

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología

**“EVALUACIÓN DE CELULASAS TERMOESTABLES DE LAS CEPAS
BACTERIANAS GCB-13 Y GCC-13 AISLADOS DE LOS GÉISERES
DE CALIENTES (CANDARAVE-TACNA) A DIFERENTES
TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN”**

TESIS

Presentada por:

Bach. FREDDY EDDINSON NINAJA ZEGARRA

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

Tacna - Perú

2015

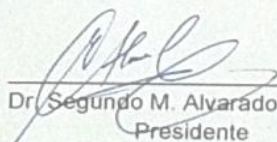
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 254

En la ciudad de Tacna, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 10:00 horas del día viernes 17 de julio del 2015, estando presente el jurado calificador nominado por resolución de la Facultad N° 8176-2015-FACI-UN/JBG conformado por los docentes siguientes:

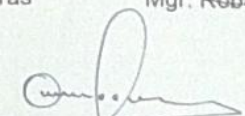
- | | |
|---|------------|
| - Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras | Presidente |
| - Mgr. Roberto Castellanos Cabrera | Secretario |
| - Dr. César Cevallos Columbus | Miembro |

Acto seguido se dio lectura a la resolución antes mencionada, del mismo modo se dio lectura al Art. 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias. A continuación el Presidente invitó al Bachiller FREDDY EDDINSON NINAJA ZEGARRA, a sustentar la tesis titulada: "Evaluación de celulasas termoestables de las cepas bacterianas GCB-13 y GCC-13 aisladas de los geiseres de Calientes (Candarave-Tacna) a diferentes temperaturas de incubación".

Siendo las 11:00 horas el tesista concluye su exposición, invitando el presidente a los miembros del jurado calificador a formular las preguntas y/o observaciones. Terminado este proceso, el Presidente invita a los miembros del jurado Calificador a emitir sus calificaciones con el resultado siguiente; Aprobación por unanimidad con el calificativo de Bueno (16) de acuerdo al reglamento de Grados y títulos de la FACI. Siendo las 12:00 horas se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador en señal de conformidad.


Dr. Segundo M. Alvarado Contreras
Presidente


Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
Secretario


Dr. César Cevallos Columbus
Miembro

DEDICATORIA

A mi familia por darme el impulso necesario para desarrollar mis más sorprendentes empresas, sueños que vuelvo realidad, gracias una vez más por la confianza y educación.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Daladier Castillo Cotrina y Coasesor Mario Esparza Mantilla por sus consejos profesionales que enriquecieron mi tesis.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

1.1.	Antecedentes	1
1.1.1.	Celulosa	1
1.1.2.	Ecosistema de los géiseres de Calientes-Candarave	5
1.1.3.	Microorganismos celulolíticos	6
1.1.4.	Enzimas celulolíticas	8
1.1.5.	Mecanismo de acción de las enzimas celulolíticas	10
1.2.	Justificación del problema	14
1.3.	Importancia de la investigación.	14
1.4.	Hipótesis	16
1.5.	Objetivos	16

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.	Materiales	18
2.2.	Métodos	18
2.3.	Tratamientos experimentales	19
2.4.	Metodología	19

2.4.1. Aislamiento de las cepas bacterianas celulolíticas	19
2.4.2. Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas celulolíticas	22
2.4.3. Identificación molecular de las cepas bacterianas GCB-13 y GCC-13	23
2.4.4. Inicio de la experimentación de producción de enzimas celulolíticas	24
2.4.5. Evaluación de la producción de celulasas y de la actividad enzimática de las celulasas	24
2.4.5.1. Determinación de la producción de celulasas a través de la determinación de proteínas totales por el método de Bradford	25

<p>2.4.5.2. Determinación de la actividad enzimática a través de la determinación de azúcares reductores por el método del DNS</p>	26
<p>2.4.6. Determinación de la producción máxima de celulasas producidas por las cepas bacterianas</p>	27
<p>2.4.7. Determinación de la actividad enzimática máxima de celulasas producidas por las cepas bacterianas</p>	28
<p>III. RESULTADOS</p>	
<p>3.1. Características macroscópicas de las colonias</p>	29
<p>3.2. Caracterización microscópica de las cepas</p>	32
<p>3.3. Identificación molecular de las cepas bacterianas</p>	
<p>GCB-13 y GCC-13</p>	34
<p>3.3.1. Extracción del ADN de las cepas celulolíticas</p>	
<p>GCB-13 y GCC-13</p>	34

3.3.2.	Análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de las cepas celulolíticas	35
3.4.	Producción de celulasas a través de la determinación de proteínas totales en la cepa GCB-13	36
3.5.	Actividad enzimática de las celulasas a través de la determinación de azúcares reductores en la cepa GCB-13	39
3.6.	Producción de celulasas a través de la determinación de proteínas totales a en la cepa GCC-13	42
3.7.	Actividad enzimática de las celulasas a través de la determinación de azucares reductores en la cepa GCC-13	45
IV.	DISCUSIÓN	48
V.	CONCLUSIONES	51
VI.	RECOMENDACIONES	54
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
VIII.	ANEXOS	100

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medio de cultivo carboximetilcelulosa (CMC) para el crecimiento de microorganismos celulolíticos

Cuadro 2. Identificación molecular de las cepas microbianas GCB-13 y GCC-13 empleando bases de datos: Blast server for bacterial identification, Ribosomal database Project y Ez Taxon.

Cuadro 3. Proteínas totales (ug/mL) producido por la cepa GCB-13 con sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Cuadro 4. Azúcares reductores (ug/mL) producidos por la cepa GCB-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura

Cuadro 5. Proteínas totales (ug/mL) producidas por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Cuadro 6. Azúcares reductores producidos por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Publicaciones de enzimas celulolíticas termófilas por país, según la base de datos National Center for Biotechnology and Information (NCBI).

Figura 2. Mapamundi de los trabajos de investigación en enzimas celulolíticas termófilas.

Figura 3. Colonias y halos de degradación de celulosa de las cepas bacterias GCC-13 y GCB-13 vistas macroscópicamente.

Figura 4. Colonia de la cepa GCB-13.

Figura 5. Colonia de la cepa GCC-13.

Figura 6. Diámetro de las colonias y de halos más colonias de las cepas celulolíticas a diferentes temperaturas en agar CMC.

Figura 7. Preparado en seco, coloreado con Gram y observado al microscopio de campo claro con 1000 aumentos de la cepa bacteriana GCB-13.

Figura 8. Preparado en seco, coloreado con Gram y observado al microscopio de campo claro con 1000 aumentos de la cepa bacteriana GCC-13.

Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa celulolítica GCB-13 a 45, 50 y 55°C

Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa celulolítica GCC-13 a 45, 50 y 55°C

Figura 11. Conservación de ADN de las cepas celulolíticas GCB-13 y GCC-13.

Figura 12. Representación en barras de las proteínas totales producidos por la cepa GCB-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Figura 13. Curvas de producción de proteínas totales de la cepa celulolítica GCB-13 a 45, 50 y 60 °C.

Figura 14. Representación en barras de azúcares reductores producidos por la cepa GCB-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Figura 15. Curvas de producción de azúcares reductores de la cepa celulolítica GCB-13 a 45 °C, 50 °C y 60 °C.

Figura 16. Representación en barras de las proteínas totales producidas por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Figura 17. Curvas de producción de proteínas totales de la cepa celulolítica GCC-13 a 45, 50 y 60°C.

Figura 18. Representación en barras de los azúcares reductores producidos por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Figura 19. Curvas de producción de azúcares reductores de la cepa celulolítica GCC-13 a 45, 50 y 60 °C.

RESUMEN

Se recolectó muestras de agua y sedimento de ocho géiseres de Calientes (Candarave-Tacna). Las muestras se incubaron a 50°C por 48 horas en medio de cultivo CMC. Se seleccionó las cepas con mayores halos de hidrólisis las cuales se rotularon con el código GCB-13 y GCC-13. Se sometieron a tres tratamientos, 45 °C, 50 °C y 55 °C. Cada 24 horas se monitoreó la producción de proteínas totales y azúcares reductores hasta las 96 horas. Las cepas GCB-13 y GCC-13 son bacterias Gram (+) que forman colonias blancas de 4.9 y 9.2 mm y cremas de 2.5 y 10.3 mm respectivamente. La identificación molecular de las cepas GCB-13 y GCC-13 corresponden a *Bacillus sp* y *Paenibacillus sp* respectivamente. La producción de proteínas totales de la cepa GCB-13 no presenta diferencias significativas a 45 °C, 50 °C y 55 °C, pero sí en la producción de azúcares reductores donde se determinó una mayor productividad a 45 °C y 50 °C, mientras que en la cepa GCC-13 no se encontró diferencias significativas en la producción de proteínas totales y azúcares reductores por lo que para este caso se concluye que existe un rango más amplio de acción.

Palabras claves: celulosa, enzimas celulolíticas, microorganismos termófilos, glucosa, industria.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Celulosa

La pared celular vegetal proporciona estabilidad, protege contra los patógenos, e influye en el crecimiento y desarrollo de la célula vegetal, entre otras funciones. Estructuralmente, la pared celular vegetal consiste en una pared primaria y secundaria, ambas microfibrillas de celulosa están embebidas en una matriz de hidratos de carbono (polisacáridos específicamente), glicoproteínas estructurales, enzimas y otros componentes. Los polímeros de carbohidratos han sido bien caracterizados y desempeñan un papel principal en el mantenimiento de la rigidez estructural de la pared celular de la planta. En este sentido, la pared celular vegetal secuestra cantidades significativas de polisacáridos metabólicamente inactivos de entre las siguientes clases:

- Celulosas (fibrillas insolubles de (1,4) β -glucanos).
- Hemi-celulosas (polisacáridos no celulósicos que incluyen β -(1,3) glucanos, β -(1,3) (1,4) glucanos, mananos, xilanos).
- Lignina (compuesto polifenólico) (Thomson, 1993).

Los β -glucanos son polímeros de moléculas de glucosa formadas por β -enlaces entre las moléculas de glucosa. Los enlaces pueden ser β -(1,4), β -(1,3), o β -(1,6) o una mezcla de los de dichos polímeros. Existen muchas clases de polímeros de β -glucano, y su estructura química, función fisiológica y el predominio difieren entre especies de plantas y hongos.

- Celulósicos β -glucanos

Los celulósicos β -(1,4) glucanos son cadenas poliméricas formadas por monómeros de glucosa sucesivas covalentemente unidos por β -(1,4) glucano. Estos β -(1,4) cadenas de glucano asociadas en manojos para formar microfibrillas rígidas, insolubles, que pueden contener hasta varios cientos de polímeros celulósicos (Beguin y Aubert,

1994). La resistencia a la tracción de dichas microfibrillas de celulosa en los mismos la pared celular vegetal para conferir rigidez a las estructuras de las plantas. Además, los componentes celulósicos, junto con otros compuestos poliméricos en la pared celular de la planta, demuestran un papel de protección, actuando como una barrera a diversos fitopatógenos.

- No celulósicos β -glucanos

Mientras que los polímeros celulósicos son ubicuos en las paredes celulares de diversas especies de plantas, los glucanos no celulósicos (β - (1,3) glucanos y β - (1,3) (1,4) glucanos) están típicamente presentes en las paredes celulares de algunas familias de plantas monocotiledóneas, tales como la Poaceae (Gramineae) (Chesson et al., 1995). En los hongos, β -(1,3) no celulósico glucanos son predominantes en la pared celular, en particular, proporcionan resistencia estructural (Borgia y Dodge, 1992). Además de proporcionar estabilidad estructural a la

pared celular fúngica, β - (1,3) los glucanos sirven como reservas de hidratos de carbono en los ambientes de crecimiento nutricionalmente agotados (Copa-Patino et al., 1989).

La hidrólisis de no celulósicos β -glucanos por enzimas β -glucanasa es de gran importancia para las interacciones planta-micopatógeno, en la arquitectura de la pared celular de los hongos, y la digestión de alimentación de forraje en los rumiantes (Umemoto et al, 1997; Vasquez-Garcidueñas et al, 1998;. Chen et al, 1997). Tales enzimas se han clasificado en diferentes familias según su origen (plantas, hongos, o microbiana), especificidad de sustrato, y la función. Así diferentes β -glucanasas no celulósicos tienen distintos sustratos y modos de acción hidrolítica, en la medida en que los vegetales, hongos, y β -glucanasas no celulósicos microbianas cada uno pertenecen a familias específicas con secuencia conservada y propiedades funcionales.

En las bacterias, glucanasas no celulósicos constan de β - (1,3) (1,4) glucanasas (EC 3.2.1.73), que son específicas para el sustrato, β - (1,3) (1,4) glucano. Ejemplos de tales glucanasas incluyen enzimas microbianas a partir de especies microbianas ruminales y no ruminales (por ejemplo, *Fibrobacter succinogenes* y *Bacillus subtilis*, respectivamente) (Teather y Erfle, 1990;. Wolf et al, 1995).

1.1.2. Ecosistema de los géiseres Calientes-Candarave

Los géiseres de Calientes están ubicados en la Cordillera Occidental del Sur del Perú a una latitud de 17 ° S, a 4 400 m.s.n.m. en el Distrito de Candarave, perteneciente a la región de Tacna, Perú. Los microorganismos presentes en estas fuentes termales, corresponden a bacilos y cocobacilos Gram negativos predominando las bacterias sobre las arqueas. Cada cuerpo de agua tiene un patrón único de diversidad, las circunstancias únicas de gran altura, irradiación y junto con las elevadas temperaturas han seleccionado

comunidades microbianas que no se encuentran en otro lugar en este planeta (Valdez, 2011).

1.1.3. Microorganismos celulolíticos

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y algunos actinomicetos o formando un complejo denominado "celulosoma", como en los clostridios y en bacterias del rumen (Murashima et al., 2002; Lynd et al., 2002). Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en hongos mesófilos, tales como *Trichoderma reesei* (Lynd et al., 2002). Sin embargo, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial. Por ello, existe la necesidad de aislar cepas con mejores rendimientos en la cantidad de enzimas liberadas al

medio extracelular y que mantengan la calidad intrínseca de dichas enzimas, además que expresen una elevada estabilidad de su actividad a pH extremos, solventes orgánicos, detergentes iónicos y principalmente la de mantener sus actividades enzimáticas a elevadas temperaturas de reacción. Por esta razón, los microorganismos termófilos han sido sugeridos como fuentes alternativas de celulasas por la termoestabilidad de sus enzimas, propiedad ventajosa en aplicaciones industriales (Zeikuz et al., 1981). Entre las bacterias que destacan tenemos algunas especies de los géneros *Clostridium*, *Streptomyces*, *Thermomonospora* y *Thermobifida* (ex-*Thermomonospora*) (Walter y Schrempf, 1996). En el caso de los *clostridios*, *Clostridium cellulovorans* (Murashima et al., 2002) hidroliza la celulosa en condiciones anaeróbicas; en tanto que las especies celulolíticas de *Streptomyces*, *Thermomonospora* y *Thermobifida* la degradan en un ambiente aeróbico.

Taxonómicamente los géneros *Streptomyces*, *Thermomonospora* y *Thermobifida* se ubican en el Orden Actinomicetales y son comúnmente denominados actinomicetos.

1.1.4. Enzimas celulolíticas

La celulosa, una de las moléculas poliméricas más abundantes en la biósfera (Martínez *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2002; Hernández-Santoyo *et al.*, 1999), constituida por D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos β 1-4 (Mejia-Castillo *et al.*, 2002), es degradada por sistemas enzimáticos endo β 1-4 glucanasas, exo β 1-4 glucanasas y β glicosidasas, las cuales transforman el polímero en moléculas de D-glucosa (Maki *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2010; Cuervo *et al.*, 2009; Sheble y El-diwany, 2007; Atlas y Bartha, 2005; Terry-Brown *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2002; Mejia-Castillo *et al.*, 2002; Hernández-Santoyo *et al.*, 1999, Hreggvidsson *et al.*, 1996, Viviano *et al.*, 2011).

La hidrólisis completa de la celulosa ocurre en tres etapas diferentes, primera se produce la transformación de la celulosa insoluble en celulosa soluble, la segunda etapa es la transformación de la celulosa soluble en oligosacáridos y celobiosa: y finalmente la transformación de celobiosa en glucosa. El enlace glucosídico β (1,4) es fácil de romper, pero los puentes de hidrógeno en las formas insolubles de celulosa tienen una composición comprimida, que ni el agua ni las enzimas puede ingresar. La estructura cristalina solo puede ser atacada por exoglucanasas, que son capaces de romper los enlaces glucosídicos terminales transformándola en celulosa soluble. A partir de este momento puede intervenir otro grupo de enzimas del complejo enzimático, las endoglucanasas, continuando el proceso hasta la degradación total de la molécula (García *et al*, 2003).

1.1.5. Mecanismo de acción de las enzimas celulolíticas

Los microorganismos utilizan un complejo enzimático (celulosomas o celulasas), que actúan de forma cooperativa en la degradación de la celulosa, los cuales se pueden clasificar según su acción catalítica y se pueden encontrar tres tipos de actividad enzimática:

- **Exoglucanasas**

Hidrolizan los enlaces glucosídicos terminales, rompiendo la estructura cristalina de la celulosa y transformandola en celulosa amorfa. Al actuar sobre la celulosa libera glucosa o celobiosa (García *et al*, 2003).

