica de una cepa de *Bacillus subtilis* productora de isobutanol para EMA [Li *et al.*, 2012]. Como resultado de este análisis se examinaron 239 modos elementales (EM) de un total de 11.342 EM para la predicción de posibles objetivos. Sobre esta base, se predijo que la lactato deshidrogenasa (LDH) y el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC) eran los candidatos de inactivación más prometedores para la producción óptima de isobutanol y de esta forma se construyeron experimentalmente las mutantes diseñadas *in silico*. En ambos casos EMA se empleó como una herramienta de guía para dirigir la mejora racional de cepas y se demostró la racionalidad y precisión de este enfoque a partir de la coherencia entre la predicción del modelo y los resultados experimentales.

Como se aprecia en la Tabla 8.5 varios modos elementales que involucran a la pectina, obtuvieron el mismo rendimiento teórico producto-sustrato  $Y (p/s)$ . Sin embargo, existen modos elementales que no involucran al  $CO_2$  en la producción de glucógeno lo que significa que no existe pérdida de carbono en el sistema por esta vía, lo que podría ser indicativo de que el total del carbono consumido es canalizado a la síntesis de glucógeno. Diferencias estequiométricas entre modos elementales pueden significar que moles de los sustratos estén siendo utilizados en descarboxilaciones que impactan en la

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

formación de biomasa; sin embargo, esta es una hipótesis que necesita seguir siendo estudiada con otras aproximaciones debido a que en este modelo no se pudo considerar la formación de biomasa entre sus reacciones por la poca información experimental respecto a la composición de macromoléculas de la biomasa de este hongo en condiciones de crecimiento como las llevadas a cabo en este estudio.

Por otro lado, se puede observar la obtención de rendimientos  $Y_{P/S}$  ( $mol/mol$ ) calculados a partir de la red metabólica construida y el análisis de modos elementales. Estos rendimientos consideran la vía óptima de conversión de sustrato a producto en relación con los moles de cada uno presentes en las reacciones involucradas. Como parte de la validación experimental de estas simulaciones fueron calculados los  $Y_{P/S}(mol/mol)$  a partir del glucógeno cuantificado para las diferentes fuentes de carbono y presentados anteriormente en la sección 8.1.1, los valores obtenidos se ven reflejados en la Tabla 8.5.

Cabe señalar que para en el cálculo de los  $Y_{P/S}$  no se tuvo en consideración el 100 % de carbono presente en el medio, solamente fue tomado en cuenta el carbono libre que de acuerdo con el rendimiento  $Y_{X/S}$  calculado no fue utilizado para la formación de biomasa. Esta consideración fue realizada debido a que el modelo metabólico realizado no presenta una ecuación de biomasa que permita analizar la partición del carbono hacia biomasa y producto, por lo que, al no considerar la formación de biomasa, sobrestima el rendimiento de glucógeno estimado al formar un solo producto. Con base en lo anteriormente planteado, fueron utilizadas las diferentes cantidades de sustrato para el cálculo de los rendimientos, las mismas fueron: 0.38 g para CMC, 0.27 para xilano y 0.46 para pectina. Los resultados de las simulaciones corresponden con los datos obtenidos en el laboratorio dentro de un error del 2 % cuando se comparan los rendimientos de xilano y 22 % para los rendimientos obtenidos para celulosa. Estos resultados se encuentran dentro de un nivel aceptable para la validación de modelos experimentales [Dauner *et al.*, 2002]. El xilano como fuente de carbono permitió obtener los mayores rendimientos teóricos como experimentales, afirmación sostenida en la validación presentada en la Tabla 8.5. Esta fuente de carbono fue la que mostró mayores rendimientos experimentales y además fue la que representó un mejor balance de carbono, lo que permitió obtener estos valores de rendimientos. En el caso particular de

## Capítulo VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la pectina el error obtenido en la predicción fue del 72 %, esta amplia diferencia puede deberse al balance de carbono presentado anteriormente donde se pudo apreciar que es la fuente de carbono que peor aprovecha el mismo. De acuerdo con los metabolitos cuantificados en este trabajo y debido a que se tomó en consideración que el resto del carbono presente en el medio podía ser canalizado a la síntesis de glucógeno el modelo no puede reflejar con precisión la formación a partir de pectina.

Como parte del análisis de modos elementales es posible conocer qué enzimas participan en cada EM y de esta forma representar en la red metabólica los caminos de reacciones enzimáticas que participan en cada modo. De esta manera la Figura 8.4 representa con flechas de colores los estados óptimos de operación de la red (vías) utilizados por los modos elementales con mayor rendimiento teórico que involucraron a los sustratos pectina, celulosa y xilano. Se puede observar cómo la glucosa proveniente de la degradación de la celulosa toma el camino más corto para incorporarse a la vía de síntesis del glucógeno, una vez que los monómeros de glucosa se incorporan a la glicólisis, la acción de la enzima hexoquinasa (*hk*) cataliza la reacción donde se obtiene el metabolito glucosa-6-fosfato, para luego por acción de la fosfoglucomutasa (*pgm*) formar glucosa-1-fosfato y este último incorporarse a la vía de síntesis del glucógeno. La xilosa proveniente del xilano por otro lado se incorpora a la vía de las pentosas fosfato por la inclusión de la xilulosa-5-fosfato a esta vía. Luego del transcurso de este intermediario por la PP se genera gliceraldehído-3-fosfato, el cual, por la acción de las enzimas que participan en la gluconeogénesis (*fpa,fbp*) se incorporan a la vía de síntesis del glucógeno.

Por otro lado, los residuos de ácido galacturónico, producto de la degradación de la pectina se transforman luego de una serie de reacciones en galacturonato, que es el metabolito que entra a la célula. Una vez dentro el galacturonato es convertido en glicerol luego de una serie de reacciones enzimáticas, este último se incorpora la vía gluconeogénica hasta formarse glucosa-6-fosfato y dirigirse a la síntesis de glucógeno.

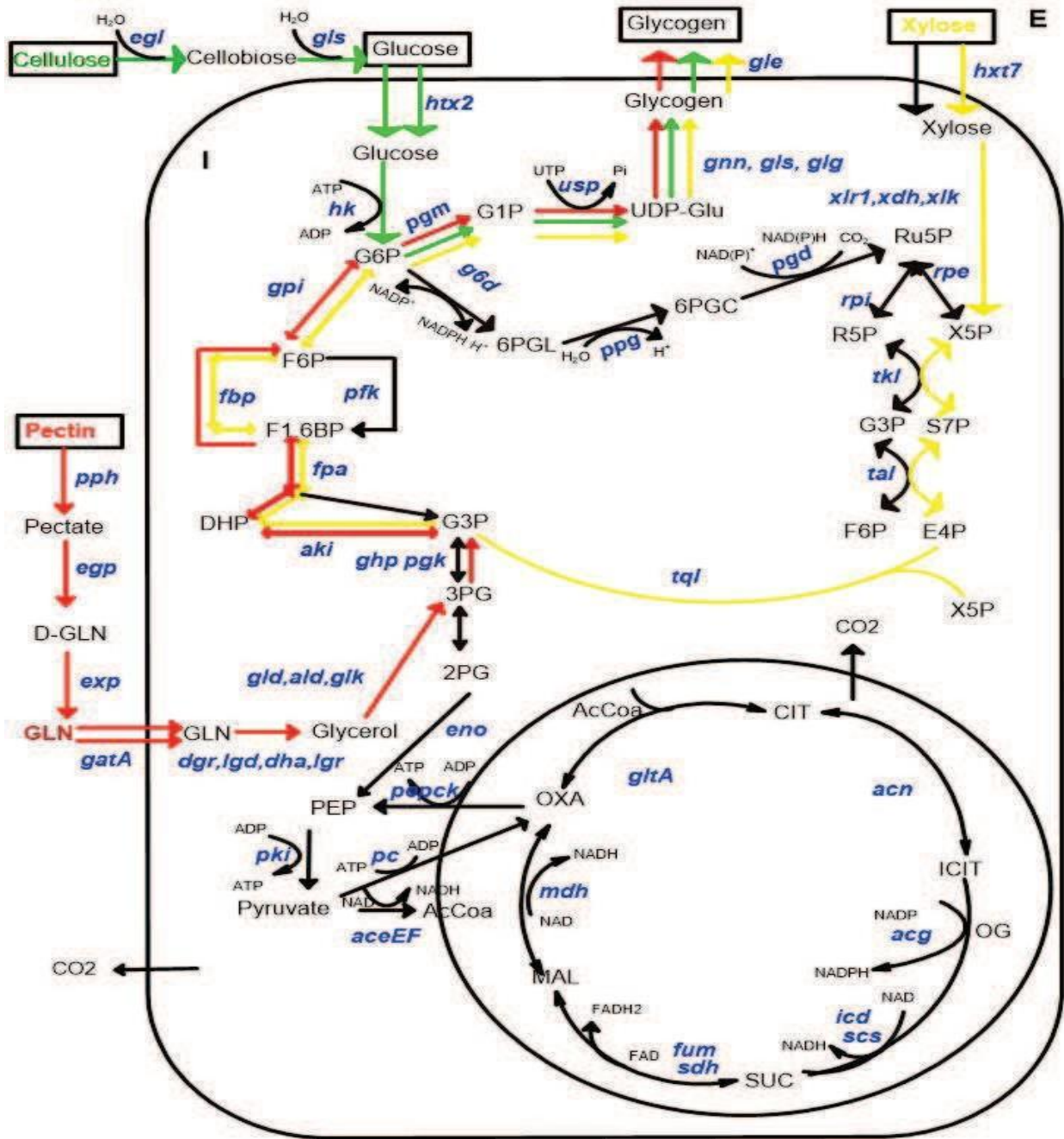


Figura 8.4: Representación gráfica de los modos elementales (flechas de colores) utilizados por los sustratos pectina, celulosa y xilano en la síntesis de glucógeno realizada por *L. gongylophorus*.