- **Endoglucanasas**

Llamadas también 1,4 β -D-glucán-4-glucanohidrolasas, que actúan en las porciones amorfas de las fibras de celulosa y rompen los

enlaces β -1,4 glucosídicos, generando oligosacáridos de distintas longitudes, por consiguiente genera la formación de nuevos extremos reductores como no reductores (Rodríguez, 2005).

- **β -Glucosidasa**

La β -Glucosidasa es una enzima que hidroliza los monómeros de glucosa, por consiguiente es muy importante para que se produzca la degradación integral de toda la estructura celulolítica (García *et al.*, 2003).

Las celulasas tienen un amplio uso industrial y particularmente en los procesos para fabricar textiles, cueros y papel se requieren enzimas que funcionen a temperaturas y pH extremos, lo cual ha despertado el interés por la búsqueda de organismos termófilos celulolíticos (Liang *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010;

Ovando Chacón y Wahszewski, 2005). Además de sus aplicaciones en las industrias de alimentos y químicas (Sheble y El-dewany, 2007; Ovando-Chacón y Wahszewski, 2005) las celulasas constituyen un insumo importante en la fabricación de biocombustibles, debido a que degradan el componente celulósico de materiales lignocelulósicos generando glucosa, la cual finalmente, por procesos biológicos se transformará en etanol (Maki *et al.*, 2011; Cuervo *et al.*, 2009; Sánchez-Gómez *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2009; Kumar *et al.* 2009; Martínez-Anaya *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Sissons *et al.*, 1987). Citado por (Viviano *et al.*, 2011).

Las publicaciones en revistas científicas relacionadas a trabajos de investigación en enzimas celulólicas termófilas se muestran en los siguientes gráficos. Publicaciones a nivel mundial de enzimas celulólicas termófilas según la base de datos NCBI.

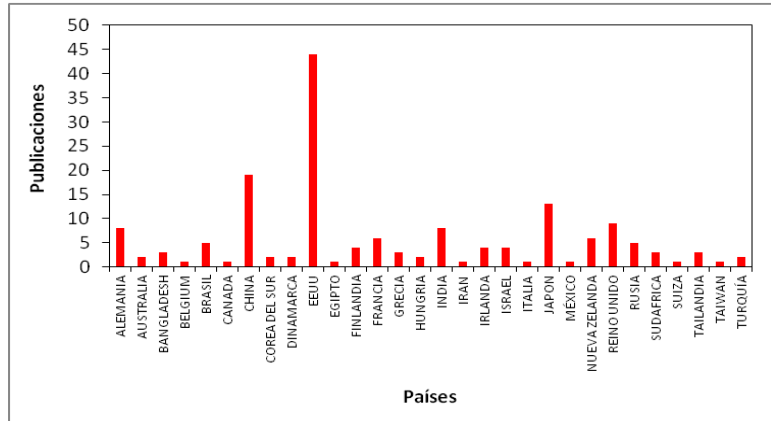


Figura 1. Publicaciones de enzimas celulolíticas termófilas por país. Recopilación de la base de datos NCBI. Fuente: Elaboración propia.

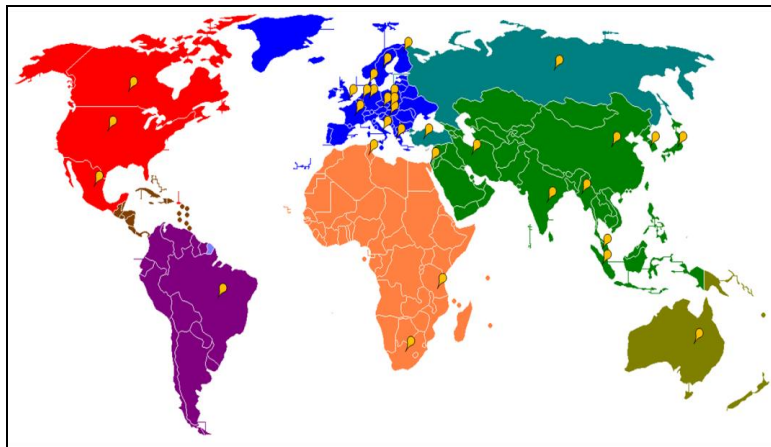


Figura 2. Mapamundi de los trabajos de investigación en enzimas celulolíticas termófilas. Recopilación de la base de datos NCBI. Fuente: Elaboración propia.

1.2. Justificación del problema

La producción de enzimas termoestables es muy usada a nivel biotecnológico por tener muchas aplicaciones en la industria de los detergentes y el tratamiento de desechos orgánicos. Los géiseres de Calientes son fuente de estos microorganismos. En este trabajo se tuvo como objetivo, evaluar la producción enzimática a las diferentes temperaturas de 45, 50 y 55 °C y determinar la temperatura óptima de producción enzimática de los microorganismos celulolíticos de los géiseres de Calientes (Candarave-Tacna).

1.3. Importancia de la investigación

Las investigaciones sobre microorganismos termófilos ha tomado gran importancia debido a los usos que puede tener a nivel biotecnológico puesto que sus enzimas son estables a altas temperaturas (Rubiano, 2006).

Los géiseres de Calientes (Candarave-Tacna) presentan las condiciones favorables para el desarrollo de estas especies, por consiguiente los microbios aislados tienen la capacidad de producir enzimas celulolíticas termoestables.

Las celulasas son las enzimas que poseen capacidad de hidrolizar la celulosa como sustrato, estas enzimas pueden tener un papel importante en la solución de los problemas ecológicos y problemas de tratamiento de materiales celulolíticos como el papel, textil, etc. (Ponce *et al.*, 2002).

1.4. Hipótesis

Se obtiene una mayor producción de celulasas termoestables de microorganismos aislados de los géiseres de Calientes, (Candarave-Tacna) a temperaturas de incubación entre 45°C y 55°C.

1.5. Objetivos

Objetivo General

- Evaluar las celulasas termoestables de las cepas bacterianas GCC-13 y GCB-13 aisladas de los géiseres de Calientes (Candarave-Tacna) a diferentes temperaturas de incubación.

Objetivos Específicos

- Caracterizar macroscópica y microscópicamente a las cepas bacterianas GCC-13 y GCB-13 e Identificar molecularmente a las cepas GCC-13 y GCB-13.
- Determinar actividad enzimática de las celulasas producidas por las cepas GCC-13 y GCB-13 a diferentes temperaturas de incubación.

- Establecer la bacteria que presenta la mayor actividad de las enzimas celulolíticas producidas por las cepas bacterianas GCB-13 y GCC-13.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Cepas bacterianas GCC-13 y GCB-13, donados por el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna

2.2. Métodos

Diseño clásico o pasivo (Ayala, 1995). Consiste en el empleo solo una variable independiente en el experimento que se desea realizar.

2.2.3. Variables de la investigación

- Variable independiente: Cepas bacterianas GCC-13 y GCB-13.
- Variable dependiente: Producción y actividad enzimática de celulasas a diferentes temperaturas.

Indicadores de la variable dependiente: producción de proteínas totales y producción de azúcares reductores.

2.3. Tratamientos de la experimentación

Se empleó tres tratamientos para cepa bacteriana, tres repeticiones por tratamiento, una repetición por unidad experimental. Los tratamientos fueron:

- Tratamiento 1: cepa bacteriana incubada a 45° C.
- Tratamiento 2: cepa bacteriana incubada a 50° C.
- Tratamiento 3: cepa bacteriana incubada a 55° C.

2.4. Metodología

2.4.1. Aislamiento de las cepas bacterianas celulolíticas

- Se muestreó ocho géiseres y se recolectó una muestra por géiser, 350 mL de agua con sedimentos conteniendo 350 mL de agua y sedimento en frascos de vidrio de 500 mL de capacidad. En el laboratorio, de cada muestra se extrajo 1 mL y se colocó en 72 mL de caldo CMC. Este se incubó a 50 °C por 48hrs.
- El incubado se diluyó desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Se sembró cada dilución por estría en agar CMC e incubó a 50 °C por 48 horas.

- Se seleccionó colonias que presentaron mayor halo de hidrólisis a los cuales se les hizo tinción de Gram y se les suspendió en agua destilada contenido en un tubo de ensayo a partir del cual se le diluyó desde 10^{-1} hasta 10^{-5} .
- Se sembró inóculos desde las últimas diluciones sobre el agar CMC e incubó a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 hs. El procedimiento se repitió desde la obtención de la colonia hasta que se obtuvo colonias que presentaron las mismas formas microbianas, vistas al microscopio óptico.

Cuadro 1. Medio de cultivo Carboximetilcelulosa (CMC) para el crecimiento de microorganismos celulolíticos.

Agar CMC (Carboximetilcelulasa)	
Composición	g/L
Carboximetilcelulosa	10,0
Extracto de levadura	2,5
Peptona universal	2,5
Sulfato de amonio	0,5
Cloruro de calcio	0,5
Fosfato monobásico de potasio	0,1
Fosfato dibásico de potasio	0,1
Agar-agar	15,0
pH	7

Fuente: Gaitan, 2007

- Se guardaron los cultivos de las colonias aisladas a 4 °C como cultivo stock.

2.4.2. Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas celulolíticas

2.4.2.1. Caracterización macroscópica de las colonias: Se hizo considerando la forma, color, textura y diámetro del halo y la colonia proveniente del cultivo stock en agar CMC después de la incubación a 50 °C por 48hs.

2.4.2.2. Observaciones Microscópicas: para eso se hizo preparados en fresco y en seco coloreadas con Gram de las colonias obtenidas para la caracterización macroscópica. Se tuvo en cuenta en el microscopio de campo claro la forma y la coloración de las bacterias. Las características macroscópicas como microscópicas de las colonias sirvió para corroborar las características que ya habían sido informadas cuando fueron donadas las cepas bacterianas GCC-13 y GCB-13. Las características encontradas para estas cepas coincidieron con las informadas.

2.4.3. Identificación molecular de las cepas bacterianas GCB-13 y GCC-13

- Se tomó 2 mL de una suspensión en agua destilada de cada cepa bacteriana celulolítica y se agregó a 25 mL de CMC líquido contenido en un matraz de 50 mL.
- Se incubó a 50 °C con lecturas diarias de la concentración microbiana con cámara de Neubauer y un microscopio de campo claro hasta que cada cepa alcanzó una concentración de 10^8 cel/mL. Esta biomasa sirvió como inóculo para la identificación molecular y para cada experimentación de la producción de enzimas celulolíticas.
- Del inóculo microbiano de cada cepa celulolítica se tomó 1 mL para la purificación de ADN empleando el kit de extracción molecular Wizard.
- El ADN obtenido de cada cepa microbiana se refrigeró a -20 °C y se trasladó vía aérea a Corea del Sur para la amplificación y secuenciamiento del ADN.
- Finalmente, las bases nitrogenadas secuenciadas de cada cepa microbiana se sometieron a las herramientas

bioinformáticas: Blast server for bacterial identification, Ribosomal database Project y Ez Taxon, para la identificación molecular.

2.4.4. Inicio de la experimentación de producción de enzimas celulolíticas

Para cada cepa se preparó 9 frascos de 100 mL, en cada frasco se agregó 70 mL de caldo CMC con 1% de carboximetilcelulosa y 10% de inóculo microbiano con la concentración de 10^8 cel/mL. Los frascos finalmente se incubaron durante 96 horas a 45, 50 y 55 °C, y se airearon con 0,6 VVM.

2.4.5. Evaluación de la producción de celulasas y de la actividad enzimática de las celulasas

Las evaluaciones se hicieron tomando muestras de los frascos en incubación a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciada la experimentación.

Las muestras tomadas sirvieron para que en ellos se determinara proteínas totales por el método de Bradford como un indicador de la

producción de celulasas extracelulares por las cepas bacterianas considerando que estas enzimas son proteínas; así mismo para que también se determinara en estas muestras la producción de azúcares reductores por el método de DNS como un indicador de la actividad enzimática de las celulasas producidas por las cepas bacterianas sobre la celulosa que estuvo presente en el medio CMC contenido en los frascos incubados.

2.4.5.1. Determinación de la producción de celulasas a través de la determinación de proteínas totales por el método de Bradford

Se preparó una curva patrón con albumina sérica bovina (SAB) considerando las concentraciones de 30, 60, 90, 120 y 150 ug/mL. Y sus absorvancias determinadas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 595 nm. Estos valores de concentración de proteínas con sus respectivas absorvancias se graficaron para establecer la curva patrón. Se centrifugó por 20 minutos a 4000 rpm cada muestra de 1,5 mL y se tomó 1mL del sobrenadante para ser mezclado

con 5mL del reactivo de Bradford y se midió en el espectrofotómetro absorbancia una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976). El valor obtenido de absorbancias se comparó luego con el de absorbancias de la curva patrón para establecer a que concentración de proteínas correspondió y por tanto de enzimas.

2.4.5.2. Determinación de la actividad enzimática a través de la determinación de azúcares reductores por el método del DNS (ácido dinitrosalicílico)

Se centrifugó cada muestra de 1,5mL por 20 minutos a 4000 rpm, del sobrenadante, se tomó 0,25 mL y se le mezcló con 0,25mL del reactivo DNS. La mezcla en tubos de ensayos se llevó a baño maría hasta ebullición por 5 minutos. Luego se enfrió los tubos con hielo y se le agregó 2,5mL de agua destilada para medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm (Miller, 1959). El valor obtenido de la absorbancia se comparó luego con el de absorbancias de la curva patrón para establecer a que

concentración de proteínas correspondió y por tanto de actividad enzimática. Se preparó una curva patrón con glucosa con las concentraciones de 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ug/mL y sus respectivas absorbancias determinadas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 540 nm. Estos valores de concentración de azúcares reductores con sus respectivas absorbancias se graficaron para establecer la curva patrón.

Las concentraciones de proteínas totales como de azúcares reductores versus el tiempo se graficaron por separado para establecer las curvas de producción de proteínas totales y azúcares reductores respectivamente.

2.4.6. Determinación de la producción máxima de celulasas producidas por las cepas bacterianas

- Se determinó para cada temperatura, sometiendo a todos los valores de concentración de proteínas totales para una

temperatura en particular a análisis de varianza y a la prueba de Tuckey.

- Las concentraciones máximas de proteínas totales obtenidas para las diferentes temperaturas fueron sometidas a la prueba de ANOVA y a la prueba de Tuckey para establecer la temperatura en la que hubo mayor producción de proteínas totales y por tanto de celulasas.

2.4.7. Determinación de la actividad enzimática máxima de celulasas producidas por las cepas bacterianas

- Se determinó para cada temperatura sometiendo todos los valores de concentración de azúcares reductores para cada una temperatura en particular a análisis de varianza y a la prueba de Tuckey.
- Las concentraciones máximas de azúcares reductores obtenidas para las diferentes temperaturas fueron sometidas a la prueba de ANOVA y a la prueba de Tuckey para establecer la temperatura en la que hubo mayor producción de azúcares reductores y por tanto de actividad enzimática.

III. RESULTADOS

Características microbiológicas de las cepas bacterianas GCC-13 y GCB-13

3.1. Características macroscópicas de las colonias

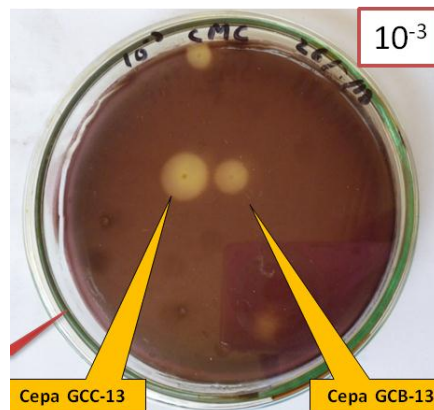


Figura 3. Colonias y halos de degradación de celulosa de las cepas bacterias GCC-13 y GCB-13 vistas macroscópicamente.

En la figura 3 la cepa GCC-13 se muestra como colonias redondeadas de color crema, de bordes irregulares. Mientras que la cepa GCB-13 presenta colonias de borde irregular, plana, textura lisa y color crema.



Figura 4. Colonia de la cepa GCB-13.

En la figura 4 se observa la colonia de la cepa GCB-13 vista en el microscopio de campo claro a 100 aumentos, se aprecia en la colonia bordes lobulados poco definidos con una zona central más densa y circular.

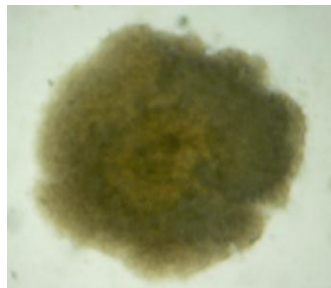


Figura 5. Colonia de la cepa GCC-13.

En la figura 5 se muestra la colonia de la cepa GCC-13 vista en el microscopio de campo claro a 100 aumentos, la colonia es densa y presenta bordes irregulares ligeramente más claros que la zona central.

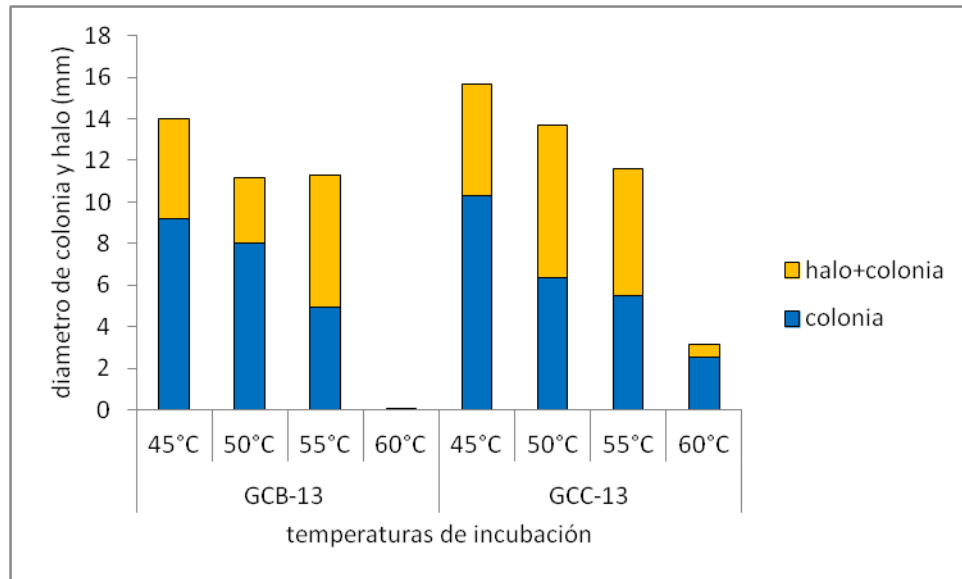


Figura 6. Diámetro de las colonias y de halos más colonias de las cepas celulolíticas a diferentes temperaturas en agar CMC. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 6 se muestra el diámetro de la colonia de las cepas GCB-13 y GCC-13 a las temperaturas de 45, 50 y 55 °C donde se aprecia que se produce un mayor diámetro de colonia y de halo tanto para la cepa GCB-13 y GCC-13 a la temperatura de 45 °C.

3.2. Caracterización microscópica de las cepas

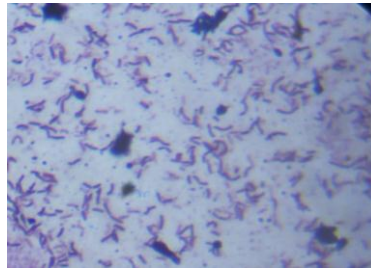


Figura 7. Preparado en seco, coloreado con Gram y observado al microscopio de campo claro con 1000 aumentos de la cepa bacteriana GCB-13.

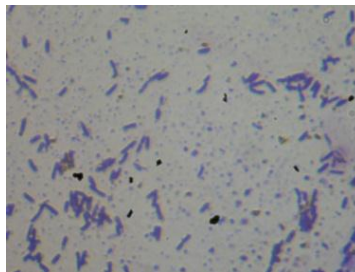


Figura 8. Preparado en seco, coloreado con Gram y observado al microscopio de campo claro con 1000 aumentos de la cepa bacteriana GCC-13.

En las figuras 7 y 8 se muestran que las cepas son bacilos Gram positivos de pequeño tamaño, la cepa GCC-13 son bacilos gram positivos ligeramente más anchos que en la cepa GCB-13.

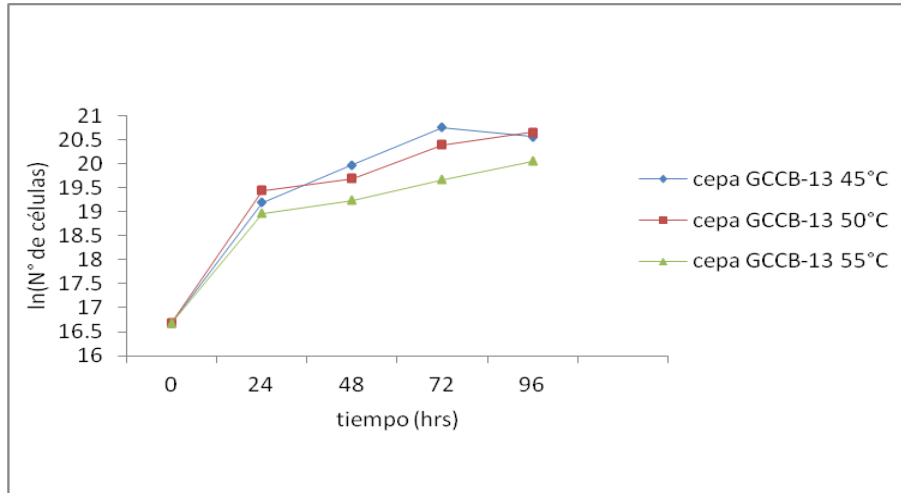


Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa celulolítica GCB-13 a 45, 50 y 55 °C. Fuente: Elaboración propia.

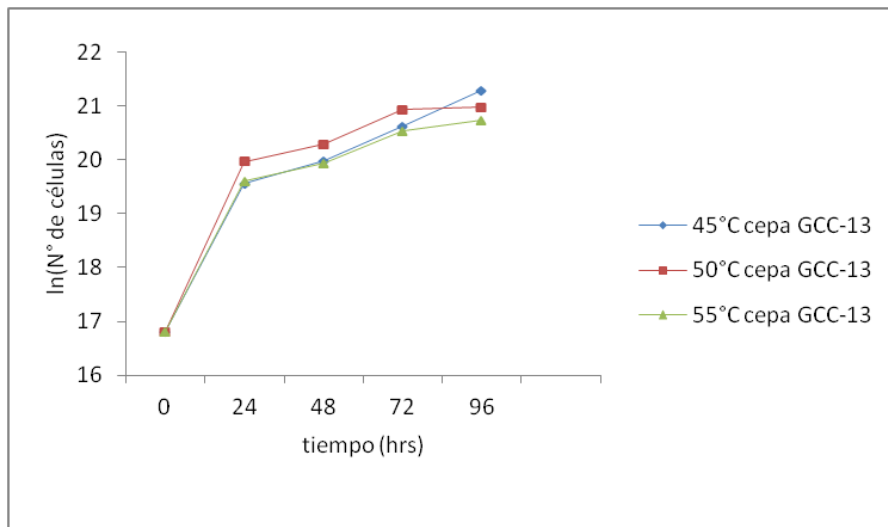


Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa celulolítica GCC-13 a 45, 50 y 55 °C. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 9 se muestra un mayor e igual crecimiento de la cepa GCB-13 a 45 °C y 50 °C y menor crecimiento a 55 °C, mientras que en la figura 10 correspondiente a la cepa GCC-13 se observa un menor e igual crecimiento a 45 y 55 °C y mayor crecimiento a 50 °C. En los tres casos de cada cepa se da el mayor crecimiento a las 96 horas de incubación.

3.3. Identificación molecular de las cepas bacterianas GCB-13 y GCC-13

3.3.1. Extracción de ADN de las cepas celulolíticas GCB-13 y GCC-13

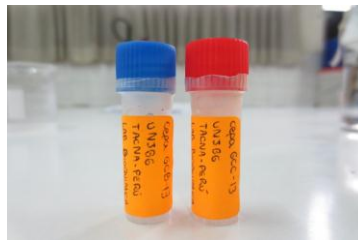


Figura 11. Conservación de ADN de las cepas celulolíticas GCB-13 y GCC-13.

En la figura 11 se observa los frascos que contienen el ADN purificado de las cepas microbianas GCB-13 y GCC-13 mediante el kit Wizard.

3.3.2. Análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de las cepas celulolíticas

Cuadro 2. Identificación molecular de las cepas microbianas GCB-13 y GCC-13 empleando las bases de datos: Blast server for bacterial identification, Ribosomal database Project y Ez Taxon.

CEPA	BASE DE DATOS						IDENTIFICACION GENERO/ESPECIE
	BLAST SERVER FOR BACTERIAL IDENTIFICATION		RIBOSOMAL DATABASE PROJECT		EZ TAXON		
	Género/especie	identidad	Género/especie	S_ab score	Género/especie	Similitud	
GCB-13	<i>Bacillus licheniformis</i>	97 %	<i>Bacillus licheniformis</i>	95,10 %	<i>Bacillus sonorensis</i>	97,91 %	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Bacillus</i> sp.	97 %	<i>Bacillus</i> sp.	95,40%			
GCC-13	<i>Paenibacillus azoreducens</i>	89 %	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	61,8 %	<i>Paenibacillus azoreducens</i>	94,50 %	<i>Paenibacillus</i> sp.
					<i>Bacillus sonorensis</i>	97,91 %	

Fuente: Elaboración propia.

3.4. Producción de celulasas a través de la determinación de proteínas totales en la cepa GCB-13.

Cuadro 3. Proteínas totales (ug/mL) producido por la cepa GCB-13 con sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Repeticiones del experimento	Temperaturas		
	45 °C	50 °C	55 °C
R1	130,54	87,08	97,08
R2	121,69	101,3	93,23
R3	155,15	117,46	100,92
Promedio	135,79	101,95	97,08

Fuente: Elavoración propia.

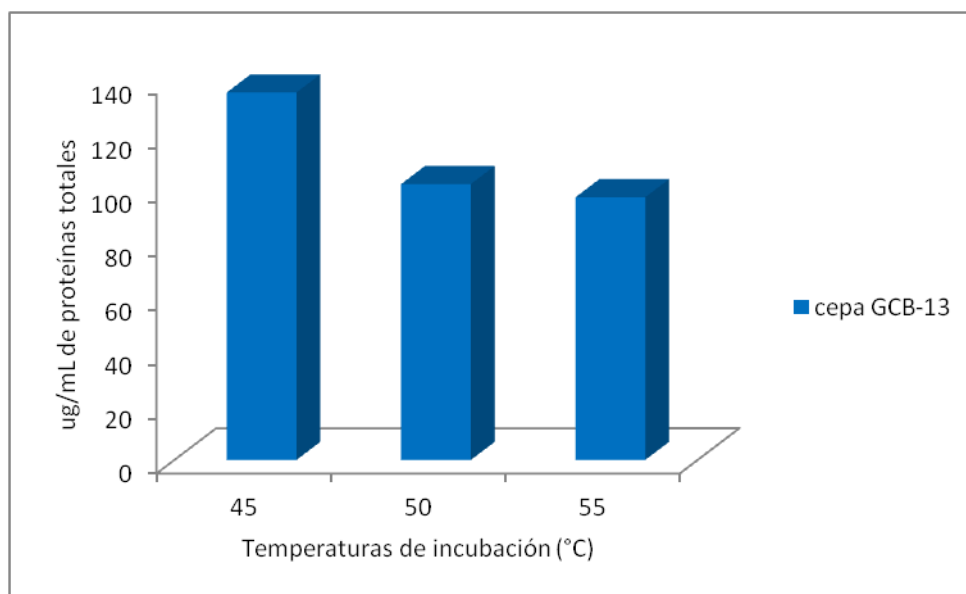


Figura 12. Representación en barras de las proteínas totales producidos por la cepa GCB-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura. Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 3, figura 12 se muestra mayor producción de proteínas totales a 45 °C con un valor de 135,79 ug/mL por parte de la cepa GCB-13. En análisis de Varianza se determinó que no existe un grado de significancia en la producción de proteínas totales y la temperatura (anexo 14).

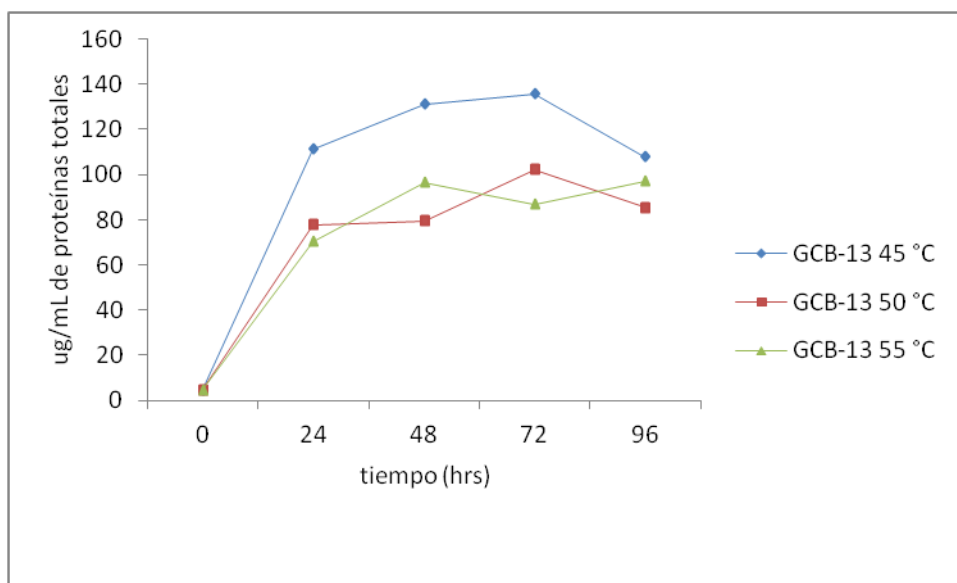


Figura 13. Curvas de producción de proteínas totales de la cepa celulolítica GCB-13 a 45, 50 y 60 °C. Fuente: Elaboración propia

En la figura 13 se observa una mayor producción de proteínas totales a 45 °C y a las 72 horas, mientras que a temperaturas de 50 y 55 °C se observa una menor e igual producción de proteínas totales.

3.5. Actividad enzimática de las celulasas a través de la determinación de azúcares reductores en la cepa GCB-13.

Cuadro 4. Azúcares reductores (ug/mL) producidos por la cepa GCB-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura

Repeticiones del experimento	Temperaturas		
	45 °C	50 °C	55 °C
R1	656,67	386,67	116,67
R2	666,67	643,33	196,67
R3	736,67	543,33	196,67
Promedio	686,67	524,44	170,00

Fuente: Elaboración propia.

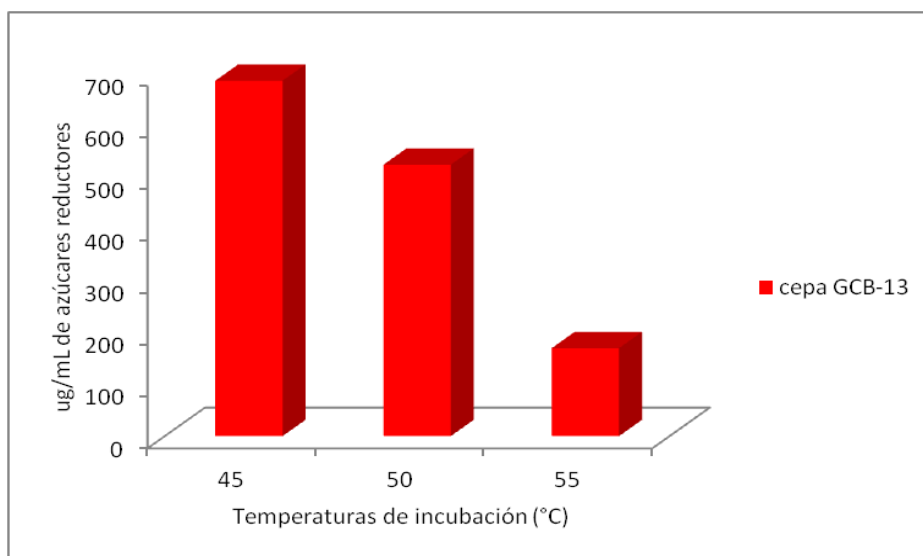


Figura 14. Representación en barras de azúcares reductores producidos por la cepa GCB-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura. Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 4, figura 14 se muestra mayor producción de azúcares reductores a 45 °C con un valor de 686,67 ug/mL por parte de la cepa GCB-13. En análisis de Varianza se determinó que existe diferencia significativa en la producción de azúcares reductores a diferentes temperaturas (anexo 15, 16 y 17). Por tanto diferencias en las actividades enzimáticas a diferentes temperaturas.

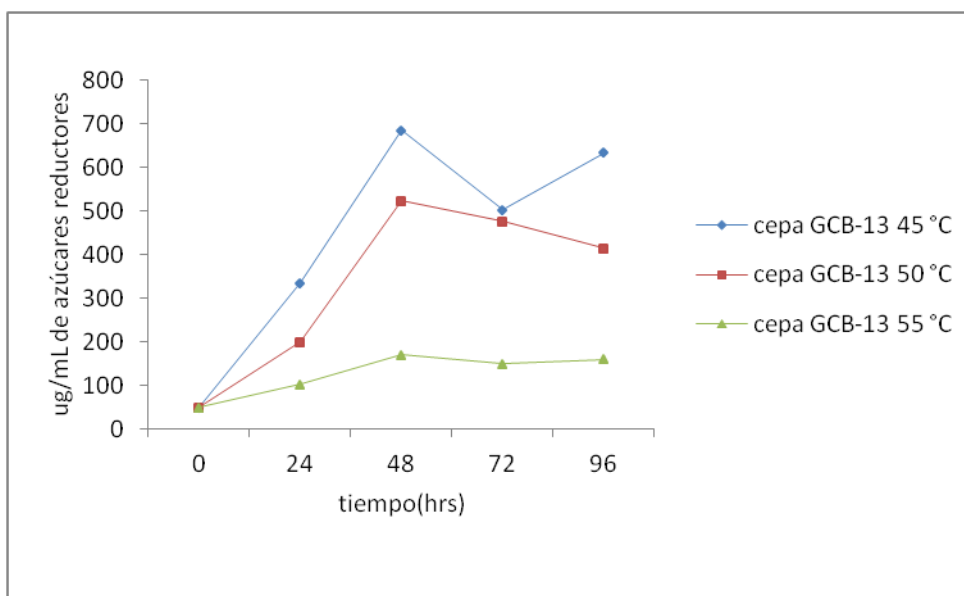


Figura 15. Curvas de producción de azúcares reductores de la cepa celulolítica GCB-13 a 45 °C, 50 °C y 60 °C. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 15 se observa que la producción de azúcares reductores a va disminuyendo conforme aumenta la temperatura, la mayor producción se observa a 45 °C a las 48 horas.