## Capítulo IX. CONCLUSIONES

El hongo *L. gongylophorus* LEU18496 fue capaz de crecer en los tres sustratos lignocelulósicos modelo, alcanzando rendimientos biomasa-sustrato iguales a  $Y_{biomasa/xilano} = 0.73$  (g biomasa/g xilano),  $Y_{Biomasa/CMC} = 0.62$  (g biomasa/g CMC) y  $Y_{biomasa/pectina} = 0.44$  (g biomasa/g pectina) para cada fuente de carbono utilizada. El xilano fue el sustrato más eficiente en la formación de biomasa y la pectina el que menos favoreció la obtención de este producto. Por otro lado, la mayor acumulación de CO<sub>2</sub> se obtuvo durante el crecimiento en 20 g/L de carboximetilcelulosa, mientras que en 10 g/L la mayor concentración se obtuvo en los cultivos que contenían pectina como única fuente de carbono. La producción de glucógeno se determinó en los tres sustratos lignocelulósicos modelos utilizados, obteniéndose el mayor contenido de glucógeno por gramos de biomasa seca ( $Y_{mgGlucógeno/gBiomasa} = 220.9$ ) para los cultivos que crecieron en xilano. Las concentraciones de glucógeno determinadas para cada fuente de carbono se encuentran en el rango de lo observado en hongos filamentosos que degradan la lignocelulosa.

Se observó la presencia de actividades enzimáticas pectinasa, endo- $\beta$ -1.4-xilanasas y endo- $\beta$ -1.4-glucacanasas en todas las fuentes de carbono analizadas luego de 28 días de cultivo. La actividad pectinasa, xilanasas y endoglucanasas alcanzaron valores máximos de 264.09 mU, 25.56 mU y 23.55 mU respectivamente en el sustrato pectina, demostrando que este último es un sustrato importante a tener en cuenta en la síntesis de este tipo de enzimas. El análisis de enzimas CAZymes y FOLymes resultaron en la anotación de 169 proteínas en el genoma de *L. gongylophorus* siendo mayor las proteínas incluidas en el grupo CAZymes con 128 proteínas en total mientras que sólo 36 se encontraron en el grupo FOLymes. Por otro lado, el análisis filogenético realizado al grupo de proteínas CAZymes permitió reportar la congruencia, así como, las relaciones de discordancia entre las secuencias de proteínas de diferentes especies de hongos con *L. gongylophorus*, además, de reflejar las asociaciones taxonómicas entre hongos estrechamente relacionados de acuerdo con diversos parámetros, como el consumo de sustratos lignocelulósicos.



## Capítulo IX. CONCLUSIONES

Fue construida una red del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* que cuenta con 58 reacciones e incluye las vías metabólicas encargadas de degradar los sustratos lignocelulósicos pectina, celulosa y xilano; además de una ruta para la síntesis de glucógeno. Con la realización de esta red se logra la obtención de la primera red metabólica realizada para *L. gongylophorus* teniendo en cuenta la síntesis de glucógeno a partir de la degradación de sustratos lignocelulósicos modelo. El análisis de modos elementales arrojó que el mayor  $Y_{p/s}$  teórico obtenido se alcanzó al utilizar xilano como fuente de carbono con un  $Y_{p/s}$  de 2 mol/mol. La cuantificación experimental de glucógeno permitió validar este resultado al demostrar los mayores rendimientos  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/s}$  cuando se utilizaba xilano como fuente de carbono.

## Capítulo X. PERSPECTIVAS

Para continuar el desarrollo de este trabajo es necesario aumentar el número de estudios que permitan la obtención de parámetros cinéticos como velocidad específica de crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos. Esto último con el objetivo de determinar con mayor precisión los rendimientos que intervienen en el sistema. Además, sería ideal incluir una ecuación de biomasa al modelo metabólico utilizando análisis de modos elementales con el objetivo de mejorar la calidad de las predicciones realizadas y de esta forma comparar la producción de glucógeno en nuevos escenarios metabólicos de competencia. Desde una perspectiva de aprovechamiento industrial, sería necesario realizar ensayos de producción de glucógeno utilizando sustratos como glicerol, bagazo de caña y pasto para de esta forma disminuir los costos de producción y aumentar el aprovechamiento de ciertos desechos.

## REFERENCIAS

- [Uni, 2021] (2021). Uniprot: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1): D480–D489.
- [Abdel Sater and El Said, 2001] Abdel Sater, M. and El Said, A. (2001). Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International biodeterioration & biodegradation*, 47(1):15–21.
- [Abdulridha and Jebur, 2020] Abdulridha, D. A. and Jebur, H. A. (2020). Isolation and identification of local isolate of bacillus subtilis produced polygalacturonase from rotten apple. *Plant Archives*, 20(1):2277–2284.
- [Adalberto *et al.*, 2016] Adalberto, P. R., Golfeto, C. C., Moreira, A. C., Almeida, F. G., Ferreira, D., Cass, Q. B., and Souza, D. H. (2016). Characterization of an exopolygalacturonase from *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of *atta sexdens*. *Advances in Enzyme Research*, 4(1):7–19.
- [Ali *et al.*, 2012] Ali, H., Hashem, M., Shaker, N., Ramadan, M., El-Sadek, B., and Hady, M. A. (2012). Cellulase enzyme in bio-finishing of cotton-based fabrics: effects of process parameters. *Research Journal of Textile and Apparel*.
- [Anwar *et al.*, 2014] Anwar, Z., Gulfranz, M., and Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(2):163–173.
- [Aragona *et al.*, 2014] Aragona, M., Minio, A., Ferrarini, A., Valente, M. T., Bagnaresi, P., Orru, L., Tononi, P., Zamperin, G., Infantino, A., Vale, G., *et al.* (2014). De novo genome assembly of the soil-borne fungus and tomato pathogen *pyrenochaeta lycopersici*. *BMCgenomics*, 15(1):1–12.
- [Area, 2016] Area, Maria Cristina y Vallejos, M. E. (2016). Bio-productos y bio-materiales a partir de la biorrefineria de residuos agro y forestoindustriales. *Panorama De La Industria*

## REFERENCIAS

*De Celulosa Y Papel Y Materiales Lignocelulosicos, 1st ed., Universidad Nacional de Misiones, pages 2016120–150.*

- [Aylward *et al.*, 2013] Aylward, F. O., Burnum-Johnson, K. E., Tringe, S. G., Teiling, C., Tremmel, D. M., Moeller, J. A., Scott, J. J., Barry, K. W., Piehowski, P. D., Nicora, C. D., *et al.* (2013). *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12):3770–3778.
- [Bacci Jr *et al.*, 2013] Bacci Jr, M., Bueno, O. C., Rodrigues, A., Pagnocca, F. C., Somera, A. F., and Silva, A. (2013). A metabolic pathway assembled by enzyme selection may support herbivory of leaf-cutter ants on plant starch. *Journal of insect physiology*, 59(5):525–531.
- [Badaruddin *et al.*, 2013] Badaruddin, M., Holcombe, L. J., Wilson, R. A., Wang, Z.-Y., Kershaw, M. J., and Talbot, N. J. (2013). Glycogen metabolic genes are involved in trehalose- 6-phosphate synthase-mediated regulation of pathogenicity by the rice blast fungus *magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 9(10):e1003604.
- [Badger *et al.*, 2002] Badger, P. *et al.* (2002). Ethanol from cellulose: a general review. *Trends in new crops and new uses*, 14:17–21.
- [Barke *et al.*, 2010] Barke, J., Seipke, R. F., Gruschow, S., Heavens, D., Drou, N., Bibb, M. J., Goss, R. J., Douglas, W. Y., and Hutchings, M. I. (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *acromyrmex octospinosus*. *BMC biology*, 8(1):1–10.
- [Beg *et al.*, 2001] Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3):326–338.
- [Behera *et al.*, 2017] Behera, B., Sethi, B., Mishra, R., Dutta, S., and Thatoi, H. (2017). Microbial cellulases diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1):197–210.