3.6. Producción de celulasas a través de la determinación de proteínas totales a en la cepa GCC-13

Cuadro 5. Proteínas totales (ug/mL) producidas por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Repeticiones del experimento	Proteínas totales		
	45 °C	50 °C	55 °C
R1	241,31	178,62	102,46
R2	130,54	92,46	91,31
R3	172,08	110,15	129,77
Promedio	181,31	127,08	107,85

Fuente: Elavoración propia

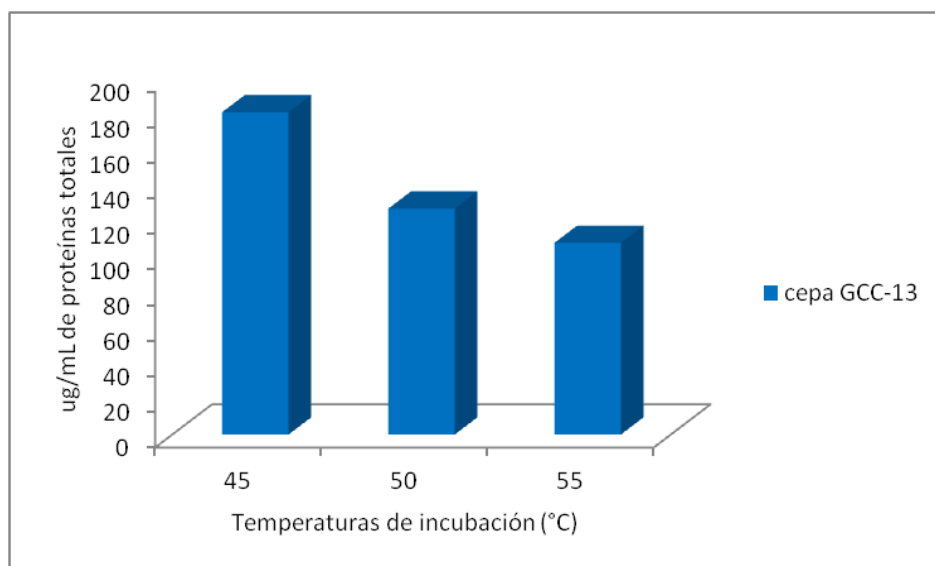


Figura 16. Representación en barras de las proteínas totales producidas por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura. Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 5 figura, 16 se muestra mayor producción de proteínas totales a 45 °C con un valor de 181,31 ug/mL por parte de la cepa GCC-13. En análisis de Varianza se determinó que no existe un grado de significancia en la producción de proteínas totales y la temperatura. Ver anexo 14.

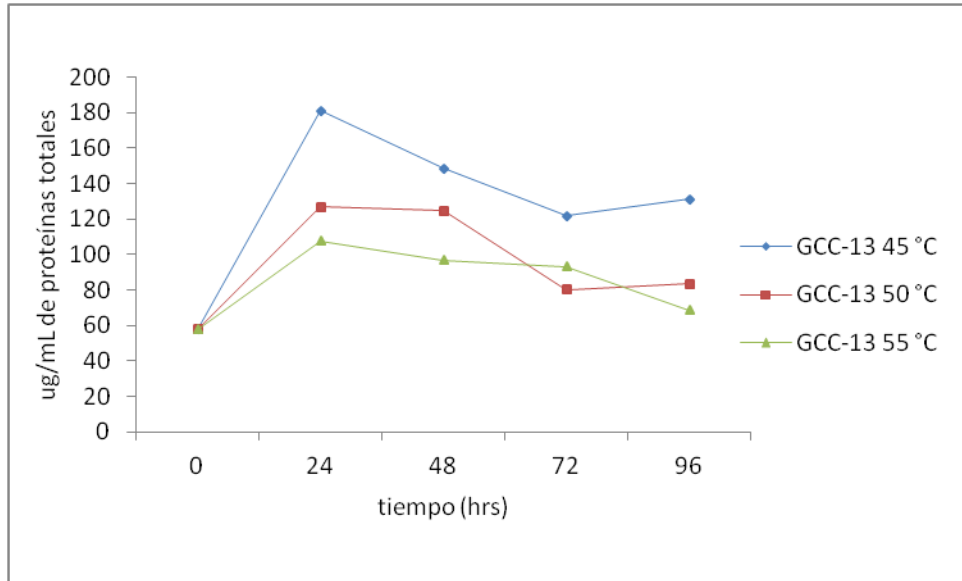


Figura 17. Curvas de producción de proteínas totales de la cepa celulolítica GCC-13 a 45, 50 y 60°C. Fuente: Elavoración propia.

En la figura 17 se observa una mayor producción de proteínas totales a 45 °C y a las 24 horas, mientras que a temperaturas de 50 y 55 °C se observa una disminución en la producción.

3.7. Actividad enzimática de las celulasas a través de la determinación de azúcares reductores en la cepa GCC-13.

Cuadro 6. Azúcares reductores producidos por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura.

Repeticiones del experimento	Azúcares reductores		
	45 °C	50 °C	55 °C
R1	20	350	226,67
R2	33,33	76,67	146,67
R3	280	366,67	96,67
Promedio	111,11	264,45	156,67

Fuente: Elaboración propia.

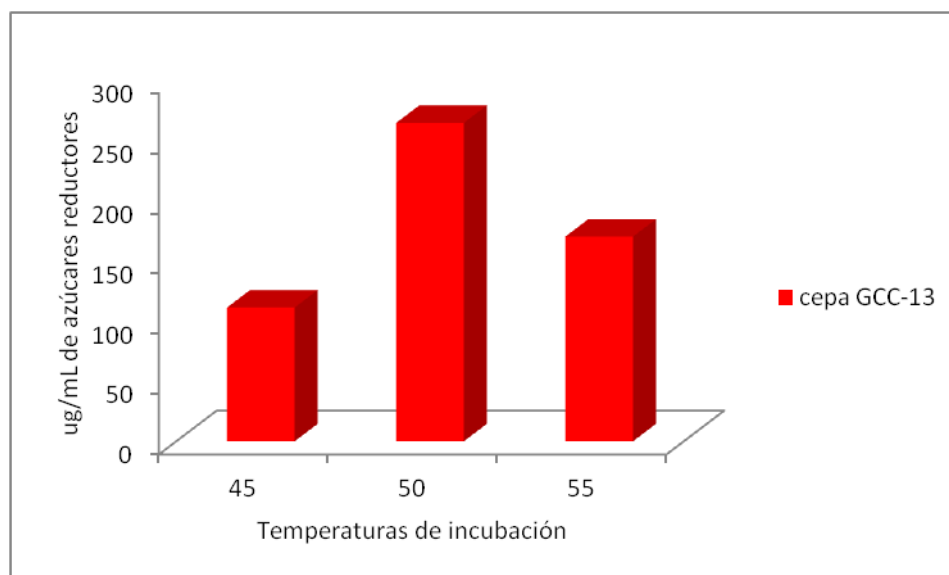


Figura 18. Representación en barras de los azúcares reductores producidos por la cepa GCC-13 en sus tres repeticiones (R) por temperatura. Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 6, figura 18 se muestra mayor producción de azúcares reductores a 50 °C con un valor de 264,45 ug/mL por parte de la cepa GCC-13. En análisis de Varianza se determinó que no existe un grado de significancia en la producción de azúcares reductores y la temperatura. Ver anexo 15, 16 y 17.

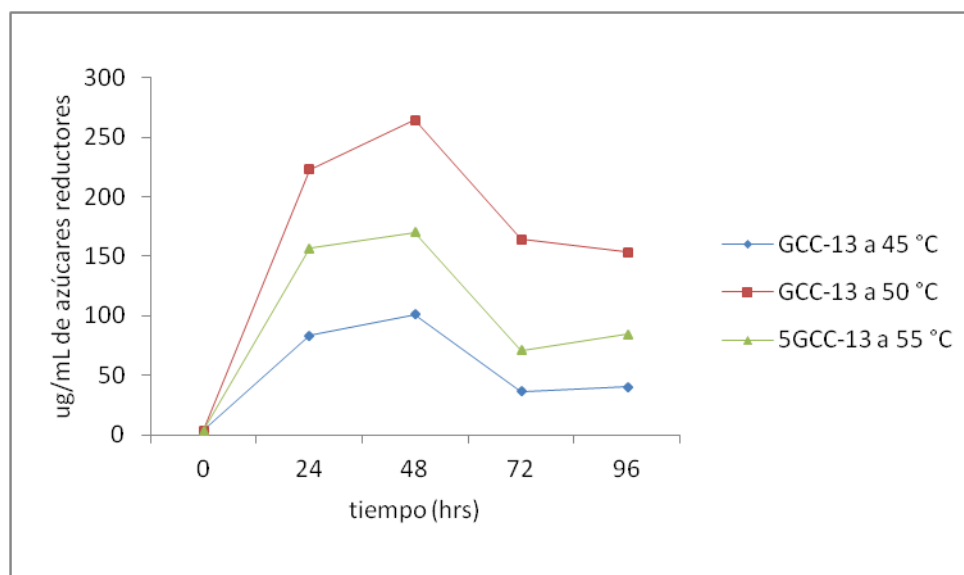


Figura 19. Curvas de producción de azúcares reductores de la cepa celulolítica GCC-13 a 45, 50 y 60 °C. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 19 se observa que la producción de azúcares reductores a va disminuyendo conforme aumenta la temperatura, la mayor producción se observa a 45 °C a las 48 horas.

IV. DISCUSIÓN

Microorganismos celulolíticos

Las cepas celulolíticas rotuladas con el código GCB-13 y GCC-13 aisladas de ocho géiseres de Calientes, Candarave-Tacna fueron caracterizadas microscópicamente y se determinó la presencia de bacterias Gram (+). En medio sólidos se observó el crecimiento de colonias blancas de 4.9 y 9.2 mm y cremas de 2.5 y 10.3 mm respectivamente, las cuales fueron identificadas mediante el secuenciamiento molecular y el empleo de herramientas bioinformáticas, encontrándose a los géneros *Bacillus sp* y *Paenibacillus sp*. Los trabajos reportados por (Ahmad y Baker, 1987; Meyer, 1994; Khalid *et al.*, 2006) indican la capacidad del género *Bacillus* de degradar la celulosa. Se conoce también que *Paenibacillus* puede actuar sobre la celulosa y el xilano, entre los miembros de degradación del género *Paenibacillus* incluyen la especie *P. barcinonensis*, *P. campinasensis*, *P. curdlanolyticus*, *P. favisporus*, *P. phyllosphaerae*, *P. xylanilyticus*, *P.panacisoli*, *P. siamensis*, *P. septentrionalis*, *P. montaniterrae*, *thailandensis P.* y *P. nanensis*, así como no

identificados *Paenibacillus* spp.(Khianggam *et al.*, 2009a, b; Ko *et al.* , 2007 ; Pason *et al.*, 2006; Rivas *et al.* , 2005a, b, c , 2006; Sánchez *et al.*, 2005; Velázquez *et al.*, 2004; Wang *et al.* , 2008). El género *Paenibacillus* se puede encontrar en ambientes aerobios de elevada temperatura y con presencia de restos vegetales, como lo indica Wang *et al.* 2008.

Capacidad enzimática de las cepas aisladas

La mayor producción de proteínas totales (181.31ug/mL) observada en *Paenibacillus* sp (GCC-13) a 45 °C nos indica una mayor estabilidad térmica de esta bacteria para la producción de celulasas ya que *Bacillus* sp (GCB-13) tuvo menor producción de proteínas totales, así mismo esta mayor producción de proteínas totales a 45 °C y no a 50 °C ó 55 °C nos muestra una relación inversa entre la producción de proteínas totales con la temperaturas ya que a menor temperatura se obtuvo mayor producción de celulasas.

La mayor producción de azúcares reductores (686.67 ug/mL) y por tanto la actividad enzimática observada en *Bacillus* sp (GCB-13) a 45 °C nos indica una mayor capacidad celulolítica de esta bacteria en función de la actividad

enzimática de celulasas ya que *Paenibacillus* sp (GCC-13) tuvo menor producción de azúcares reductores, así mismo esta mayor producción de azúcares reductores a 45 °C y no a 50 °C ó 55 °C nos muestra una relación inversa entre la actividad enzimática y la temperatura ya que a menor temperatura se obtuvo una mayor actividad enzimática.

Por reportes, en relación a bacterias, se encontró que su mayor actividad enzimática se produjo a las 48 horas del proceso de evaluación (Viviano, 2011, Acharya y Chaudhar, 2011). Esto concuerda con lo encontrado para *Bacillus* sp que presentó una mayor actividad enzimática a 45 °C y a las 48 horas de proceso de evaluación.

Los dos microorganismos con capacidad celulolítica obtenidos con una mayor actividad enzimática a 45 °C nos demuestra que no siempre los microbios procedentes de ambientes termófilos con temperaturas más elevadas tienen que tener una temperatura igual para que en ella se manifieste una mayor actividad enzimática. En manantiales geotermales se han encontrado microbios termófilos que han mostrado mayor actividad enzimática 60 °C (Viviano, 2011).

V. CONCLUSIONES

- Los microorganismos celulolíticos aislados de los géiseres de Calientes-Candarave y posteriormente secuenciados molecularmente corresponden, según análisis bioinformático, a bacilos Gram positivos de los géneros *Bacillus* sp y *Paenibacillus* sp. los cuales tuvieron una mayor actividad enzimática a temperaturas de incubación entre 45 y 55°C. El crecimiento de la cepa GCB-13 en agar CMC formó colonias redondeadas de color blanco por el anverso y reverso con bordes ondulantes presentando un mayor halo a la temperatura de 55°C correspondiente a 4,4 mm de diámetro de colonia y de 11 mm de halo más colonia, mientras que la cepa GCC-13 formó colonias redondeadas de color crema de bordes ondulantes presentando un mayor halo a la temperatura de 55 °C correspondiente a 6 mm de diámetro de colonia y de 11.9 mm de diámetro de colonia mas halo.

- La relación entre la producción de azúcares reductores y proteínas totales de la cepa GCB-13 al finalizar el proceso es la siguiente: a 45 °C se produce por cada ug/mL de proteínas totales 4.58 ug/mL de azúcares reductores, a 50 °C se produce por cada ug/mL de proteínas totales 3.24 ug/mL de azúcares reductores, a 55 °C se produce por cada ug/mL de proteínas totales 3.58 ug/mL de azúcares reductores, mientras que en la cepa GCC-13 a 45 °C produce por cada ug/mL de proteínas totales 3.58 ug/mL de azúcares reductores, a 50 °C produce por cada ug/mL de proteínas totales 4.56 ug/mL de azúcares reductores, a 55 °C produce por cada ug/mL de proteínas totales 4.25 ug/mL de azúcares reductores.
- Se determinó que la producción de proteínas totales de la cepa GCB-13 no presenta diferencias significativas a temperaturas de incubación de 45 °C, 50 °C y 55 °C, pero sí en la producción de azúcares reductores donde se determinó una mayor productividad a 45 °C y 50 °C, mientras que en la cepa GCC-13 no se encontró diferencias significativas en la producción de proteínas totales y

azúcares reductores a tres temperaturas de incubación por lo que se concluye que existe un rango más amplio respecto a productividad de la enzima celulolítica y la productividad de azúcares reductores.

VI. RECOMENDACIONES

- Determinar los tipos de enzimas celulolíticas que producen estas cepas microbianas aisladas de los géiseres de Calientes-Candarave.
- Evaluar la actividad enzimática de las cepas aisladas en diferentes sustratos celulolíticos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdeev, R. M., Abdeeva I. A., Bruskin S. S., Musiychuk K. A., Goldenkova-Pavlova IV. y Piruzian ES. (2009). Bacterial thermostable beta-glucanases as a tool for plant functional genomics. *Gene*. May 1; 436(1-2):81-9.

Acharya, S. y Chaudhary A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Braz J Microbiol*. Jul; 43(3):844-56.

Acharya S. y Chaudhary, A. (2011). Effect of nutritional and environmental factors on cellulase activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. *J Sci Ind Res*. 70 Feb. 142-148.

Ahmad J.S. y Baker R. (1987). Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 77: 358-362.

Akbarzadeh, A., Ranaei Siadat S. O., Motallebi M., Zamani M. R., Barshan Tashnizi M. y Moshtaghi S. (2014). Characterization and high level expression of acidic endoglucanase in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*. Feb; 172(4):2253-65.

Allgaier, M., Reddy, A., Park, J. I., Ivanova, N., D'haeseleer, P., Lowry S., Saprà R., Hazen T. C., Simmons B. A., VanderGheynst J. S. y Hugenholtz P. (2010). Targeted discovery of glycoside hydrolases from a switchgrass-adapted compost community. *PLoS One*. 2010 Jan 21; 5(1):e8812.

Angelov, A., Loderer, C., Pompei, S. y Liebl, W. (2011). Novel family of carbohydrate-binding modules revealed by the genome sequence of *Spirochaeta thermophila* DSM 6192. *Appl Environ Microbiol*. Aug; 77(15):5483-9.

Arifoglu, N. y Ögel ZB. (2000). Avicel-adsorbable endoglucanase production by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* type culture *Torula thermophila*. *Enzyme Microb Technol*. Nov 1; 27(8):560-569.

Atlas, R. M. y Bartha, R. (2005). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4ª edición. *Pearson Educación, S.A.* Madrid, España. pp. 398-400.

Avitia, C. I., Castellanos-Juárez, F. X., Sánchez, E., Téllez-Valencia, A., Fajardo-Cavazos, P., Nicholson W. L. y Pedraza-Reyes M. (2000). Temporal secretion of a multicellulolytic system in *Myxobacter* sp. AL-1. Molecular cloning and heterologous expression of cel9 encoding a modular endocellulase clustered in an operon with cel48, an exocellobiohydrolase gene. *Eur J Biochem. ec*; 267(24):7058-64.

Ayala, J. y Pardo, R. (1995). Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. 1era edición. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima, Perú. pp. 40-41.

Azevedo M de O., Felipe, M. S., Astolfi-Filho, S. y Radford A. (1990). Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *J Gen Microbiol. Dec*; 136(12):2569-76.

Badhan, A. K., Chadha, B. S., Kaur, J., Saini, H. S. y Bhat M. K. (2007). Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour Technol. Feb*; 98(3):504-10.

Beadle, B. M., Baase, W. A., Wilson, D. B., Gilkes, N. R. y Shoichet, B. K. (1999). Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme. *Biochemistry. Feb 23*; 38(8):2570-6.

Béguin, P., Cornet, P. y Aubert, J. P. (1985). Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol.* Apr; 162(1):102-5.

Béguin, P., Millet, J. y Aubert, J. P. (1992). Cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*: from manure to molecular biology. *FEMS Microbiol Lett.* Dec 15; 100(1-3):523-8.

Béguin, P. y Aubert, J. P. (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Revs.* 13:25-58.

Bélaich, J. P., Tardif, C., Bélaich, A. y Gaudin, C. (1997). The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J Biotechnol.* Sep 16; 57(1-3):3-14.

Bhat, K. M. y Maheshwari, R. (1987). *Sporotrichum thermophile* Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity. *Appl Environ Microbiol.* Sep; 53(9):2175-82.

Bischoff, K. M., Rooney, A. P., Li, X. L., Liu, S. y Hughes, S. R. (2006). Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderatelythermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett.* Nov; 28(21):1761-5.

Borgia, P. T. y Dodge, C. L. (1992) Characterization of *Aspergillus nidulans* mutants deficient in cell wall chitin or glucan. *J. Bacteriol.* 174(2):377-383.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microGram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72:248-254.

de Queiroz Brito-Cunha, C. C., de Campos, I. T. N., de Faria, F. P., y Bataus, L. A. M. (2013). Screening and xylanase production by *Streptomyces* sp. grown on lignocellulosic wastes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(3), 598-608.

Bronnenmeier, K., Adelsberger, H., Lottspeich, F. y Staudenbauer, W. L. (1996). Affinity purification of cellulose-binding enzymes of *Clostridium stercorarium*. *Bioseparation*. Feb; 6(1):41-5.

Brunecky, R., Alahuhta, M., Xu, Q., Donohoe, B. S., Crowley, M. F., Kataeva, I. A., Yang, S. J., Resch, M. G., Adams, M. W., Lunin, V. V., Himmel, M. E. y Bomble, Y. J. (2013). Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. *Science*. Dec 20; 342(6165):1513-6.

Busk, P. K y Lange L. (2013). Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. *AMB Express*. Aug 19; 3(1):47.

Cao, G. L., Zhao, L., Wang, A. J., Wang, Z. Y. y Ren, N. Q. (2014). Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderatelythermophilic bacteria. *Biotechnol Biofuels*. Jun 3; 7:82.

Chaffotte, A. F., Guillou, Y. y Goldberg, M. E. (1992). Inclusion bodies of the thermophilic endoglucanase D from *Clostridium thermocellum* are made of native enzyme that resists 8 M urea. *Eur J Biochem*. Apr 1; 205(1):369-73.

Chaikaew, S., Maeno, Y., Visessanguan, W., Ogura, K., Sugino, G., Lee, S. H. y Ishikawa, K. (2012). Application of thermophilic enzymes and water jet system to cassava pulp. *Bioresour Technol*. Dec; 126:87-91.

Chaiyaso, T., Kuntiya, A., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P. y Hanmoungjai, P. (2011). Optimization of cellulase-free xylanase production by thermophilic *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75(3):531-7.

Chandrasekaran, A., Bharadwaj, R., Park, J. I., Sapra, R., Adams, P. D. y Singh, A. K. (2010). A microscale platform for integrated cell-free expression and activity screening of cellulases. *J Proteome Res.* Nov 5; 9(11):5677-83.

Chen, Z., Pereira, J. H., Liu, H., Tran, H. M., Hsu, N. S., Dibble, D., Singh, S., Adams, P. D., Sapra R., Hadi MZ., Simmons BA. y Sale KL. (2013). Improved activity of a thermophilic cellulase, Cel5A, from *Thermotoga maritima* on ionic liquid pretreated switchgrass. *PLoS One.* Nov 14; 8(11):e79725.

Chen, H., Li, X.-L. y Ljungdahl, L. G. (1997) Sequencing of a 1,3-1,4- β -D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: Properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. *J. Bacteriol.* 179(19): 6028-6034.

Cheng, X., Hiras, J., Deng, K., Bowen, B., Simmons, B. A., Adams, P. D., Singer, S. W. y Northen, T. R. (2013). High throughput nanostructure-initiator mass spectrometry screening of microbial growth conditions for maximal β -glucosidase production. *Front Microbiol.* Dec 6; 4:365.

Chesson, A., Forsberg, C. W. y Grenet, E. (1995). Improving the digestion of plant cell walls and fibrous feeds. In: Recent developments in the nutrition of herbivores, M. Journet, E. Grenet, M.-H. Farce, M. Theriez, C. Demarquilly

(eds). Proceedings of the IVth international symposium on the nutrition of herbivores, pp. 249-277. INRA Editions, Paris.

Chong, B. F., Harrison, M. D. y O'Hara, I. M. (2014). Stability of endoglucanases from mesophilic fungus and thermophilic bacterium in acidified polyols. *Enzyme Microb Technol.* Jul-Aug; 61-62:55-60.

Collins, C. M., Murray, P. G., Denman, S., Morrissey, J. P., Byrnes, L., Teeri, T. T. y Tuohy, M. G. (2007). Molecular cloning and expression analysis of two distinct beta-glucosidase genes, *bg1* and *aven1*, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. *Mycol Res.* Jul; 111(Pt 7):840-9.

Copa-Patino, J. L., Reyes, F. y Perez-Leblic, M. I. (1989) Purification and properties of a 1,3- β -glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *FEMS Microbiol. Lett.* 65:285-292.

Crennell, S. J., Hreggvidsson, G. O. y Nordberg Karlsson, E. (2002). The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* Jul 19; 320(4):883-97.

Crennell, S. J., Hreggvidsson, G. O. y Nordberg Karlsson, E. (2002). The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* Jul 19; 320(4):883-97.

Creuzet, N. y Frixon, C. (1983). Purification and characterization of an endoglucanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium. *Biochimie.* Feb; 65(2):149-56.

Cruz, N., Castellanos, D. y Argüello, H. (2009). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la sabana de Bogotá. *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 3(2):237-249.

Cuervo, L., Folch, J. L. y Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología.* 13(3):11-25.

Demain, A. L., Newcomb, M. y Wu, J. H. (2005). Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar; 69(1):124-54.

Deng, Y. y Fong, S. S. (2010). Influencia de cultivo de aireación en la celulasa actividad de *Thermobifida fusca*. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jan; 85 (4): 965-74.

Deng, Y. y Fong, S. S. (2010). Development and application of a PCR-targeted gene disruption method for studying CelR function in *Thermobifida fusca*. *Appl Environ Microbiol.* Apr; 76(7):2098-106.

Dimarogona, M., Topakas, E., Olsson, L. y Christakopoulos, P. (2012). Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*. *Bioresour Technol.* Apr; 110:480-7.

Durrant. L. R., Mello, A. B. y Reginatto, V. (1992). Cellulase production by thermophilic fungi. *Biochem Soc Trans.* May; 20(2):227S.

Fauth, U., Romaniec, M. P., Kobayashi, T. y Demain, A. L. (1991). Purification and characterization of endoglucanase Ss from *Clostridium thermocellum*. *Biochem J.* Oct 1; 279 (Pt 1):67-73.

Fennington, G., Neubauer, D. y Stutzenberger, F. (1984). Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. *Appl Environ Microbiol.* Jan; 47(1):201-4.

Fennington, G., Lupo, D. y Stutzenberger, F. (1982). Enhanced cellulase production in mutants of *Thermomonospora curvata*. *Biotechnol Bioeng.* Nov; 24(11):2487-97.

Gaitan, D. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial.

García, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*. España: Ediciones mundi Prensa.

Gindy, A. A. (1991). Production of cellulase(s) by *Myriococcum albomyces*. *Zentralbl Mikrobiol.* 146(3):193-6.

Gladden, J. M., Park JI., Bergmann J., Reyes-Ortiz V., D'haeseleer P., Quirino BF., Sale KL., Simmons BA. y Singer SW. (2014). Discovery and characterization of ionic liquid-tolerant thermophilic cellulases from a switchgrass-adapted microbial community. *Biotechnol Biofuels*. Jan 29; 7(1):15.

Gomes, I., Gomes, J., Gomes, D. J. y Steiner, W. (2000). Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and beta-glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Apr; 53(4):461-8.

Gomes, I., Saha, R. K., Mohiuddin, G. y Hoq, M. M. (1992). Isolation and characterization of a cellulase-free pectinolytic and hemicellulolytic thermophilic fungus. *World J Microbiol Biotechnol.* Nov; 8(6):589-92.

Gray, K. A., Zhao, L. y Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10(2):141-146.

Grigorevski, A. L., Da Vinha, F. N., Souza, D. T., Bispo, A. S., Bon, E. P., Coelho, R. R. y Nascimento, R. P. (2009). *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Appl Biochem Biotechnol.* May; 155(1-3):321-9.

Guimarães, B. G., Souchon, H., Lytle, B. L., Wu, J. D., y Alzari, P. M. (2002). The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase CelS, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Journal of molecular biology*, 320(3), 587-596.

Halldórsdóttir, S., Thóroldsdóttir, E. T., Spilliaert, R., Johansson, M., Thorbjarnardóttir, S. H., Palsdóttir, A., Hreggvidsson, G. O., Kristjánsson, J. K., Holst, O. y Eggertsson, G. (1998). Cloning, sequencing and overexpression of a *Rhodothermus marinus* gene encoding a thermostable

cellulase of glycosyl hydrolase family 12. *Appl Microbiol Biotechnol.* Mar; 49(3):277-84.

Healy, F. G., Ray, R. M., Aldrich, H. C., Wilkie, A. C., Ingram, L. O. y Shanmugam, K. T. (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* Aug-Sep; 43(4):667-74.

Hernández-Santoyo, A., García-Hernández, E. y Rodríguez-Romero, H. (1999). Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 43(3-4):137-142.

Hirvonen, M. y Papageorgiou, A. C. (2002). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a family 45 endoglucanase from the thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Feb; 58(Pt 2):336-8.

Hirvonen, M. y Papageorgiou, A. C. (2003). Crystal structure of a family 45 endoglucanase from *Melanocarpus albomyces*: mechanistic implications

based on the free and cellobiose-bound forms. *J Mol Biol.* Jun 6; 329(3):403-10.

Hong, J., Tamaki, H., Yamamoto, K. y Kumagai, H. (2003). Cloning of a gene encoding a thermo-stable endo-beta-1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Biotechnol Lett.* Apr; 25(8):657-61.

Hreggvidsson, G. O., Kaiste, E., Holst, O., Eggertsson, G., Paldottir, A. y Kristjansson, J. K. (1996). An extremely thermo stable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marines*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8):3047-3049.

Ishihara, M., Tawata, S. y Toyama, S. (1999). Disintegration of uncooked rice by carboxymethyl cellulase from *Sporotrichum* sp. HG-I. *J Biosci Bioeng.* 87(2):249-51.

Ito, Y., Ikeuchi, A. y Imamura, C. (2013). Advanced evolutionary molecular engineering to produce thermostable cellulase by using a small but efficient library. *Protein Eng Des Sel.* Jan; 26(1):73-9.

Ji, S., Wang, S., Tan, Y., Chen, X., Schwarz, W. y Li, F. (2012). An untapped bacterial cellulolytic community enriched from coastal marine sediment under

anaerobic and thermophilic conditions. *FEMS Microbiol Lett.* Oct; 335(1):39-46.

Jin, R., Richter, S., Zhong, R. y Lamppa, G. K. (2003). Expression and import of an active cellulase from a thermophilic bacterium into the chloroplast both in vitro and in vivo. *Plant Mol Biol.* Mar; 51(4):493-507.

Johnson, E. A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A. y Demain, A. L. (1982). Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol.* May; 43(5):1125-32.

Kalogeris, E., Iniotaki, F., Topakas, E., Christakopoulos, P., Kekos, D. y Macris, B. J. (2003). Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresour Technol.* Feb; 86(3):207-13.

Kanafusa-Shinkai, S., Wakayama, J., Tsukamoto, K., Hayashi, N., Miyazaki, Y., Ohmori, H., Tajima, K. y Yokoyama, H. (2013). Degradation of microcrystalline cellulose and non-pretreated plant biomass by a cell-free extracellular cellulase/hemicellulase system from the extremethermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*. *J Biosci Bioeng.* Jan; 115(1):64-70.

Karita, S., Nakayama, K., Goto, M., Sakka, K., Kim, W. J. y Ogawa, S. (2003). A novel cellulolytic, anaerobic, and thermophilic bacterium, *Moorella* sp. strain F21. *Biosci Biotechnol Biochem.* Jan; 67(1):183-5.

Kawano, Y., Saotome, T., Ochiai, Y., Katayama, M., Narikawa, R. y Ikeuchi M. (2011). Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN. *Plant Cell Physiol.* Jun; 52(6):957-66.

Khalid, M., Yang, W. J., Kishwar, N., Rajput, Z. I. y Arijio, A. G. (2006). Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J Zhejiang Univ Sci B* 7(6): 459–466.

Khianggam, S., Akaracharanya, A., Tanasupawat, S., Lee, K. C y Lee, J.-S. (2009). *Paenibacillus thailandensis* sp. nov. and *Paenibacillus nanensis* sp. nov., xylanase-producing bacteria isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 564-568.

Khianggam, S., Tanasupawat, S., Lee, J. S., Lee, K. C. y Akaracharanya, A. (2009). *Paenibacillus siamensis* sp. nov., *Paenibacillus septentrionalis* sp. nov. and *Paenibacillus montaniterrae* sp. nov., xylanase-producing bacteria

from Thai soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(1), 130-134.

Kim, B., Al-Tai, A. M., Kim, S. B., Somasundaram, P. y Goodfellow, M. (2000). *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endoxylanase-producing streptomycete. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), 505-509.

Kim, H. W. y Ishikawa, K. (2013). The role of disulfide bond in hyperthermophilic endocellulase. *Extremophiles*. Jul; 17(4):593-9.

Kim, M. K., Kang, T. H., Kim, J., Kim, H. y Yun, H. D. (2012). Evidence showing duplication and recombination of cel genes in tandem from hyperthermophilic *Thermotoga* sp. *Appl Biochem Biotechnol*. Dec; 168(7):1834-48.

Ko, C.-H., Chen, W.-L., Tsai, C.-H., Jane, W.-N., Liu, C.-C. y Tu, J. (2007). *Paenibacillus campinasensis* BL11: una madera material que utilizan las bacterias cepa aislada de licor negro. *Bioresour Tec*. 98, 2727-2733.

Koeck, D. E., Wibberg, D., Koellmeier, T., Blom, J., Jaenicke, S., Winkler, A., Albersmeier, A., Zverlov, V. V., Pühler, A., Schwarz, W. H y Schlüter, A.

(2013). Draft genome sequence of the cellulolytic *Clostridium thermocellum* wild-type strain BC1 playing a role in cellulosic biomass degradation. *J Biotechnol.* Oct 10; 168(1):62-3.

Kufner, K. y Lipps, G. (2013). Construction of a chimeric thermoacidophilic beta-endoglucanase. *BMC Biochem.* Apr 29; 14:11.

Kumar, V. y Satyanarayana, T. (2011). Aplicabilidad de termo-alcalino-estable y celulasa xilanasas exentas de una novela termo-halo alcalifílica *Bacillus halodurans* en xilooligosacáridos productores. *Biotechnol Lett.* Nov; 33 (11): 2279-85.

Kumar, S., Singh, S. D., Mishra, I. M. y Adhikari, D. K. (2009). Recent advances in production of bioetanol from lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. Technol.* 32(4):517-526.

Lamed, R., Naimark, J., Morgenstern, E. y Bayer, E. A. (1987). Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. *J Bacteriol.* Aug; 169(8):3792-800.

Latif, F., Rajoka, M. I. y Malik, K. A. 1995. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa fusca* straw. *World J Microbiol Biotechnol.* 1995 May; 11(3):347-8.