## REFERENCIAS

- [Beuster *et al.*, 2011] Beuster, G., Zarse, K., Kaleta, C., Thierbach, R., Kiehntopf, M., Steinberg, P., Schuster, S., and Ristow, M. (2011). Inhibition of alanine aminotransferase in silico and in vivo promotes mitochondrial metabolism to impair malignant growth. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25):22323–22330.
- [Bilal *et al.*, 2017] Bilal, M., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., and Iqbal, H. M. (2017). Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants a review. *Science of the Total Environment*, 576:646–659.
- [Birch *et al.*, 2003] Birch, C., Robertson, M., Humphreys, E., and Hutchins, N. (2003). Agronomy of maize in australia in review and prospect.
- [Blanchette *et al.*, 2004] Blanchette, R. A., Held, B. W., Jurgens, J. A., McNew, D. L., Harrington, T. C., Duncan, S. M., and Farrell, R. L. (2004). Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3):1328–1335.
- [Blumenthal, 1976] Blumenthal, H. (1976). Reserve carbohydrates in fungi. *Filamentous Fungi (USA)*.
- [Brener and Ruggiero, 1994] Brener, A. G. F. and Ruggiero, A. (1994). Leaf-cutting ants (*atta* and *acromyrmex*) inhabiting argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. *Journal of Biogeography*, pages 391–399.
- [Bugg *et al.*, 2011] Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., and Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural product reports*, 28(12):1883–1896.
- [Cameron *et al.*, 1988] Cameron, S., Levin, L., Zoller, M., and Wigler, M. (1988). camp-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *s. cerevisiae*. *Cell*, 53(4):555–566.
- [Cannon *et al.*, 1994] Cannon, J. F., Pringle, J. R., Fiechter, A., and Khalil, M. (1994).

## REFERENCIAS

- Characterization of glycogen-deficient glc mutants of *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 136(2):485–503.
- [Carlson *et al.*, 2002] Carlson, R., Fell, D., and Sreenc, F. (2002). Metabolic pathway analysis of a recombinant yeast for rational strain development. *Biotechnology and bioengineering*, 79(2):121–134.
- [Casa Villegas, 2018] Casa Villegas, M. F. (2018). *Caracterizacion de glicosidasas y permeasas fungicas implicadas en el transporte y metabolismo de azucares*. PhD thesis, Universitat Politecnica de Valencia.
- [Caspi *et al.*, 2007] Caspi, R., Foerster, H., Fulcher, C. A., Kaipa, P., Krummenacker, M., Latendresse, M., Paley, S., Rhee, S. Y., Shearer, A. G., Tissier, C., *et al.* (2007). The metacyc database of metabolic pathways and enzymes and the biocyc collection of pathway/genomedatabases. *Nucleic acids research*, 36(suppl\_1):D623–D631.
- [Chandel *et al.*, 2012] Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Silva, M. B., and Silverio da Silva, S. (2012). The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical reviews in biotechnology*, 32(3):187–202.
- [Chen *et al.*, 2010] Chen, Z., Liu, H., Zhang, J., and Liu, D. (2010). Elementary mode analysis for the rational design of efficient succinate conversion from glycerol by *escherichia coli*. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2010.
- [Cheng *et al.*, 1995] Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M. G., and Roach, P. J. (1995). Requirement of the self-glucosylating initiator proteins glg1p and glg2p for glycogen accumulation in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12):6632–6640.
- [Cherry and Fidantsef, 2003] Cherry, J. R. and Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology*, 14(4):438–443.
- [Chevenet *et al.*, 2006] Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.-L., Jacq, B., and Christen, R. (2006). Treedyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC*

## REFERENCIAS

*bioinformatics*, 7(1):1–9.

- [Coblentz and Van Bael, 2013] Coblentz, K. E. and Van Bael, S. A. (2013). Field colonies of leaf-cutting ants select plant materials containing low abundances of endophytic fungi. *Ecosphere*, 4(5):1–10.
- [Coenen *et al.*, 2007] Coenen, G., Bakx, E., Verhoef, R., Schols, H., and Voragen, A. (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnoga-lacturonan type i. *Carbohydrate polymers*, 70(2):224–235.
- [Cornejo *et al.*, 2019] Cornejo, A., Alegria-Dallo, I., García-Yoldi, I., Sarobe, I., Sánchez, D., Otazu, E., Funcia, I., Gil, M. J., and Martínez-Merino, V. (2019). Pretreatment and enzymatic hydrolysis for the efficient production of glucose and furfural from wheat straw, pine and poplar chips. *Bioresource technology*, 288:121583.
- [Crawford *et al.*, 2004] Crawford, A. C., Krickler, J. A., Anderson, A. J., Richardson, N. R., and Mather, P. B. (2004). Structure and function of a cellulase gene in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Gene*, 340(2):267–274.
- [Dai *et al.*, 2015] Dai, Y., Si, M., Chen, Y., Zhang, N., Zhou, M., Liao, Q., Shi, D., and Liu, Y. (2015). Combination of biological pretreatment with NaOH/urea pretreatment at cold temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource technology*, 198:725–731.
- [Dauner *et al.*, 2002] Dauner, M., Sonderegger, M., Hochuli, M., Szyperski, T., Wuthrich, K., Hohmann, H.-P., Sauer, U., and Bailey, J. E. (2002). Intracellular carbon fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis* during growth on two-carbon substrate mixtures. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4):1760–1771.
- [David *et al.*, 2003] David, H., Aakesson, M., and Nielsen, J. (2003). Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 270(21):4243–4253.
- [De Menezes *et al.*, 2009] De Menezes, C. R., Silva, I. S., Pavarina, E. C., Dias, E. F. G.,

## REFERENCIAS

- Dias, F. G., Grossman, M. J., and Durrant, L. R. (2009). Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by the white-rot fungi pleurotus. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(6):673–678.
- [de Paula *et al.*, 2005] de Paula, R. M., Wilson, W. A., Terenzi, H. F., Roach, P. J., and Bertolini, M. C. (2005). Gnn is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogenbiosynthesis in neurospora crassa. *Archives of biochemistry and biophysics*, 435(1):112–124.
- [Den Haan and Van Zyl, 2003] Den Haan, R. and Van Zyl, W. (2003). Enhanced xylan degradation and utilisation by pichia stipitis overproducing fungal xylanolytic enzymes. *Enzyme and microbial technology*, 33(5):620–628.
- [Dereeper *et al.*, 2008] Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., *et al.* (2008). Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(suppl\_2):W465– W469.
- [Díaz *et al.*, 2011] Díaz, R., Alonso, S., Sánchez, C., Tomasini, A., Bibbins-Martínez, M., and Díaz-Godínez, G. (2011). Characterization of the growth and laccase activity of strains of pleurotus ostreatus in submerged fermentation. *BioResources*, 6(1):282–290.
- [Díaz-Godínez *et al.*, 2001] Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., and Viniegra-González, G. (2001). Exopectinases produced by aspergillus niger in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(5):271–275.
- [Diniz *et al.*, 2006] Diniz, S. C., Voss, I., and Steinbuchel, A. (2006). Optimization of cyanophycin production in recombinant strains of pseudomonas putida and ralstonia eutropha employing elementary mode analysis and statistical experimental design. *Biotechnology and bioengineering*, 93(4):698–717.
- [do Nascimento *et al.*, 2017] do Nascimento, M. O., de Almeida Sarmiento, R., Dos



## REFERENCIAS

- Santos, G. R., de Oliveira, C. A., and de Souza, D. J. (2017). Antagonism of trichoderma isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (singer) moller. *Journal of basic microbiology*, 57(8):699–704.
- [Dos Santos *et al.*, 2013] Dos Santos, C., Zanetti, R., De Oliveira, D. F., Gajo, G. C., and Alves, D. S. (2013). Plant derived products for leaf-cutting ants control. *Insecticides-Development of Safer and More Effective Technologies*.
- [Duarte *et al.*, 2007] Duarte, N. C., Becker, S. A., Jamshidi, N., Thiele, I., Mo, M. L., Vo, T. D., Srivas, R., and Palsson, B. O. (2007). Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6):1777–1782.
- [Ebringerova, 2005] Ebringerova, A. (2005). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In *Macromolecular symposia*, volume 232, pages 1–12. Wiley Online Library.
- [Edgar, 2004] Edgar, R. C. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5):1792–1797.
- [Espinoza *et al.*, 2017] Espinoza, C., Zavala Izquierdo, I., Couttolenc, A., Landa-Cadena, G., Valenzuela, J., and Trigoso, A. (2017). In vitro isolation and identification of *Leucoagaricus gongylophorus* from *atta mexicana* (hymenoptera: Formicidae) fungal garden. *Revista mexicana de micología*, 46:3–8.
- [Ezekiel *et al.*, 2010] Ezekiel, O. O., Aworh, O. C., Blaschek, H. P., and Ezeji, T. C. (2010). Protein enrichment of cassava peel by submerged fermentation with trichoderma viride (atcc36316). *African Journal of Biotechnology*, 9(2).
- [Farkas *et al.*, 1991] Farkas, I., Hardy, T. A., Goebel, M., and Roach, P. J. (1991). Two glycogen synthase isoforms in *saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. *Journal of Biological Chemistry*, 266(24):15602–15607.

## REFERENCIAS

- [Fell, 1992] Fell, D. A. (1992). Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochemical Journal*, 286(2):313–330.
- [Felsenstein, 1993] Felsenstein, Joseph y Kishino, H. (1993). Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? a reply to hillis and bull. *Systematic Biology*, 42(2):193–200.
- [Felsenstein, 1985] Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4):783–791.
- [Figueiredo *et al.*, 2010] Figueiredo, A., Evtuguin, D., and Saraiva, J. (2010). Effect of high pressure treatment on structure and properties of cellulose in eucalypt pulps. *Cellulose*, 17(6):1193–1202.
- [Figuerola-Espinoza *et al.*, 2002] Figuerola-Espinoza, M.-C., Poulsen, C., Borch Soe, J., Zargahi, M. R., and Rouau, X. (2002). Enzymatic solubilization of arabinoxylans from isolated rye pentosans and rye flour by different endo-xylanases and other hydrolyzing enzymes. effect of a fungal laccase on the flour extracts oxidative gelation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22):6473–6484.
- [Filippov and Kohn, 1975] Filippov, M. and Kohn, R. (1975). Determination of the esterification degree of carboxyl groups of pectin with methanol by means of infrared spectroscopy. *Chem. Zvesti*, 29(1):88–91.
- [Forster *et al.*, 2003] Forster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. O., and Nielsen, J. (2003). Genome-scale reconstruction of the *saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome research*, 13(2):244–253.
- [Galagan *et al.*, 2003] Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S., Purcell, S., *et al.* (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934):859–868.

## REFERENCIAS

- [Galbe and Zacchi, 2002] Galbe, M. and Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(6):618–628.
- [Gao *et al.*, 2010] Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W.-M., and Liang, H. (2010). A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical reviews in biotechnology*, 30(1):70–77.
- [García-Ochoa *et al.*, 2010] García-Ochoa, F., Gómez, E., Santos, V. E., and Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochemical engineering journal*, 49(3):289–307.
- [Girio *et al.*, 2010] Girio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., and Bogel Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13):4775–4800.
- [Gomes *et al.*, 2009] Gomes, E., Leite, R. S. R., Da Silva, R., and Silva, D. (2009). Purification of an exopolygalacturonase from *penicillium viridicatum* rfc3 produced in submerged fermentation. *International journal of microbiology*, 2009.
- [Gomes De Siqueira *et al.*, 1998] Gomes De Siqueira, C., Bacci Jr, M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., and Hebling, M. J. A. (1998). Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *atta sexdens* I. *Applied and environmental microbiology*, 64(12):4820–4822.
- [González-Márquez *et al.*, 2015] González-Márquez, A., Ahuactzin-Pérez, M., and Sánchez, C. (2015). *Lentinula edodes* grown on di (2-ethylhexyl) phthalate-containing media: mycelial growth and enzyme activities. *BioResources*, 10(4):7898–7906.
- [González Ocampo, 2018] González Ocampo, B. G. (2018). Capacidad antagónica de *trichoderma* spp en el biocontrol del hongo *Leucoagaricus gongylophorus* de la hormiga arriera (*atta cephalotes* I.) en el cultivo de palma aceitera.
- [Goodell *et al.*, 2008] Goodell, B., Qian, Y., and Jellison, J. (2008). Fungal decay of wood: soft rot—brown rot—white rot. ACS Publications.

## REFERENCIAS

- [Gu *et al.*, 2012] Gu, F., Yang, L., Jin, Y., Han, Q., Chang, H.-m., Jameel, H., and Phillips, R. (2012). Green liquor pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 124:299–305.
- [Haggart *et al.*, 2011] Haggart, C. R., Bartell, J. A., Saucerman, J. J., and Papin, J. A. (2011). Whole-genome metabolic network reconstruction and constraint-based modeling. *Methods in enzymology*, 500:411–433.
- [Hamed, 2013] Hamed, S. A. M. (2013). In-vitro studies on wood degradation in soil by softrot fungi: *Aspergillus niger* and *penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78:98–102.
- [Hansen and Plackett, 2008] Hansen, N. M. and Plackett, D. (2008). Sustainable films and coatings from hemicelluloses: a review. *Biomacromolecules*, 9(6):1493–1505.
- [Hasunuma *et al.*, 2013] Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., and Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource technology*, 135:513–522.
- [Hatakka, 1994] Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS microbiology reviews*, 13(2-3):125– 135.
- [Heaton *et al.*, 2004] Heaton, E. A., Long, S. P., Voigt, T. B., Jones, M. B., and Clifton-Brown, J. (2004). Miscanthus for renewable energy generation: European union experience and projections for illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9(4):433–451.
- [Henry *et al.*, 2010] Henry, C. S., DeJongh, M., Best, A. A., Frybarger, P. M., Linsay, B., and Stevens, R. L. (2010). High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nature biotechnology*, 28(9):977–982.

## REFERENCIAS

- [Hofrichter, 2001] Hofrichter, M. (2001). *Biopolymers, lignin, humic substances and coal*, volume 1. Wiley-Blackwell.
- [Hosseini, 2019] Hosseini, M. (2019). *Advanced bioprocessing for alternative fuels, biobased chemicals, and bioproducts: technologies and approaches for scale-up and commercialization*. Academic Press.
- [Huber *et al.*, 2012] Huber, T., Mussig, J., Curnow, O., Pang, S., Bickerton, S., and Staiger, M. P. (2012). A critical review of all-cellulose composites. *Journal of Materials Science*, 47(3):1171–1186.
- [Huerta-Cepas *et al.*, 2019] Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., *et al.* (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic acids research*, 47(D1):D309–D314.
- [Huy *et al.*, 2015] Huy, N. D., Le Nguyen, C., Seo, J.-W., Kim, D.-H., and Park, S.-M. (2015). Putative endoglucanase pcgh5 from phanerochaete chrysosporium is a  $\beta$ -xylosidase that cleaves xylans in synergistic action with endo-xylanase. *Journal of bioscience and bio-engineering*, 119(4):416–420.
- [Ike *et al.*, 2015] Ike, P. T. L., Moreira, A. C., de Almeida, F. G., Ferreira, D., Birololi, W. G., Porto, A. L. M., and Souza, D. H. F. (2015). Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. *SpringerPlus*, 4(1):1–11.
- [Ioelovich, 2008] Ioelovich, M. (2008). Cellulose as a nanostructured polymer: a short review. *BioResources*, 3(4):1403–1418.
- [Jayani *et al.*, 2005] Jayani, R. S., Saxena, S., and Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9):2931–2944.
- [Jones *et al.*, 1992] Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*,

## REFERENCIAS

8(3):275–282.

- [Jorgensen *et al.*, 2005] Jorgensen, H., Morkeberg, A., Krogh, K. B., and Olsson, L. (2005). Production of cellulases and hemicellulases by three penicillium species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1):42–48.
- [Kamp, 2006] Kamp, Axel von y Schuster, S. (2006). Metatool 5.0: fast and flexible elementary modes analysis. *Bioinformatics*, 22(15):1930–1931.
- [Kanehisa and Goto, 2000] Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). Kegg: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1):27–30.
- [Kanehisa and Sato, 2020] Kanehisa, M. and Sato, Y. (2020). Kegg mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, 29(1):28–35.
- [Karp *et al.*, 2002] Karp, P. D., Riley, M., Saier, M., Paulsen, I. T., Collado-Vides, J., Paley, S. M., Pellegrini-Toole, A., Bonavides, C., and Gama-Castro, S. (2002). The ecocyc database. *Nucleic acids research*, 30(1):56–58.
- [Kiiskinen *et al.*, 2004] Kiiskinen, L.-L., Ratto, M., and Kruus, K. (2004). Screening for novellaccase-producing microbes. *Journal of applied microbiology*, 97(3):640–646.
- [Kikas *et al.*, 2016] Kikas, T., Tutt, M., Raud, M., Alaru, M., Lauk, R., and Olt, J. (2016). Basis of energy crop selection for biofuel production: Cellulose vs. lignin. *International Journal of Green Energy*, 13(1):49–54.
- [Klamt, 2003] Klamt, Steffen y Stelling, J. (2003). Two approaches for metabolic pathway analysis. *Trends in biotechnology*, 21(2):64–69.
- [Kromer *et al.*, 2006] Kromer, J. O., Wittmann, C., Schroder, H., and Heinzle, E. (2006). Metabolic pathway analysis for rational design of l-methionine production by escherichia coli and corynebacterium glutamicum. *Metabolic engineering*, 8(4):353–369.