Le, Y. y Shao W. (2013). Advances in and challenges for thermophilic fermentation of cellulosic ethanol. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. Mar; 29(3):274-84.

Lee, B. H. y Blackburn, T. H. (1975). Cellulase production by a thermophilic clostridium species. *Appl Microbiol. Sep*; 30(3):346-53.

Lee, H., Lee, Y. M.; Jang, Y., Lee, S., Lee, H., Ahn, B. J., Kim, G. H. y Kim, J. J. (2014). Isolation and analysis of the enzymatic properties of thermophilic fungi from compost. *Mycobiology*. Jun; 42(2):181-4.

Li, D. C., Li, A. N., y Papageorgiou, A. C. (2011). Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. *Enzyme research, 2011*.

Li, X. T., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Yang, S. Q., Feng, W. Y., Fan, J. Y. y Kusakabe, I. (2005). Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresour Technol*. Aug; 96(12):1370-9.

Liang, C., Fioroni, M., Rodríguez-Ropero, F., Xue, Y., Schwaneberg, U., y Ma, Y. (2011). Directed evolution of a thermophilic endoglucanase (Cel5A) into highly active Cel5A variants with an expanded temperature profile. *Journal of biotechnology, 154*(1), 46-53.

Liang, C., Xue, Y., Fioroni, M., Rodríguez-Ropero, F., Zhou, C., Schwaneberg, U. y Ma, Y. (2011). Cloning and characterization of a thermostable and halo-tolerant endoglucanase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jan; 89(2):315-26.

Liang, Y., Yesuf, J. y Feng, Z. (2010). Toward plant cell wall degradation under thermophilic condition: a unique microbial community developed originally from swine waste. *Appl Biochem Biotechnol.* May; 161(1-8):147-56.

Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J. y Blackburn, J. W. (2010). Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Appl Biochem Biotechnol.* Mar; 160(6):1841-52.

Liang, Y., Yesuf, J., Schmitt, S., Bender, K. y Bozzola, J. (2009). Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J Ind Microbiol Biotechnol.* Jul; 36(7):961-70.

Limauro, D., Cannio, R., Fiorentino, G., Rossi, M. y Bartolucci, S. (2001). Identification and molecular characterization of an endoglucanase gene, *celS*, from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.* Aug; 5(4):213-9.

Lin, S. B. y Stutzenberger, F. J. (1995). Purification and characterization of the major beta-1,4-endoglucanase from *Thermomonospora curvata*. *J Appl Bacteriol.* Oct; 79(4):447-53.

Liu, M. Q., Dai, X. J., Liu, G. F. y Wang, Q. (2013). Obtención de unión a celulosa y actividad de hidrólisis de una xilanasas de la familia 11 híbrido por fusión con dominio de unión a xilano. *Protein Expr Purif.* Mar; 88 (1): 85-92.

Liu, S. A., Li, D. C., E, S. J. y Zhang, Y. (2005). Cloning and expressing of cellulase gene (cbh2) from thermophilic fungi *Chaetomium thermophilum* CT2. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* Nov; 21(6):892-9.

Liu, Y., Zhang, J., Liu, Q., Zhang, C. y Ma, Q. (2004). Molecular cloning of novel cellulase genes cel9A and cel12A from *Bacillus licheniformis* GXN151 and synergism of their encoded polypeptides. *Curr Microbiol.* Oct; 49(4):234-8.

Lochner, A., Giannone, R. J., Rodriguez, M., Shah, M. B., Mielenz, J. R., Keller, M. y Hettich, R. L. (2011). Use of label-free quantitative proteomics to distinguish the secreted cellulolytic systems of *Caldicellulosiruptor bescii* and *Caldicellulosiruptor obsidiansis*. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4042-4054.

Loginova, L. G. y Tashpulatov, Zh. (1965). El termófilo hongo *Aspergillus fumigatus* formando activo celulasa. *Mikrobiologiya*. Mar-Apr; 34 (2): 258-64.

Loginova, L. G., Beliakova, L. A., Guzhova, E. P., Lusupova, I. Kh. y Burdenko LG. (1983). Thermophilic Myceliophthora thermophila decomposes cellulose. *Mikrobiologiya*. 1983 Jul-Aug; 52(4):605-8.

Lu, M., Li, D. y Zhang, C. (2002). Purification and properties of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. Aug; 42(4):471-7.

Lü, Y., Wang, X., Li, N., Wang, X., Ishii, M., Igarashi, Y. y Cui, Z. (2011). Caracterización de la cepa efectiva degradantes de celulosa CTL-6. *J Environ Sci*. 23 (4): 649-55.

Lüthi, E., Jasmat, N. B., Grayling, R. A., Love, D. R., y Bergquist, P. L. (1991). Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a beta-mannanase from the extremely thermophilic bacterium "*Caldocellum saccharolyticum*". *Applied and environmental microbiology*, 57(3), 694-700.

Lv, W., y Yu, Z. (2013). Isolation and characterization of two thermophilic cellulolytic strains of *Clostridium thermocellum* from a compost sample. *Journal of applied microbiology*, 114(4), 1001-1007.

Lynd, L. R. y Grethlein, H. E. (1987). Hydrolysis of dilute acid pretreated mixed hardwood and purified microcrystalline cellulose by cell-free broth from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Bioeng.* Jan; 29(1):92-100.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. y Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microb.Mol. Biol. Rev.* 66: 506-577.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G. y Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol. Rev.* Sep; 64(3):461-88.

Majjala, P., Kango, N., Szijarto, N. y Viikari, L. (2012). Characterization of hemicellulases from thermophilic fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek.* May; 101(4):905-17.

Maki, M. L., Broere, M., Leung, K. T. y Qin, W. (2011). Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2(2):146-154.

Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. y del Río, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of fungal attack of lignin. *Inter. Microbiol.* 8(3):195-204.

Martínez, C., Belcazar, E., Dantan, E. y Folch, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50(3-4):119-131.

Masui, D. C., Zimbardi, A. L., Souza, F. H., Guimarães, L. H., Furriel, R. P. y Jorge, J. A. (2012). Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* Aug;28(8):2689-701.

McCarthy, T., Hanniffy, O., Savage, A. V. y Tuohy, M. G. (2003). Catalytic properties and mode of action of three endo-beta-glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble beta-1,4- and beta-1,3; 1,4-linked glucans. *Int J Biol Macromol.* Nov; 33(1-3):141-8.

McCarthy, T. y Tuohy, M. G. (2011). A multi-step chromatographic strategy to purify three fungal endo- β -glucanases. *Methods Mol Biol.* 681:497-524.

Mejía, T., Mújica, F., González, A. y Ortega, J. (2002). Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología: *Avance y Perspectiva*. 21(Sept-Oct):267-271.

Meng, F., Ma, L., Ji, S., Yang, W. y Cao, B. (2014). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass. *Lett Appl Microbiol*. Sep; 59(3):306-312.

Meyer, O. (1994). Functional groups of microorganisms. In *Biodiversity and ecosystem function* (pp. 67-96). Springer Berlin Heidelberg.

Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31: 426-428.

Mingardon, F., Bagert, J. D., Maisonnier, C., Trudeau, D. L. y Arnold, F. H. (2011). Comparison of family 9 cellulases from mesophilic and thermophilic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. Feb; 77(4):1436-42.

Miyauchi, S., Te'o, V. S Jr., Bergquist, P. L. y Nevalainen, K. M. (2013). La expresión de una xilanaso bacteriana en *Trichoderma reesei* bajo las egl2 y glicosil hidrolasa cbh2 promotores de genes. *N Biotechnol*. Jun 25; 30 (5): 523-30.

Morag, E., Bayer, E. A. y Lamed, R. (1990). Relationship of cellulosomal and noncellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose-degrading enzymes. *J Bacteriol.* Oct; 172(10):6098-105.

Morag, E., Halevy, I., Bayer, E. A. y Lamed, R. (1991). Isolation and properties of a major cellobiohydrolase from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol.* Jul; 173(13):4155-62.

Moretti, M. M., Bocchini, D. A., Silva, R. D., Rodrigues, A., Sette, L. D. y Gomes, E. (2012). Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Braz J Microbiol.* Jul; 43(3):1062-71.

Murashima, K., Kosugi, A. y Doi, R. (2002). Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol.* 184: 5088-5095.

Murray, P. G., Collins, C. M., Grassick, A. y Tuohy, M. G. (2003). Molecular cloning, transcriptional, and expression analysis of the first cellulase gene (*cbh2*), encoding cellobiohydrolase II, from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* and structure prediction of the gene product. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 7; 301(2):280-6.

Németh, A., Kamondi, S., Szilágyi, A., Magyar, C., Kovári, Z. y Závodszy, P. (2002). Increasing the thermal stability of cellulase C using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study. *Biophys Chem.* May 2; 96(2-3):229-41.

Newcomb, M., Millen, J., Chen, C. Y. y Wu, J. H. (2011). Co-transcription of the celC gene cluster in *Clostridium thermocellum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* Apr; 90(2):625-34.

Oliveira, L., Porto, L. y Tambourgi, B. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technol.* 97(6):862-867.

Olson, D. G., Tripathi, S. A., Giannone, R. J., Lo, J., Caiazza, N. C., Hogsett D. A., Hettich, R. L., Guss, A. M., Dubrovsky, G. y Lynd, L. R. (2010). Deletion of the Cel48S cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 12; 107(41):17727-32.

Ou, M. S., Mohammed, N., Ingram, L. O. y Shanmugam, K. T. (2009). Thermophilic *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalysts. *Appl Biochem Biotechnol.* May; 155(1-3):379-85.

Ovando, S. y Wahszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21(42):111-120.

Ozturk, Z. N. y Ogel ZB. (2000). PCR con cebadores degenerados amplifica un fragmento de ADN subgenómico a partir del gen de endoglucanasa (s) de *Torula thermophila*, un termófilo hongo. *Mol Biotechnol*. Oct; 16 (2): 109-15.

Park, Ji., Steen, E. J., Burd, H., Evans, S. S., Redding-Johnson, A. M., Batth, T., Benke, P. I., D'Haeseleer, P., Sun, N., Venta, K. L., Keasling, J. D., Lee, T. S., Petzold, C. J., Mukhopadhyay, A., Cantante, S. W., Simmons, B. A. y Gladden, J. M. (2012). A termófilo iónicos líquido tolerante celulasa cóctel para la producción de biocombustibles de celulosa. *PLoS One*. 7 (5): e37010.

Pasda, N., Limtong, P., Oliver, R., Montange, D. y Panichsakpatana, S. (2005). Influence of bulking agents and microbial activator on thermophilic aerobic transformation of sewage sludge. *Environ Technol*. Oct; 26(10):1127-35.

Pason, P., Kyu, K. L y Ratanakhanokchai, K. (2006). *Paenibacillus curdlanolyticus* cepa B-6-celulolítica xilanolítica sistema de enzima que degrada los polisacáridos insolubles. *Appl Environ Microbiol* 72, 2483-2490.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. y Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5(2):53-63.

Petre J., Longin R. y Millet J. (1981). Purification and properties of an endo-beta-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochimie.* Jul; 63(7):629-39.

Podkaminer, K. K., Kenealy, W. R., Herring, C. D., Hogsett, D. A. y Lynd, L. R. (2012). Ethanol and anaerobic conditions reversibly inhibit commercial cellulase activity in thermophilic simultaneous saccharification and fermentation (tSSF). *Biotechnol Biofuels.* Jun 15; 5(1):43.

Ponce, T. y Pérez, O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. *Cinvestad.* Vol 21: 274-275.

Ponpium, P., Ratanakhanokchai, K. y Kyu. K. L. (2000). Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1. *Enzima Microb Technol.* 26 (5-6): 459-465.

Posta, K., Béki, E., Wilson, D. B., Kukolya, J. y Hornok, L. (2004). Cloning, characterization and phylogenetic relationships of cel5B, a new endoglucanase encoding gene from *Thermobifida fusca*. *J Basic Microbiol.* 44(5):383-99.

Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P. y Sani, R. K. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour Technol.* Nov; 101(22):8798-806.

Rastogi, G., Muppidi, G. L., Gurram, R. N., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Apel, W. A., Bang, S. S., Dixon, D. J. y Sani, R. K. (2009). Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *J Ind Microbiol Biotechnol.* Apr; 36(4):585-98.

Rawat, R. y Tewari, L. (2012). Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles.* Jul; 16(4):637-44.

Reyes Ortiz, V., Heins, R. A., Cheng, G., Kim, E. Y., Vernon, B. C., Elandt, R. B., Adams, P. D., Sale, K. L., Hadi, M. Z., Simmons, B. A., Kent, M. S. y Tullman-Ercek, D. (2013). Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. *Biotechnol Biofuels*. Jul 3; 6(1):93.

Reynolds, P. H., Sissons, C. H., Daniel, R. M. y Morgan, H. W. (1986). Comparison of Cellulolytic Activities in *Clostridium thermocellum* and Three Thermophilic, Cellulolytic Anaerobes. *Appl Environ Microbiol*. Jan; 51(1):12-7.

Riedel, K., Ritter, J., Bauer, S. y Bronnenmeier, K. (1998). The modular cellulase CelZ of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium* contains a thermostabilizing domain. *FEMS Microbiol Lett*. Jul 15; 164(2):261-7.

Rivas, R., García-Fraile, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2006). *Paenibacillus cellulolyticus*, una bacteria celulolítica y xilanolítica aislado del filosfera brácteas de *Phoenix dactylifera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2777-2781.

Rivas, R., Gutiérrez, C., Abril, A., Mateos, P., Martínez, E., Ventosa, A. y Velázquez, E. (2005a). *Paenibacillus rhizosphaerae*, aislada de la rizosfera de *Cicer arietinum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 1305-1309.

Rivas, R., Mateos, P. F, Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2005b). *Paenibacillus phyllosphaerae*, una bacteria xilanolítica aislado del filosfera de *Phoenix dactylifera*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 743-746.

Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez, E. y Velázquez, E. (2005c). *Paenibacillus xylanilyticus*, una bacteria xilanolítica aire. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 405-408.

Rodriguez, F. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Madrid: Editorial Tébar.

Romanelli, R. A., Houston, C. W. y Barnett, S. M. (1975). Studies on thermophilic cellulolytic fungi. *Appl Microbiol.* Aug; 30(2):276-81.

Romaniec, M. P., Fauth, U., Kobayashi, T., Huskisson, N. S., Barker, P. J. y Demain, A. L. (1992). Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem J.* Apr 1; 283 (Pt 1):69-73.

Rosgaard, L., Pedersen, S., Cherry, J. R., Harris, P. y Meyer, A. S. (2006). Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. *Biotechnol Prog.* Mar-Apr; 22(2):493-8.

Rubiano, C. (2006). Aislamiento y Caracterización de Microorganismos Termófilos Anaeróbios Lipolíticos, Proteolíticos, Amilolíticos de los Manantiales termominerales de Paipe e Iza (Boyacá). Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá-Colombia.

Sakatoku, A., Tanaka, D., Kamachi, H. y Nakamura, S. (2014). Cloning and Characterizing the Thermophilic and Detergent Stable Cellulase CelMytB from *Saccharophagus* sp. Myt-1. *Indian J Microbiol.* Mar; 54(1):20-6.

Samain, E., Debeire, P. y Touzel, J. P. (1997). High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain. *J Biotechnol.* Oct 17; 58(2):71-8.

Sánchez, M. M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tindall, B. J., Schumann, P. y Pastor, F. J. (2005). *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River

delta. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(2), 935-939.

Sánchez, T. (2009). Caracterización microbiológica del proceso de compostaje a partir de residuos azucareros. *Agronomía Trop.* 59(3):309-316.

Sanghi, A., Garg, N., Gupta, V. K., Mittal, A. y Kuhad, R. C. (2010). One-step purification and characterization of cellulase-free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ash. *Braz J Microbiol.* Apr; 41(2):467-76.

Saul, D. J., Williams, L. C., Grayling, R. A., Chamley, L. W., Love, D. R. y Bergquist, P. L. (1990). celB, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile " *Caldocellum saccharolyticum*". *Applied and Environmental Microbiology*, 56(10), 3117-3124.

Schwarz, W. H., Bronnenmeier, K., Gräbnitz, F. y Staudenbauer, W. L. (1987). Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage beta-glucans. *Anal Biochem.* Jul; 164(1):72-7.

Schwarz, W. H., Gräbnitz, F. y Staudenbauer, W. L. (1986). Properties of a *Clostridium thermocellum* Endoglucanase Produced in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* Jun; 51(6):1293-9.

Sharma, R., Kocher, G. S., Bhogal, R. S. y Oberoi, H. S. (2014). Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. *J Basic Microbiol.* Jul 22.

Sheble, A. y El-diwany, A. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Aust. J. Basic and Appl. Sci.* 1(4):473-478.

Shepherd, M. G., Tong, C. C. y Cole, A. L. (1981). Substrate specificity and mode of action of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem J.* Jan 1; 193(1):67-74.

Shi, R., Li, Z., Ye, Q., Xu, J. y Liu, Y. (2013). Heterologous expression and characterization of a novel thermo-halotolerant endoglucanase Cel5H from *Dictyoglomus thermophilum*. *Bioresource technology*, 142, 338-344.

Shi, R., Li, Z., Ye, Q., Xu, J. y Liu, Y. (2013). Heterologous expression and characterization of a novel thermo-halotolerant endoglucanase Cel5H from *Dictyoglomus thermophilum*. *Bioresour Technol.* Aug; 142:338-44.