## REFERENCIAS

- [Kubicek-Pranz *et al.*, 1990] Kubicek-Pranz, E. M., Mozelt, M., Rohr, M., and Kubicek, C. P. (1990). Changes in the concentration of fructose 2, 6-bisphosphate in *aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1033(3):250–255.
- [Kumar *et al.*, 2007] Kumar, V. S., Dasika, M. S., and Maranas, C. D. (2007). Optimization based automated curation of metabolic reconstructions. *BMC bioinformatics*, 8(1):1–16.
- [Kurata *et al.*, 2007] Kurata, H., Zhao, Q., Okuda, R., and Shimizu, K. (2007). Integration of enzyme activities into metabolic flux distributions by elementary mode analysis. *BMC systems biology*, 1(1):1–14.
- [Labourel *et al.*, 2020] Labourel, A., Frandsen, K. E., Zhang, F., Brouilly, N., Grisel, S., Haon, M., Ciano, L., Ropartz, D., Fanuel, M., Martin, F., *et al.* (2020). A fungal family of lytic polysaccharide monooxygenase-like copper proteins. *Nature chemical biology*, 16(3):345–350.
- [Lang, 2000] Lang, C y Dornenburg, H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4):366–375.
- [Laratta *et al.*, 2008] Laratta, B., De Masi, L., Minasi, P., and Giovane, A. (2008). Pectin methylesterase in citrus bergamia r.: purification, biochemical characterisation and sequence of the exon related to the enzyme active site. *Food chemistry*, 110(4):829–837.
- [Latendresse *et al.*, 2012] Latendresse, M., Krummenacker, M., Trupp, M., and Karp, P. D. (2012). Construction and completion of flux balance models from pathway databases. *Bioinformatics*, 28(3):388–396.
- [Leal *et al.*, 2014] Leal, I. R., Wirth, R., and Tabarelli, M. (2014). The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified neotropical forests. *Biotropica*, 46(5):516–528.



## REFERENCIAS

- [Lee *et al.*, 2009] Lee, D.-S., Burd, H., Liu, J., Almaas, E., Wiest, O., Barabasi, A.-L., Oltvai, Z. N., and Kapatral, V. (2009). Comparative genome-scale metabolic reconstruction and flux balance analysis of multiple staphylococcus aureus genomes identify novel antimicrobial drug targets. *Journal of bacteriology*, 191(12):4015–4024.
- [Leivas *et al.*, 2016] Leivas, C. L., Iacomini, M., and Cordeiro, L. M. (2016). Pectic type ii arabinogalactans from starfruit (*averrhoa carambola* l.). *Food chemistry*, 199:252–257.
- [Lewis *et al.*, 2012] Lewis, N. E., Nagarajan, H., and Palsson, B. O. (2012). Constraining the metabolic genotype–phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4):291–305.
- [Li *et al.*, 2012] Li, S., Huang, D., Li, Y., Wen, J., and Jia, X. (2012). Rational improvement of the engineered isobutanol-producing bacillus subtilis by elementary mode analysis. *Microbial cell factories*, 11(1):1–12.
- [Liao *et al.*, 1996] Liao, J. C., Hou, S.-Y., and Chao, Y.-P. (1996). Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnology and bioengineering*, 52(1):129–140.
- [Lin *et al.*, 2020] Lin, Y., Zhou, J., Zhou, X., Shuai, S., Zhou, R., An, H., Fang, S., Zhang, S., and Deng, Q. (2020). A novel narnavirus from the plant-pathogenic fungus *magnaporthe oryzae*. *Archives of Virology*, 165(5):1235–1240.
- [Loewenstein *et al.*, 2009] Loewenstein, Y., Raimondo, D., Redfern, O. C., Watson, J., Frishman, D., Linial, M., Orengo, C., Thornton, J., and Tramontano, A. (2009). Protein function annotation by homology-based inference. *Genome biology*, 10(2):1–8.
- [Macarena *et al.*, 2005] Macarena, S., Fernando, L. L., Monica, V., Rafael, V., and Bernardo, G. (2005). Incomplete processing of peroxidase transcripts in the lignin degrading fungus phanerochaete chrysosporium. *FEMS microbiology letters*, 242(1):37–44.



## REFERENCIAS

- [Mahram and Herbordt, 2015] Mahram, A. and Herbordt, M. C. (2015). Ncbi blastp on high-performance reconfigurable computing systems. *ACM Transactions on Reconfigurable Technology and Systems (TRETTS)*, 7(4):1–20.
- [Martínez *et al.*, 2005] Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M. J., Gutiérrez Suárez, A., and Rio Andrade, J. C. d. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.
- [Martínez *et al.*, 2004] Martínez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., *et al.* (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *phanerochaete chrysosporium* strain rp78. *Nature biotechnology*, 22(6):695–700.
- [Maya-Yescas *et al.*, 2021] Maya-Yescas, M. E., Revah, S., Le Borgne, S., Valenzuela, J., Palacios-González, E., Terres-Rojas, E., and Viguera-Ramírez, G. (2021). Growth of *Leucoagaricus gongylophorus* moller (singer) and production of key enzymes in submerged and solid-state cultures with lignocellulosic substrates. *Biotechnology Letters*, 43(4):845–854.
- [McKendry, 2002] McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource technology*, 83(1):37–46.
- [Meyenburg, 1969] Meyenburg, K. v. (1969). *Katabolit-Repression und der Sprossungszyklus von Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis, ETH Zurich.
- [Middelhoven *et al.*, 2003] Middelhoven, W. J., Fonseca, A., Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., and Bueno, O. C. (2003). *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *atta sexdens*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(2):167–174.
- [Mielenz, 2001] Mielenz, J. R. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current opinion in microbiology*, 4(3):324–329.

## REFERENCIAS

- [Miller, 1959] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3):426–428.
- [Miyashira *et al.*, 2010] Miyashira, C., Tanigushi, D., Gugliotta, A., and Santos, D. (2010). Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *atta sexdens* rubropilosa forelin two culture media. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2):506–511.
- [Mlakar and Legisa, 2006] Mlakar, T. and Legisa, M. (2006). Citrate inhibition-resistant form of 6 - *phosphofructo* - 1 - *kinase* from *aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 72(7):4515–4521.
- [Mu *et al.*, 1997] Mu, J., Skurat, A. V., and Roach, P. J. (1997). Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44):27589–27597.
- [Ngouemazong *et al.*, 2012] Ngouemazong, D. E., Kabuye, G., Fraeye, I., Cardinaels, R., Van Loey, A., Moldenaers, P., and Hendrickx, M. (2012). Effect of debranching on the rheological properties of  $Ca^{2+}$  pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 26(1):44–53.
- [Nicol *et al.*, 2012] Nicol, R., Marchand, K., and Lubitz, W. (2012). Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(5):1865–1875.
- [Nidetzky, 1994] Nidetzky, Bernd y Claeysens, M. (1994). Specific quantification of trichoderma reesei cellulases in reconstituted mixtures and its application to cellulase–cellulose binding studies. *Biotechnology and bioengineering*, 44(8):961–966.
- [Overbeek *et al.*, 2000] Overbeek, R., Larsen, N., Pusch, G. D., D'Souza, M., Jr, E. S., Kyrpides, N., Fonstein, M., Maltsev, N., and Selkov, E. (2000). Wit: integrated system for high-throughput genome sequence analysis and metabolic reconstruction. *Nucleic acids research*, 28(1):123–125.
- [Paudel *et al.*, 2017] Paudel, S. R., Banjara, S. P., Choi, O. K., Park, K. Y., Kim, Y. M., and Lee, J. W. (2017). Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current

## REFERENCIAS

- state and challenges. *Bioresource Technology*, 245:1194–1205.
- [Payne *et al.*, 2015] Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Stahlberg, J., and Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical reviews*, 115(3):1308–1448.
- [Peregrin-Álvarez *et al.*, 2009] Peregrin-Álvarez, J. M., Sanford, C., and Parkinson, J. (2009). The conservation and evolutionary modularity of metabolism. *Genome biology*, 10(6):1–17.
- [Pérez *et al.*, 2002] Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De la Rubia, T., and Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology*, 5(2):53–63.
- [Pfeiffer *et al.*, 1999] Pfeiffer, T., Sánchez-Valdenebro, I., Nupmsó, J., Montero, F., and Schuster, S. (1999). Metatool: for studying metabolic networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(3):251–257.
- [Phitsuwan *et al.*, 2013] Phitsuwan, P., Sakka, K., and Ratanakhanokchai, K. (2013). Improvement of lignocellulosic biomass in planta: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy*, 58:390–405.
- [Pilkis *et al.*, 1988] Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R., and Claus, T. H. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual review of biochemistry*, 57(1):755–783.
- [Prasad *et al.*, 2007] Prasad, S., Singh, A., Jain, N., and Joshi, H. (2007). Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in india. *Energy & Fuels*, 21(4):2415–2420.
- [Pu *et al.*, 2007] Pu, Y., Jiang, N., and Ragauskas, A. J. (2007). Ionic liquid as a green solvent for lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 27(1):23–33.
- [Ragauskas, 2018] Ragauskas, Arthur J y Yoo, C. G. (2018). Advancements in biomass

## REFERENCIAS

- recalcitrance: the use of lignin for the production of fuels and chemicals. *Frontiers in Energy Research*, 6:118.
- [Ravindran, 2016] Ravindran, Rajeev y Jaiswal, A. K. (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: a review. *Bioengineering*, 3(4):30.
- [Reder, 1988] Reder, C. (1988). Metabolic control theory: a structural approach. *Journal of theoretical biology*, 135(2):175–201.
- [Reinhammar, 2018] Reinhammar, B. (2018). Laccase. In *Copper proteins and copper enzymes*, pages 1–36. CRC press.
- [Ríos-Casanova, 2014] Ríos-Casanova, L. (2014). Biodiversidad de hormigas en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85:S392–S398.
- [Ríos-Casanova *et al.*, 2006] Ríos-Casanova, L., Valiente-Banuet, A., and Rico-Gray, V. (2006). Ant diversity and its relationship with vegetation and soil factors in an alluvial fan of the Tehuacan Valley, México. *Acta Oecologica*, 29(3):316–323.
- [Roach *et al.*, 2012] Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., and Tagliabracci, V. S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochemical Journal*, 441(3):763–787.
- [Roach and Skurat, 1997] Roach, P. J. and Skurat, A. V. (1997). Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 57:289–316.
- [Rockafellar, 2015] Rockafellar, R. T. (2015). *Convex analysis*. Princeton university press.
- [Saad *et al.*, 2007] Saad, N., Briand, M., Gardarin, C., Briand, Y., and Michaud, P. (2007). Production, purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* nr1894. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7):800–805.
- [Saavedra-Molina *et al.*, 2018] Saavedra-Molina, J. L., Méndez-Iturbide, D., Gómez-

## REFERENCIAS

- Camarillo, M. A., and Sánchez, C. (2018). Mycelial growth and fruit body nutritional composition of pleurotus species grown on different lignocellulosic waste-based media. *BioResources*, 13(2):4008–4017.
- [Sakai *et al.*, 1993] Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., and Vandamme, E. J. (1993). Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties, and applications. *Advances in applied microbiology*, 39:213–294.
- [Samal *et al.*, 2017] Samal, A., Craig, J. P., Coradetti, S. T., Benz, J. P., Eddy, J. A., Price, N. D., and Glass, N. L. (2017). Network reconstruction and systems analysis of plant cellwall deconstruction by neurospora crassa. *Biotechnology for biofuels*, 10(1):1–21.
- [Santos *et al.*, 2004] Santos, A. V., Dillon, R. J., Dillon, V. M., Reynolds, S. E., and Samuels, R. I. (2004). Occurrence of the antibiotic producing bacterium burkholderia sp. in colonies of the leaf-cutting ant *atta sexdens rubropilosa*. *FEMS microbiology letters*, 239(2):319–323.
- [Scheller, 2010] Scheller, Henrik Vibe y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61:263–289.
- [Schilling *et al.*, 2000] Schilling, C. H., Edwards, J. S., Letscher, D., and Palsson, B. (2000). Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems. *Biotechnology and bioengineering*, 71(4):286–306.
- [Schiott *et al.*, 2010] Schiott, M., Rogowska-Wrzesinska, A., Roepstorff, P., and Boomsma, J. J. (2010). Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. *BMC biology*, 8(1):1–12.
- [Schoch *et al.*, 2020] Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., *et al.* (2020). Ncbi taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020.

## REFERENCIAS

- [Schols, 1995] Schols, H. (1995). *Structural characterization of pectic hairy regions isolated from apple cell walls Structuurkenmerken van vertakte pectine fragmenten afkomstig van decelwanden van appel*. Schols.
- [Schols et al., 1995] Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., and Voragen, A. G. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*, 279:265–279.
- [Schultz, 2008] Schultz, Ted R y Brady, S. G. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14):5435–5440.
- [Schuster et al., 2000] Schuster, S., Fell, D. A., and Dandekar, T. (2000). A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nature biotechnology*, 18(3):326–332.
- [Schuster et al., 2002] Schuster, S., Hilgetag, C., Woods, J. H., and Fell, D. A. (2002). Reaction routes in biochemical reaction systems: algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism. *Journal of mathematical biology*, 45(2):153–181.
- [Seymour et al., 2002] Seymour, G. B., Knox, J. P., et al. (2002). *Pectins and their manipulation*. Blackwell Publishing.
- [Shallom, 2003] Shallom, Dalia y Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current opinion in microbiology*, 6(3):219–228.
- [Silva et al., 2006] Silva, A., Bacci, M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., and Hebling, M. J. (2006). Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus moller* (singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *atta sexdens linnaeus*. *Current microbiology*, 53(1):68–71.
- [Sims et al., 2006] Sims, R. E., Hastings, A., Schlamadinger, B., Taylor, G., and Smith, P. (2006). Energy crops: current status and future prospects. *Global change biology*, 12(11):2054–2076.

## REFERENCIAS

- [Sindhu *et al.*, 2016] Sindhu, R., Binod, P., and Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass. an overview. *Bioresource technology*, 199:76–82.
- [Singh and Chen, 2008] Singh, D. and Chen, S. (2008). The white-rot fungus phanerochaete chrysosporium: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(3):399–417.
- [Singh, 2014] Singh, Adya P y Singh, T. (2014). Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy*, 62:198–206.
- [Stephanopoulos *et al.*, 1998] Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A., and Nielsen, J. (1998). Metabolic engineering: principles and methodologies.
- [Subramaniyan, 2002] Subramaniyan, S y Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, 22(1):33–64.
- [Suurnakki *et al.*, 1997] Suurnakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J., and Viikari, L. (1997). He-micellulases in the bleaching of chemical pulps. *Biotechnology in the pulp and paper industry*, pages 261–287.
- [Talmadge *et al.*, 1973] Talmadge, K. W., Keegstra, K., Bauer, W. D., and Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls: I. the macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant physiology*, 51(1):158–173.
- [Tan *et al.*, 2016] Tan, M. H., Gan, H. M., Gan, H. Y., Lee, Y. P., Croft, L. J., Schultz, M. B., Miller, A. D., and Austin, C. M. (2016). First comprehensive multi-tissue transcriptome of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) reveals unexpected diversity of endogenous cellulase. *Organisms Diversity & Evolution*, 16(1):185–200.
- [Tellez-Tellez *et al.*, 2008] Tellez-Tellez, M., Fernandez, F., Montiel-González, A., Sánchez, C., and Díaz-Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by



## REFERENCIAS

- pleurotus ostreatus in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4):675–679.
- [Thibault *et al.*, 1993] Thibault, J.-F., Renard, C. M., Axelos, M. A., Roger, P., and Crepeau, M.-J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238:271–286.
- [Trinh *et al.*, 2009] Trinh, C. T., Wlaschin, A., and Srienc, F. (2009). Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(5):813–826.
- [Trinh, 2009] Trinh, Cong T y Srienc, F. (2009). Metabolic engineering of escherichia coli for efficient conversion of glycerol to ethanol. *Applied and environmental microbiology*, 75(21):6696–6705.
- [Trinh, 2012] Trinh, Cong T y Thompson, R. A. (2012). Elementary mode analysis: A useful metabolic pathway analysis tool for reprogramming microbial metabolic pathways. *Reprogramming microbial metabolic pathways*, pages 21–42.
- [Urbas *et al.*, 2007] Urbas, P., Araujo Jr, M. V., Leal, I. R., and Wirth, R. (2007). Cutting more from cut forests: edge effects on foraging and herbivory of leaf-cutting ants in brazil. *Biotropica*, 39(4):489–495.
- [Van Zyl *et al.*, 2007] Van Zyl, W. H., Lynd, L. R., den Haan, R., and McBride, J. E. (2007). Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels*, pages 205–235.
- [Vigueras *et al.*, 2017] Vigueras, G., Paredes-Hernández, D., Revah, S., Valenzuela, J., Olivares-Hernández, R., and Le Borgne, S. (2017). Growth and enzymatic activity of *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus isolated from the leaf-cutting ant *atta mexicana*, on cellulose and lignocellulosic biomass. *Letters in applied microbiology*, 65(2):173–181.
- [Vijayasankaran *et al.*, 2005] Vijayasankaran, N., Carlson, R., and Srienc, F. (2005). Metabolic



## REFERENCIAS

- pathway structures for recombinant protein synthesis in escherichia coli. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(6):737–746.
- [Voragen *et al.*, 2009] Voragen, A. G., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., and Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2):263–275.
- [Watkinson, 2012] Watkinson, SC y Eastwood, D. (2012). *Serpula lacrymans*, wood and buildings. *Advances in applied microbiology*, 78:121–149.
- [Whitaker, 1984] Whitaker, J. R. (1984). Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme and Microbial Technology*, 6(8):341–349.
- [Xiao *et al.*, 2020] Xiao, G., Tang, G., and Wang, C. (2020). Congruence amidst discordance between sequence and protein-content based phylogenies of fungi. *Journal of Fungi*, 6(3):134.
- [Yadav *et al.*, 2009] Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., and Yadav, K. D. S. (2009). Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*, 44(1):1–10.
- [Yuan *et al.*, 2008] Yuan, J. S., Tiller, K. H., Al-Ahmad, H., Stewart, N. R., and Stewart Jr, C. N. (2008). Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends in plant science*, 13(8):421–429.
- [Zavala-Hurtado *et al.*, 2000] Zavala-Hurtado, J. A., Valverde, P. L., del Carmen Herrera-Fuentes, M., and Díaz-Solis, A. (2000). Influence of leaf-cutting ants (*Atta mexicana*) on performance and dispersion patterns of perennial desert shrubs in an intertropical region of central México. *Journal of Arid Environments*, 46(1):93–102.
- [Zhang, 2004] Zhang, Yi-Heng Percival y Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7):797–824.