Singh, S., Madlala, A. M. y Prior, B. A. (2003). Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiol Rev.* Apr; 27(1):3-16.

Singh, S., Pillay, B., Dilsook, V. y Prior, B. A. (2000). Production and properties of hemicellulases by a Thermomyces lanuginosus strain. *J Appl Microbiol.* Jun; 88(6):975-82.

Sissons, S. H., Sharrock, K. R., Daniel, R. M. y Morgan, H. W. (1987). Isolation of cellulolytic anaerobic extreme thermophiles from New Zealand thermal sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(4):832-838

Sizova, M. V., Izquierdo, J. A., Panikov, N. S. y Lynd, L. R. (2011). Cellulose- and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost. *Appl Environ Microbiol.* Apr; 77(7):2282-91.

Soutschek-Bauer, E. y Staudenbauer, W. L. (1987). Synthesis and secretion of a heat-stable carboxymethylcellulose from Clostridium thermocellum in Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus. *Mol Gen Genet.* Jul; 208(3):537-41.

Spezio, M., Wilson, D. B. y Karplus, P. A. (1993). Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochemistry*. Sep 28; 32(38):9906-16.

Spiridonov, N. A., Wilson, D. B. (1998). Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. *J Bacteriol*. Jul; 180(14):3529-32.

Stathopoulou, P. M., Galanopoulou, A. P., Anasontzis, G. E., Karagouni, A. D. y Hatzinikolaou, D. G. (2012). Assessment of the biomass hydrolysis potential in bacterial isolates from a volcanic environment: biosynthesis of the corresponding activities. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012 Sep; 28(9):2889-902.

Stutzenberger, F. J. (1971). Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Appl Microbiol*. Aug; 22(2):147-52.

Su, X., Mackie, R. I y Cann, I. K. (2012). Biochemical and mutational analyses of a multidomain cellulase/mannanase from *Caldicellulosiruptor bescii*. *Appl Environ Microbiol*. Apr; 78(7):2230-40.

Sulzenbacher, G., Schülein, M. y Davies, G. J. (1997). Structure of the endoglucanase I from *Fusarium oxysporum*: native, cellobiose, and 3,4-epoxybutyl beta-D-cellobioside-inhibited forms, at 2.3 Å resolution. *Biochemistry*. May 13; 36(19):5902-11.

Syutsubo, K., Nagaya, Y., Sakai, S. y Miya, A. (2005). Behavior of cellulose-degrading bacteria in thermophilic anaerobic digestion process. *Water Sci Technol*. 52(1-2):79-84.

Takashima, S., Likura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. y Uozumi, T. (1999). Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from *Humicola grisea*. *J Biotechnol*. Jan 22; 67(2-3):85-97.

Tamada, M., Kasai, N., Kumakura, M. y Kaetsu, I. (1986). Periodical batch culture of the immobilized growing fungi *Sporotrichum cellulophilum* producing cellulase in the nonwoven materials. *Biotechnol Bioeng*. Aug; 28(8):1227-32.

Tamaru, Y., Miyake, H., Kuroda, K., Ueda, M. y Doi, R. H. (2010). Comparative genomics of the mesophilic cellulosome-producing *Clostridium cellulovorans* and its application to biofuel production via consolidated bioprocessing. *Environmental technology*, 31(8-9), 889-903.

Teather, R. M. y Erfle, J. D. (1990) DNA sequence of a *Fibrobacter succinogenes* mixed-linkage beta-glucanase (1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase) gene. *J. Bacteriol.* 172(7): 3837-3841.

Te'o, V. S., Saul, D. J. y Bergquist, P. L. (1995). celA, another gene coding for a multidomain cellulase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* May-Jun; 43(2):291-6.

Terry, C. J., Bermúdez, R. C., Rodríguez, S. y Fernández, M. (2004). Selección de un inóculo para la degradación anaerobia de la pulpa de café. *Tecnología Química.* 24(2):64-71.

Thomson, J. A. (1993) Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 65-82.

Tong, C. C., Cole, A. L. y Shepherd, M. G. (1980). Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem J.* Oct 1; 191(1):83-94.

Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. y Ishida, I. (1997). The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:1029-1034.

Valdez, S. (2011). Caracterización molecular y determinación de la diversidad microbiana para bacterias y arqueas hipertermófilas de los géiseres de Calientes, Candarave, Tacna- Perú. Tesis de grado. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología-Microbiología. Tacna-Perú.

Valjakka, J. y Rouvinen, J. (2003). Structure of 20K endoglucanase from *Melanocarpus albomyces* at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Apr; 59(Pt 4):765-8.

Van Petegem, F., Vandenberghe, I., Bhat, M. K. y Van Beeumen, J. (2002). Atomic resolution structure of the major endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 9; 296(1):161-6.

Van Wyk, N., den Haan, R. y van Zyl, W. H. (2010). Heterologous co-production of *Thermobifida fusca* Cel9A with other cellulases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Aug; 87(5):1813-20.

Vazana, Y., Morais, S., Barak, Y., Lamed, R. y Bayer, E. A. (2010). Interacción entre la familia *Clostridium thermocellum* 48 y la familia 9 celulasas en celulosomal contra estados noncellulosomal. *Appl Environ Microbiol*. May; 76 (10): 3236-43.

Vazquez, S., Leal, C. y Herrera, A. (1998) Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma hazarium*. *Appl. Environ. Microbiol*. 64(4):1442-1446.

Velázquez, E., de Miguel, T., Poza, M., Rivas, R., Rosselló-Mora, R. y Villa, T. G. (2004). *Paenibacillus favisporus*, una bacteria xilanólítica aisladas a partir de heces de vaca. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 59-64.

Verkhovtseva, M. I. (1965). Study of cellulase in thermophilic bacteria. *Mikrobiologiya*. 34(3): 430-6.

Viviano, F., Medina, L., Ramos, N., Amaíz, L. y Valbuena, O. (2011). Degradación de celulasa por bacterias de aguas termales de las trincheras, Venezuela. *Rev. Latinoam Biotecnol Amb Algal*. 2(1):18-29.

Waeonukul, R., Kosugi, A., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Ratanakhanokchai, K., Prawitwong, P., Deng, L., Saito, M. y Mori, Y. (2012). Efficient saccharification of ammonia soaked rice straw by combination of *Clostridium thermocellum* cellulosome and *Thermoanaerobacter brockii* β -glucosidase. *Bioresour Technol*. Mar; 107:352-7.

Waller, B. H., Olson, D. G., Currie, D. H., Guss, A. M. y Lynd, L. R. (2013). Exchange of type II dockerin containing subunits of the *Clostridium thermocellum* cellulosome as revealed by SNAP-tags. *FEMS Microbiol Lett*. Jan; 338(1):46-53.

Walter, S. y Schrempf, H. (1996). Physiological studies of cellulase (Avicelase) synthesis in *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol*. 62: 1065-1069.

Wang, C. M., Shyu, C. L., Ho, S. P. y Chiou, S. H. (2008). Characterization of a novel thermophilic, cellulose-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. strain B39. *Lett Appl Microbiol.* Jul; 47(1):46-53.

Weimer, P. J. y Weston, W. M. (1985). Relationship between the fine structure of native cellulose and cellulose degradability by the cellulase complexes of *Trichoderma reesei* and *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Bioeng.* Nov; 27(11):1540-7.

Wilson, D. B. (1992). Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Crit Rev Biotechnol.* 12(1-2):45-63.

Wolf, M., Geczi, A., Simon, O. y Borriss, R. (1995) Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology* 141(2):291-290.

Wolfgang, D.E. y Wilson, D. B. (1999). Mechanistic studies of active site mutants of *Thermomonospora fusca* endocellulase E2. *Biochemistry.* Jul 27; 38(30):9746-51.

Wood, W. E., Neubauer, D. G. y Stutzenberger, F. J. (1984). Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in *Thermomonospora curvata*. *J Bacteriol.* 1984 Dec; 160(3):1047-54.

Yennamalli, R. M., Rader, A. J., Wolt, J. D. y Sen, T. Z. (2011). Thermostability in endoglucanases is fold-specific. *BMC Struct Biol.* Feb 3; 11:10.

Yi, Z., Su, X., Revindran, V., Mackie, R. I. y Cann, I. (2013). Molecular and biochemical analyses of CbCel9A/Cel48A, a highly secreted multi-modular cellulase by *Caldicellulosiruptor bescii* during growth on crystalline cellulose. *PLoS One.* Dec 16; 8(12):e84172.

Yi, Z. L., Pei, X. Q. y Wu, Z. L. (2011). Introduction of glycine and proline residues onto protein surface increases the thermostability of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*. *Bioresour Technol.* Feb; 102(3):3636-8.

Yin, L. J., Huang, P. S. y Lin, H. H. (2010). Isolation of cellulase producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp YJ5. *J. Agri. Food. Chem.* 58(17):9833-9837.

Zambare, V. P., Bhalla, A., Muthukumarappan, K., Sani, R. K. y Christopher L. P. (2011). Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. *Extremophiles*. Sep; 15(5):611-8.

Zeikus, J. G., Ben-Bassat, A., Ng, T. K. y Lamed, R. J. (1981). Thermophilic ethanol fermentations. In *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals* (pp. 441-461). Springer US.

Zhang, Q., He, J., Tian, M., Mao, Z., Tang, L., Zhang, J. y Zhang, H. (2011). Mejora de la producción de metano a partir de residuos de yuca por el pretratamiento biológico utilizando un consorcio microbiano construido. *Bioresour Technol*. Oct; 102 (19): 8899-906.

Zhao, J., Shi, P., Bai, Y., Huang, H., Luo, H., Zhang, H., Xu, D., Wang, Y. y Yao, B. (2012). A thermophilic cellulase complex from *Phialophora* sp. G5 showing high capacity in cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*. Feb; 166(4):952-60.

Zheng, B., Yang, W., Wang, Y., Feng, Y., y Lou, Z. (2009). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of thermophilic cellulase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. Mar 1; 65(Pt 3):219-22.

Zverlov, V., Mahr, S., Riedel, K. y Bronnenmeier, K. (1998). Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile 'Anaerocellum thermophilum' with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology*. Feb; 144 (Pt 2):457-65.

VIII. ANEXOS

Anexo1. Recuento microbiano de la cepa *Bacillus sp* en medio líquido CMC

recuento de microorganismos cepa GCB-13 (cel/mL)												
cepa GCB-13 a 45°C					cepa GCB-13 a 50°C				cepa GCB-13 a 55°C			
tiempo (hs)	Replicas			promedio	Replicas			promedio	Replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000	17500000
24	72600000	286000000	290000000	216200000	216000000	266000000	340000000	274000000	156000000	230000000	130000000	172000000
48	222000000	584000000	610000000	472000000	415000000	270000000	385000000	356666667	218000000	232000000	222000000	224000000
72	1000000000	1050000000	1080000000	1043333333	700000000	500000000	975000000	725000000	350000000	350000000	350000000	350000000
96	1400000000	675000000	475000000	850000000	500000000	1700000000	600000000	933333333	375000000	650000000	507000000	510666667
120	1450000000	1380000000	900000000	1243333333	1150000000	1380000000	1200000000	1243333333	625000000	750000000	700000000	481666667

Anexo2. Recuento microbiano de la cepa *Paenibacillus sp* en medio líquido

CMC

Recuento de microorganismos cepa GCC-13 (cel/mL)												
cepa GCC-13 a 45°C					cepa GCC-13 a 50°C				cepa GCC-13 a 55°C			
tiempo (hs)	Replicas			promedio	Replicas			promedio	Replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000	20000000
24	322000000	310000000	320000000	317333333	476000000	490000000	450000000	472000000	356000000	242000000	380000000	326000000
48	462000000	488000000	472000000	474000000	664000000	604000000	690000000	652666667	456000000	494000000	426000000	458666667
72	940000000	1100000000	680000000	906666667	1600000000	1180000000	940000000	1240000000	640000000	1140000000	700000000	826666667
96	1040000000	2780000000	1460000000	1760000000	1520000000	1580000000	820000000	1306666667	1120000000	1100000000	820000000	1013333333
120	1160000000	1140000000	1960000000	1420000000	1740000000	1020000000	1620000000	1460000000	1140000000	1180000000	990000000	1103333333

Anexo 3. Producción de proteínas totales de la cepa *Bacillus sp* en medio líquido CMC

Proteínas totales de la cepa GCB-13 por el método de Bradford (ug/mL)												
tiempo (hs)	GCB-13 a 45°C				GCB-13 a 50°C				GCB-13 a 55°C			
	replicas			promedio	replicas			promedio	replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77
24	104.77	99.77	129	111.18	108.23	71.31	54	77.85	90.92	54.38	66.31	70.54
48	144.77	164	84.77	131.18	81.62	99.77	56.69	79.36	100.54	127.07	61.69	96.43
72	130.54	121.69	155.15	135.79	87.08	101.3	117.46	101.95	69.77	87.08	104	86.95
96	117.08	111.31	95.15	107.85	135.92	44.38	75.92	85.41	97.08	93.23	100.92	97.08

Anexo 4. Producción de proteínas totales de la cepa *Paenibacillus sp* en medio líquido CMC

Proteínas totales de la cepa GCC-13 por el método de Bradford (ug/mL)												
tiempo (hs)	GCC-13 a 45°C				GCC-13 a 50°C				GCC-13 a 55°C			
	replicas			promedio	replicas			promedio	replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85	57.85
24	241.31	130.54	172.08	181.31	178.62	92.46	110.15	127.08	102.46	91.31	129.77	107.85
48	195.15	115.54	135.54	148.74	141.31	110.15	122.85	124.77	135.92	88.23	66.69	96.95
72	142.08	103.23	120.15	121.82	104.77	59.77	76.31	80.28	115.15	67.08	97.85	93.36
96	117.08	169.38	107.46	131.31	16.69	67.85	165.54	83.36	99	81.69	25.54	68.74

Anexo 5. Producción de proteínas totales del blanco en medio líquido CMC

Proteínas totales del blanco por el método de Bradford (ug/mL)												
blanco a 45°C					blanco a 50°C				blanco a 55°C			
tiempo (hs)	replicas			promedio	replicas			promedio	replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	10.54	0	3.51	0	0	0	0
48	0	0	48.62	16.2	13.23	28.62	28.62	23.49	30.54	14.77	15.92	20.41
72	10.92	0	0	3.64	0	6.69	16.31	7.67	5.92	0	51.31	19.08
96	5.54	0	2.46	2.67	3.61	38.62	2.85	15.03	20.54	0	14.38	11.64

Anexo 6. Producción de azúcares reductores de la cepa *Bacillus sp* en medio líquido CMC

Azúcares reductores de la cepa GCB-13 por el método del DNS (ug/mL)												
GCB-13 45°C					GCB-13 50°C				GCB-13 55°C			
tiempo (hs)	replicas			promedio	replicas			promedio	replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
24	316.67	250	436.67	334.47	393.33	90	116.67	200	103.33	90	116.67	103.33
48	656.67	666.67	736.67	686.67	386.67	643.33	543.33	524.44	116.67	196.67	196.67	170
72	466.67	496.67	550	504.47	330	406.67	696.67	477.78	90	186.67	170	148.89
96	516.67	590	796.67	634.47	373.33	350	520	414.44	180	116.67	183.33	160

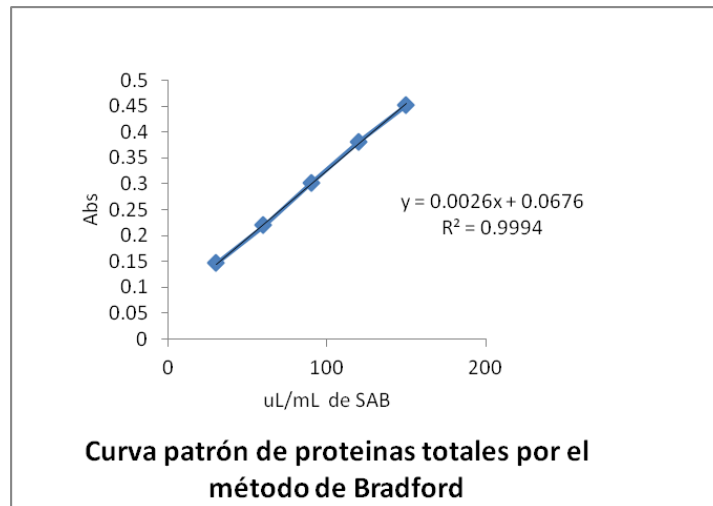
Anexo 7. Producción de azúcares reductores de la cepa *Paenibacillus sp* en medio líquido CMC

Azúcares reductores de la cepa GCC-13 por el método del DNS (ug/mL)												
GCC-13 45°C					GCC-13 50°C				GCC-13 55°C			
tiempo (hs)	replicas			promedio	replicas			promedio	replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33
24	23.33	63.33	163.33	83.33	113.33	196.67	360	223.33	226.67	146.67	96.67	156.67
48	20	33.33	280	111.11	350	76.67	366.67	264.45	196.67	230	83.33	170
72	26.67	76.67	6.67	36.67	76.67	33.33	383.33	164.44	10	170	33.33	71.11
96	63.33	26.67	30	40	13.33	10	436.67	153.33	30	210	43.33	94.44