## REFERENCIAS

[Zheng *et al.*, 2014] Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., and Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in energy and combustion science*, 42:35–53.

[Zhou *et al.*, 2013] Zhou, L., Shi, M., Cai, Q., Wu, L., Hu, X., Yang, X., Chen, C., and Xu, J. (2013). Hydrolysis of hemicellulose catalyzed by hierarchical h-usy zeolites—the role of acidity and pore structure. *Microporous and mesoporous materials*, 169:54–59.

[Zien *et al.*, 2000] Zien, A., Kuffner, R., Zimmer, R., and Lengauer, T. (2000). Analysis of gene expression data with pathway scores. In *Ismb*, volume 8, pages 407–417.

## ANEXOS

Anexo A. Reacciones enzimáticas incluidas en la red metabólica de *L. gongylophorus*.

En este anexo se presentan las reacciones incluidas en la red metabólica y las enzimas que participan en estas reacciones.

Reacción	Enzima
cellulose [e] + h2o [e] $\rightleftharpoons$ GLU [e] + Cellobiose	endoglucanasa
Cellobiose + H2O $\rightleftharpoons$ 2 GLU	beta-glucosidase
ATP + GLU = ADP + G6P	Hexokinase
ATP + FRU $\rightleftharpoons$ ADP + F6P	Hexokinase
G6P $\rightleftharpoons$ G1P	Phosphoglucomutase
utp + G1P $\rightleftharpoons$ ppi + UDP-gluc	UDP-glucose pyrophosphorylase
UDP-GLU + Amylose $\rightleftharpoons$ UDP + Amylose	Glycogen [starch] synthase
Amylose $\rightleftharpoons$ glycogen	amylose isomerase
glycogen + Pi = amylose + G1P	glycogen phosphorylase
ADP + Pi = ATP	adenylate kinase
ATP + UDP $\rightleftharpoons$ ADP + utp	UDP kinase
G6P $\rightleftharpoons$ F6P	glucose-6-Pi isomerase
F1.6P + H2O = F6P + Pi	fructose-bisphosphatase
ATP + F6P $\rightleftharpoons$ ADP + F1.6P	6-phosphofructokinase
F1.6P $\rightleftharpoons$ DHP + gly-3-p	fructose-bisPi aldolase
G3P $\rightleftharpoons$ 2 DHP	TriosePi isomerase
G3P + pi + NAD + $\rightleftharpoons$ 3PG + NADH + H+	glyceraldehyde-3-Pi dehydrogenase
ATP + 3PG $\rightleftharpoons$ ADP + 3PGp	phosphoglycerate kinase
3PG $\rightleftharpoons$ 2PG	phosphoglycerate mutase
2PG $\rightleftharpoons$ PEP + H2O	enolase
ATP + PYR $\rightleftharpoons$ ADP + PEP	PYR kinase
PYR + CoA + NAD+ $\rightleftharpoons$ AcCoA + CO2 + NADH + H+	PYR dehydrogenase
ATP + PYR + HCO3- $\rightleftharpoons$ ADP + Pi + OXA	PYR carboxylase
ATP + OXA $\rightleftharpoons$ ADP + PEP + CO2	phosphoenolpiruvate carboxikinasa
Pectin + H2O $\rightleftharpoons$ n Methanol + Pectate	pectinesterase
Pectate + H2O $\rightleftharpoons$ Digalacturonate + Pectate	endo-polygalacturonase
Digalacturonate + H2O $\rightleftharpoons$ 2 DGAL	exo-polygalacturonase
L-Galactonate + NADP+ $\rightleftharpoons$ DGAL + NADPH + H+	D-galacturonate reductase

L-Galactonate $\rightleftharpoons$ 2D3G + H <sub>2</sub> O	L-galactonate dehydratase
2D3G $\rightleftharpoons$ PYR + L-Glyceraldehyde	L-threo-3-deoxy-hexylosonate aldolase
G3P + NADPH + H <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ Glycerol + NADP <sup>+</sup>	L-glyceraldehyde reductase
glycerol + NADP <sup>+</sup> = G3P + NADPH + H <sup>+</sup>	glycerol dehydrogenase
G3P + NAD <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O $\rightleftharpoons$ D-Glycerate + NADH + H <sup>+</sup>	aldehyde dehydrogenase
ATP + D-Glycerate $\rightleftharpoons$ ADP + 3PG	glycerate kinase
Hydrolysis of (1 $\rightarrow$ 4)-beta-D-xylans	xylan 1,4-beta-xylosidase
Endohydrolysis of (1 $\rightarrow$ 4)-beta-D-xylosidic	Endo-1,4-beta-xylanase
xylitol + NAD(P) <sup>+</sup> = D-xylose + NAD(P)H + H <sup>+</sup>	D-xylose reductase
Xylitol + NAD <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ D-Xylulose + NADH + H <sup>+</sup>	xylitol deshydrogenase
ATP + D-Xylulose $\rightleftharpoons$ ADP + D-Xylulose 5-Pi	xylulose kinase
D-Ribulose 5-Pi $\rightleftharpoons$ D-Xylulose 5-Pi	D-Ribulose-5-Pi 3-epimerase
S7P + G3P = R5P + X5P	Transketolase
S7P + G3P $\rightleftharpoons$ E4P + F6P	transaldolase
G6P + NADP <sup>+</sup> = 6PGL + NADPH + H <sup>+</sup>	glucose-6-P dehydrogenase
6P1.5GL + H <sub>2</sub> O = 6PGL	6-phosphogluconolactonase
6PGL + NAD(P) <sup>+</sup> = R5P + CO <sub>2</sub> + NAD(P)H + H <sup>+</sup>	phosphogluconate dehydrogenase
D-Ribulose 5-Pi $\rightleftharpoons$ D-Xylulose 5-Pi	ribulose-5-Pi 3-epimerase
D-Ribose 5-Pi $\rightleftharpoons$ D-Ribulose 5-Pi	ribose 5-Pi isomerase
ATP + CIT + CoA $\rightleftharpoons$ ADP + Pi + AcCoA + OXA	ATP CIT synthase
CIT $\rightleftharpoons$ cis-Aconitate + H <sub>2</sub> O	aconitate hydratase
ICIT $\rightleftharpoons$ cis-Aconitate + H <sub>2</sub> O	aconitase
ICIT + NADP <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ AKG + CO <sub>2</sub> + NADPH + H <sup>+</sup>	ICIT dehydrogenase
OXO + Thiamin diPi $\rightleftharpoons$ ThPP + CO <sub>2</sub>	alpha-ketoglutaric dehydrogenase
ThPP + EN6 $\rightleftharpoons$ DHLP + Thiamin diPi	alpha-ketoglutaric dehydrogenase
SUC-CoA + DHP-E $\rightleftharpoons$ CoA + DHLP	alpha-ketoglutaric dehydrogenase
RFe + SUC-CoA + CO <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ 2 OFe + OXO + CoA	alpha-ketoglutaric synthase
OXO + CoA + NAD <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ SUC-CoA + CO <sub>2</sub> + NADH + H <sup>+</sup>	alpha-ketoglutaric dehydrogenase
ATP + Succinate + CoA $\rightleftharpoons$ ADP + pi + SUC-CoA	succinyl-CoA synthetase
succinate + FAD = fumarate + FADH <sub>2</sub>	succinate dehydrogenase
(S)-Malate $\rightleftharpoons$ Fumarate + H <sub>2</sub> O	fumarate hydratase
malate + NAD <sup>+</sup> = OXA + NADH + H <sup>+</sup>	malate dehydrogenase
cellobiose [e] + H <sup>+</sup> $\rightarrow$ cellobiose [c]	cellodextrin transport-1
glu [e] + H <sup>+</sup> $\rightarrow$ gluc [c]	hexose transporter HXT2
xylose[e] + h[c] $\rightarrow$ xylose[c]	hexose transporter HXT7
Galacturonate[e] + h[c] $\rightarrow$ Galacturonate[c]	Galacturonate transporter

## ANEXOS

OXA[c]->OXA[m]	mitochondrial dicarboxylate transporter
----------------	---

Las abreviaturas son las siguientes: Glucose (GLU), Glucosa 6-fosfato (G6P), D-Fructosa (FRU), Fructosa 6-fosfato (F6P), Glucosa 1-fosfato (G1P), D-fructosa 1,6-fosfato (F1.6P); Dihidroxiacetona fosfato (DHP), Sedoheptulosa 7-fosfato (S7P), D-Eritrosa 4-fosfato (E4P), 3-Carboxy-1-hydroxypropyl-ThPP (ThPP), Enzyme N6-(lipoyl)lysine (EN6), [Dihydrolipoyllysine residue succinyltransferase] S-succinyldihydrolipoyllysine (DHLP), 2 Reduced ferredoxin (RFe), 2 Oxidized ferredoxin (OFe), 6-phospho-GLUono-1,5-lactone (6PGL), 6-phospho-GLUono- 1,5-lactone (6P1.5GL), 2-Dehydro-3-deoxy-L-galactonate (2D3G), 2-Oxoglutarate (OXO), Dihydrolipoamide-E (DHP-E), D-Galacturonate (DGAL).

## Anexo B. Porcentajes de identidad resultante del alineamiento proteína-proteína.

En este anexo se muestran los porcentajes de identidad obtenidos luego de los alineamientos de secuencia realizados. Con base en estos resultados se consideraron las enzimas presentes en la red metabólica construida.

LOCUS	% Identidad	<i>Leucoagaricus sp</i>
Travedraft-150608	100	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-68557	100	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-156755	100	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-156756	100	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-157183	100	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-26433	83.37	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-155607	80.75	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-26884	73.5	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-59694	79.84	<i>L. SymC.cos</i>
ADK1	100	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-28124	100	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-171831	81.1	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-70572	80.17	<i>L.leutothites</i>
Travedraft-29629	68.69	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-31116	74	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-171695	67.73	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-30062	79.4	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-146294	76.44	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-35966	39.18	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-54983	88.04	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-110904	82.79	<i>L. SymC.cos</i>
TRAPUB-453	75.15	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-72201	88.32	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-69281	86.51	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-68175	42.54	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-171861	68.87	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-24492	62.17	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-22004	50.17	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-66662	50.34	<i>L.leutothites</i>
NCU09532	41.46	<i>L.leutothites</i>
gld1	53.85	<i>L. gongylophorus</i>
TRAPUB-4069	62.33	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-24751	50.48	<i>L. gongylophorus</i>
Travedraft-154346	49.01	<i>L.leutothites</i>
Travedraft-67879	63.19	<i>L.leutothites</i>
Travedraft-38102	56.33	<i>L. SymC.cos</i>

## ANEXOS

An01g03740	62.03	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-144293	68.02	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-148263	61.52	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-158451	83.96	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-64053	79.74	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-30435	81.29	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-144139	84.66	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-42276	65.62	<i>L. SymC.cos</i>
TRAPUB-10845	85.04	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-158451	83.86	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-172153	73.13	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-171840	84.23	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-170534	84.41	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-170534	84.41	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-31439	84.43	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-152358	84.89	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-152358	84.89	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-30906	74.53	<i>L. SymC.cos</i>
TRAPUB-11330	77.06	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-158886	79.21	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-28260	88.22	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-110343	85.01	<i>L. SymC.cos</i>
Travedraft-144781	78.04	<i>L. SymC.cos</i>
cdt-1	40.4	<i>L. SymC.cos</i>
HXT2	38.92	<i>L. SymC.cos</i>
HXT7	39.67	<i>L. SymC.cos</i>

Anexos C. Curvas Patrón.

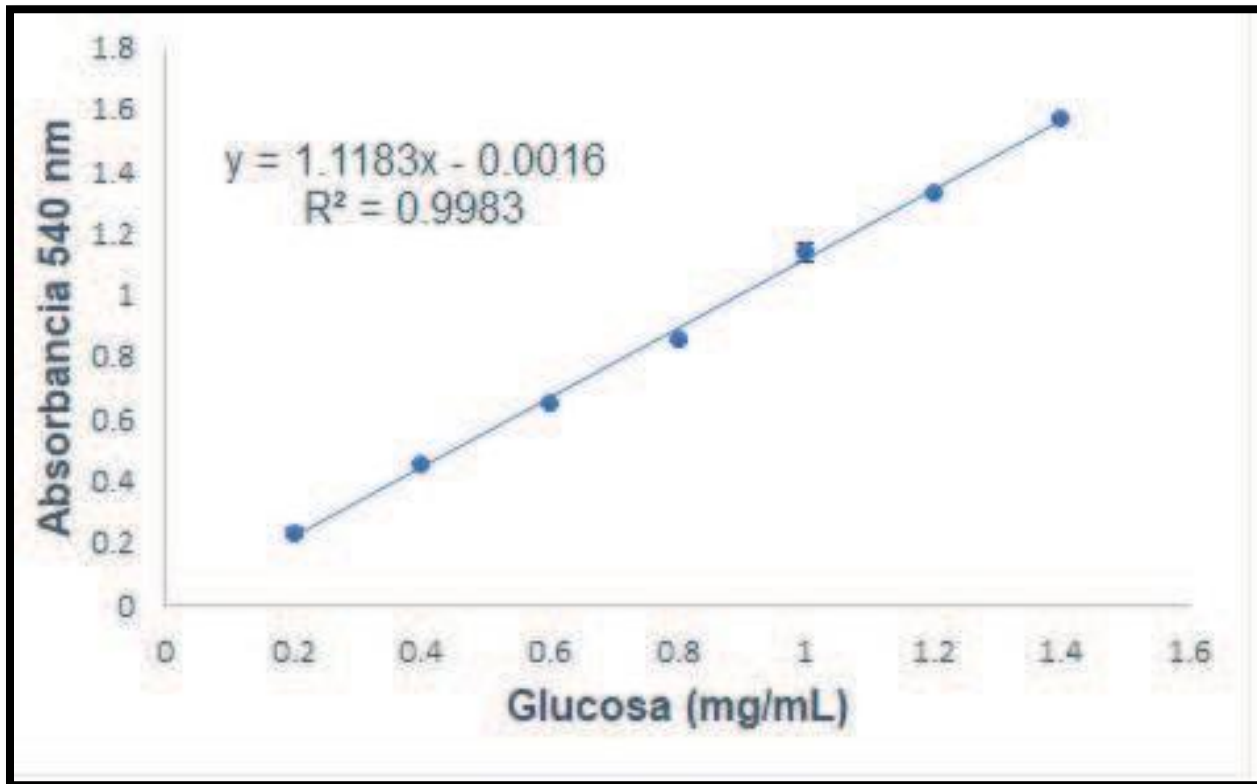
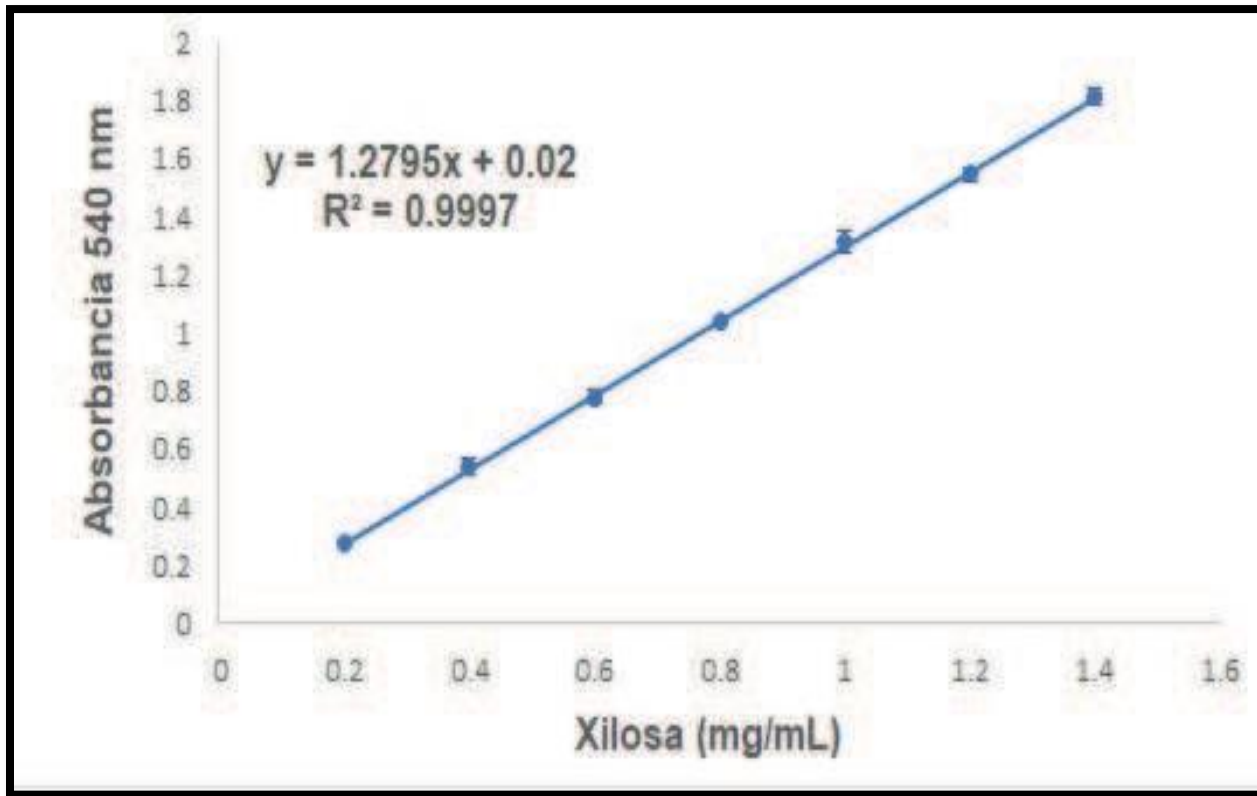


Figura C.1: Curva patrón de cuantificación de Glucosa utilizando el método DNS.





**Figura C.2:** Curva patrón de cuantificación de Xilosa utilizando el método DNS.