Anexo 8. Producción de azúcares reductores del blanco en medio líquido CMC

Azúcares reductores del blanco por el método del DNS (ug/mL)												
blanco a 45°C					blanco a 50°C				blanco a 55°C			
tiempo (hs)	replicas			promedio	replicas			promedio	replicas			promedio
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	40	0	0	13.33	83.33	53.33	0	45.55	0	0	56.67	18.89
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	6.67	0	2.22	120	90	0	70	86.67	0	0	28.89
96	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0

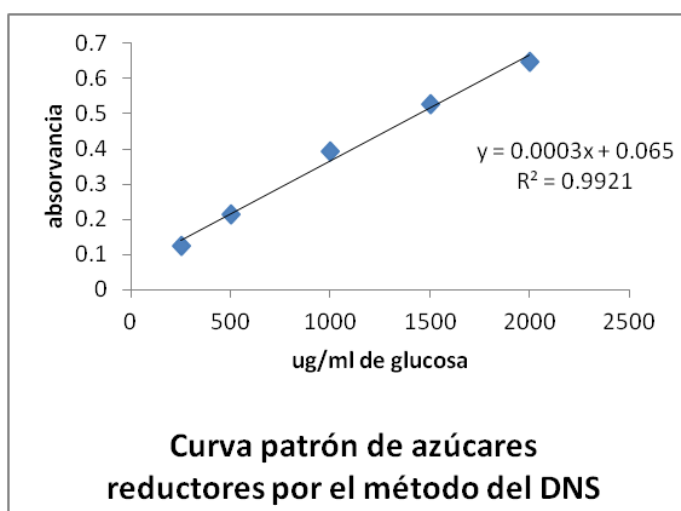
Anexo 9. Determinación de la curva patrón para proteínas totales por el método de Bradford



Anexo 10. Absorvancias de la curva patrón de proteínas totales

curva patrón de proteínas totales (Bradford)	
concentracion de SAB(uL/ml)	Abs
30	0.146
60	0.219
90	0.301
120	0.381
150	0.452

Anexo 11. Determinación de la curva patrón para proteínas totales por el método de DNS



Anexo 12. Absorvancias de la curva patrón de proteínas totales

Concentración de glucosa (ug/ml)	Abs (450nm)
250	0.123
500	0.214
1000	0.393
1500	0.526
2000	0.648

Anexo13. Análisis de varianza para la determinación de la temperatura correspondiente a la mayor producción de proteínas totales para la cepa GCB-13 y GCC-13.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad para F</i>	<i>Valor crítico</i>
Entre grupos	14690,5395	5	2938,1079	2,87104827	0,06239913	3,10587524
Dentro de los grupos	12280,2863	12	1023,35719			
Total	26970,8259	17				

En el anexo 13 de análisis de varianza, se aprecia que no existe grado de significancia entre la producción de proteínas totales y temperatura para las cepas bacterianas GCB-13 y GCC-13.

Anexo14. Análisis de varianza para la determinación de la temperatura correspondiente a la mayor producción de azúcares reductores para la cepa GCB-13 y GCC-13

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad para F</i>	<i>Valor crítico</i>
Entre grupos	816400,422	5	163280,084	13,4163704	0,00014526	3,10587524
Dentro de los grupos	146042,556	12	12170,213			
Total	962442,978	17				

En el anexo 14, de análisis de varianza, se aprecia que existe grado de significancia entre la producción de azúcares reductores y la temperatura para las cepas bacterianas GCB-13 y GCC-13.

Anexo 15. Prueba de Tuckey para la determinación de la temperatura correspondiente a la mayor producción de azúcares reductores para la cepa GCB-13 y GCC-13.

Orden de mérito	Tratamiento	Promedio
1°	T6	686,67
2°	T5	524,443333
3°	T4	264,446667
4°	T3	170,003333
5°	T2	156,67
6°	T1	111,11

Anexo 16. Comparaciones de los tratamientos experimentales de las cepas GCB-13 y GCC-13 a diferentes temperaturas.

1°-6°	=	686.67 - 111.11	=	575,56	(significativo)
2°-6°	=	524.44 - 111.11	=	413,33	(significativo)
3°-6°	=	170.00 - 111.11	=	58,89	(no significativo)
4°-6°	=	264.45 - 111.11	=	153,34	(no significativo)
5°-6°	=	156.67 - 111.11	=	45,56	(no significativo)
1°-5°	=	686.67 - 156.67	=	530,00	(significativo)
2°-5°	=	524.44 - 156.67	=	367,77	(significativo)
3°-5°	=	170.00 - 156.67	=	13,33	(no significativo)
4°-5°	=	264.45 - 156.67	=	107,78	(no significativo)
1°-4°	=	686.67 - 264.45	=	422,22	(significativo)
2°-4°	=	524.44 - 264.45	=	259,99	(significativo)
3°-4°	=	170.00 - 264.45	=	94,45	(no significativo)
1°-3°	=	686.67 - 170.00	=	516,67	(significativo)
2°-3°	=	524.44 - 170.00	=	354,44	(significativo)
1°-2°	=	686.67 - 524.44	=	162,23	(no significativo)

Anexo 17. Tubos de ensayo de la curva patrón de proteínas totales por el método de Bradford



Anexo 18. Caldo de cultivo CMC



Anexo 19. Determinación de la Velocidad de crecimiento y tiempo de generación de la cepa celulolítica *Bacillus sp* a 45 °C, 50 °C y 60 °C.

cepa GCB-13	
temperaturas de incubación	velocidad de crecimiento (h ⁻¹)
45 °C	0,10475
50 °C	0,1146
55 °C	0.0952

cepa GCB-13	
temperaturas de incubación	tiempo de generación (h)
45 °C	6.614
50 °C	6.0484
55 °C	7.2809

Anexo 20. Determinación de la Velocidad de crecimiento y tiempo de generación de la cepa celulolítica *Paenibacillus sp* a 45 °C, 50 °C y 60 °C.

cepa GCC-13	
temperaturas de incubación	velocidad de crecimiento (h-1)
45 °C	0.1152
50 °C	0.1317
55 °C	0.1163

cepa GCC-13	
temperaturas de incubación	tiempo de generación (h)
45 °C	6.0169
50 °C	5.2631
55 °C	5.9599

Anexo 21. Imágenes de los géiseres de calientes Candarave-Tacna.



Geiser 1



Geiser 2



Geiser 3



Geiser 4



Geiser 5



Geiser 6



Geiser 7



Geiser 8

Anexo 22. Trabajos de investigación relacionados a la producción de Celulasas termófilas, base de datos de National Center for Biotechnology and Informatic (NCBI), 1965-2014.

Titulo	País	año
Isolation and analysis of the enzymatic properties of thermophilic fungi from compost.	Corea del Sur	2014
Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic <i>Aspergillus terreus</i> RWY.	India	2014
Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderatelythermophilic bacteria. <i>Biotechnol Biofuels</i> .	China	2014
Stability of endoglucanases from mesophilic fungus and thermophilic bacterium in acidified polyols.	Australia	2014
Isolation and characterization of <i>Bacillus subtilis</i> strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass.	China	2014
Discovery and characterization of ionic liquid-tolerant thermophilic cellulases from a switchgrass-adapted microbial community. <i>Biotechnol Biofuels</i> .	EEUU	2014
Cloning and Characterizing the Thermophilic and Detergent Stable CellulaseCelMytB from <i>Saccharophagus</i> sp. Myt-1.	Japon	2014
High throughput nanostructure-initiator mass spectrometry screening of microbial growth conditions for maximal β -glucosidase production. <i>Front Microbiol</i> .	EEUU	2013
Molecular and biochemical analyses of CbCel9A/Cel48A, a highly secreted multi-modular cellulase by <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> during growth on crystalline cellulose.	EEUU	2013
Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> CelA.	EEUU	2013
Characterization and high level expression of acidic endoglucanase in <i>Pichia pastoris</i> . <i>Appl Biochem Biotechnol</i> .	Iran	2014
Improved activity of a thermophilic cellulase, Cel5A, from <i>Thermotoga maritima</i> on ionic liquid pretreated switchgrass. <i>PLoS One</i> .	EEUU	2013

Draft genome sequence of the cellulolytic <i>Clostridium thermocellum</i> wild-type strain BC1 playing a role in cellulosic biomass degradation.	Alemania	2013
Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders.	Dinamarca	2013
Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates.	EEUU	2013
Advances in and challenges for thermophilic fermentation of cellulosic ethanol.	China	2013
La expresión heteróloga y caracterización de un termo-halotolerant novela endoglucanasa Cel5H de <i>Dictyoglomus thermophilum</i> .	China	2013
Heterologous expression and characterization of a novel thermo-halotolerant endoglucanase Cel5H from <i>Dictyoglomus thermophilum</i> .	China	2013
Construction of a chimeric thermoacidophilic beta-endoglucanase.	Suiza	2013
The role of disulfide bond in hyperthermophilic endocellulase.	Corea del Sur	2013
Detección y xilanasa producción por <i>Streptomyces</i> sp. crecido sobre residuos lignocelulósicos.	Brasil	2013
La expresión de una xilanasa bacteriana en <i>Trichoderma reesei</i> bajo las <i>egl2</i> y <i>glb2</i> hidrolasa <i>cbh2</i> promotores de genes.	Australia	2013
Isolation and characterization of two thermophilic cellulolytic strains of <i>Clostridium thermocellum</i> from a compost sample.	EEUU	2013
Obtención de unión a celulosa y actividad de hidrólisis de una xilanasa de la familia 11 híbrido por fusión con dominio de unión a xilano.	China	2013
Advanced evolutionary molecular engineering to produce thermostable cellulase by using a small but efficient library.	Japón	2013
Exchange of type II dockerin-containing subunits of the <i>Clostridium thermocellum</i> celulosome as revealed by SNAP-tags.	EEUU	2013
Application of thermophilic enzymes and water jet system to cassava pulp.	Japón	2012
Evidence showing duplication and recombination of <i>cel</i> genes in tandem from hyperthermophilic <i>Thermotoga</i> sp.	Corea el sur	2012
Degradation of microcrystalline cellulose and non-pretreated plant biomass by a cell-free extracellular cellulase/hemicellulase system from the extremethermophilic bacterium <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> .	Japón	2013

Assessment of the biomass hydrolysis potential in bacterial isolates from a volcanic environment: biosynthesis of the corresponding activities.	Grecia	2012
Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus <i>Humicola brevis</i> var. <i>thermoidea</i> under solid state fermentation.	Brasil	2012
An untapped bacterial cellulolytic community enriched from coastal marine sediment under anaerobic and thermophilic conditions.	China	2012
Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation.	Brasil	2012
Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review.	India	2012
Ethanol and anaerobic conditions reversibly inhibit commercial cellulase activity in thermophilic simultaneous saccharification and fermentation (tSSF).	EEUU	2012
A termófilo iónico líquido tolerante celulasa cóctel para la producción de biocombustibles de celulosa..	EEUU	2012
Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by <i>Bacillus subtilis</i> strain LFS3.	India	2012
Characterization of hemicellulases from thermophilic fungi.	Finlandia	2012
Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from <i>Sporotrichum thermophile</i> .	Grecia	2012.
Efficient saccharification of ammonia soaked rice straw by combination of <i>Clostridium thermocellum</i> cellulosome and <i>Thermoanaerobacter brockii</i> β -glucosidase.	Japón	2012
Biochemical and mutational analyses of a multidomain cellulase/mannanase from <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> .	EEUU	2012
A thermophilic cellulase complex from <i>Phialophora</i> sp. G5 showing high capacity in cellulose hydrolysis. <i>Appl Biochem Biotechnol</i> .	China	2012
Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential.	China	2011
Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile.	EEUU	2011
Caracterización de la cepa efectiva degradantes de celulosa CTL-6.	China	2011
Mejora de la producción de metano a partir de residuos de yuca por el pretratamiento biológico utilizando un consorcio microbiano construido.	China	2011

Aplicabilidad de termo-alcalino-estable y celulasa xilanasa exento de una novela termo-halo alcalifílica <i>Bacillus halodurans</i> en xilooligosacáridos productores.	India	2011
Novel family of carbohydrate-binding modules revealed by the genome sequence of <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192.	Alemania	2011
La evolución dirigida de un termófilo endoglucanasa (Cel5A) en Cel5A altamente activa variantes con un perfil de temperatura ampliado.	China	2011.
Novel family of carbohydrate-binding modules revealed by the genome sequence of <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192. .	Alemania	2011
El uso de la proteómica cuantitativa libres de etiquetas para distinguir los sistemas celulolíticas secretadas de <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> y <i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i> .	EEUU	2011
Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium <i>Thermosynechococcus vulcanus</i> RKN.	Japón	2011
Optimization of cellulase-free xylanase production by thermophilic <i>Streptomyces thermovulgaris</i> TISTR1948 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches.	Tailandia	2011
Co-transcription of the <i>celC</i> gene cluster in <i>Clostridium thermocellum</i> .	EEUU	2011
Cellulose- and xylan degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost.	EEUU	2011
Thermostability in endoglucanases is fold-specific.	EEUU	2011
Comparison of family 9 cellulases from mesophilic and thermophilic bacteria.	EEUU	2011
A multi-step chromatographic strategy to purify three fungal endo- β -glucanases.	Irlanda	2011
Deletion of the Cel48S cellulase from <i>Clostridium thermocellum</i> .	EEUU	2010
Cloning and characterization of a thermostable and halo-tolerant endoglucanase from <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4.	China	2011
A microscale platform for integrated cell-free expression and activity screening of cellulases.	EEUU	2010

Genómica comparativa de los mesófilos <i>Clostridium cellulovorans</i> celulosoma productoras y su aplicación a la producción de biocombustibles a través de bioprocesamiento consolidado.	Japón	2010
Introduction of glycine and proline residues onto protein surface increases the thermostability of endoglucanase CelA from <i>Clostridium thermocellum</i> .	China	2011
Characterization of thermostable cellulases produced by <i>Bacillus</i> and <i>Geobacillus</i> strains.	EEUU	2010
Heterologous co-production of <i>Thermobifida fusca</i> Cel9A with other cellulases in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Sudafrica	2010
One-step purification and characterization of cellulase-free xylanase produced by alkalophilic <i>Bacillus subtilis</i> ash.	India	2010
Interacción entre la familia <i>Clostridium thermocellum</i> 48 y la familia 9 celulasas en celulosomal contra estados noncelulosomal.	Israel	2010
Targeted discovery of glycoside hydrolases from a switchgrass-adapted compost community.	EEUU	2010
Development and application of a PCR-targeted gene disruption method for studying CelR function in <i>Thermobifida fusca</i> .	EEUU	2010
Toward plant cell wall degradation under thermophilic condition: a unique microbial community developed originally from swine waste.	EEUU	2010
Influencia de cultivo de aireación en la celulasa actividad de <i>Thermobifida fusca</i> .	EEUU	2010
Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, <i>Anoxybacillus</i> sp.	EEUU	2010
Bacterial thermostable beta-glucanases as a tool for plant functional genomics.	Rusia	2009
Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic <i>Brevibacillus</i> sp. strain JXL.	EEUU	2009
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of thermophilic cellulase from <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1.	China	2009
Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA.	EEUU	2009
Thermophilic <i>Bacillus coagulans</i> requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalysts.	EEUU	2009
<i>Aspergillus fumigatus</i> thermophilic and acidophilic endoglucanases.	Brasil	2009

Characterization of a novel thermophilic, cellulose-degrading bacterium <i>Paenibacillus</i> sp. strain B39.	Taiwan	2008
Molecular cloning and expression analysis of two distinct beta-glucosidase genes, <i>bg1</i> and <i>aven1</i> , with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus <i>Talaromyces emersonii</i> .	Irlanda	2007
Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of <i>Bacillus licheniformis</i> .	EEUU	2006
Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus <i>Myceliophthora</i> sp. IMI 387099.	India	2007
Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose.	Dinamarca	2006
Cloning and expressing of cellulase gene (<i>cbh2</i>) from thermophilic fungi <i>Chaetomium thermophilum</i> CT2.	China	2005
Influence of bulking agents and microbial activator on thermophilic aerobic transformation of sewage sludge.	Tailandia	2005
Disintegration of uncooked rice by carboxymethyl cellulase from <i>Sporotrichum</i> sp. HG-I.	Japón	1999
Behavior of cellulose-degrading bacteria in thermophilic anaerobic digestion process.	Japón	2005.
Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from <i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp.	China	2005
Cellulase, clostridia, and ethanol.	EEUU	2005
Molecular cloning of novel cellulase genes <i>cel9A</i> and <i>cel12A</i> from <i>Bacillus licheniformis</i> GXN151 and synergism of their encoded polypeptides.	China	2004
Cloning, characterization and phylogenetic relationships of <i>cel5B</i> , a new endoglucanase encoding gene from <i>Thermobifida fusca</i> .	Hungría	2004
Catalytic properties and mode of action of three endo-beta-glucanases from <i>Talaromyces emersonii</i> on soluble beta-1,4- and beta-1,3;1,4-linked glucans.	Irlanda	2003
Cloning of a gene encoding a thermo-stable endo-beta-1,4-glucanase from <i>Thermoascus aurantiacus</i> and its expression in yeast.	Japón	2003
Crystal structure of a family 45 endoglucanase from <i>Melanocarpus albomyces</i> : mechanistic implications based on the free and	Finlandia	2003

cellobiose-bound forms.		
<i>Thermomyces lanuginosus</i> : properties of strains and their hemicellulases.	Sudafrica	2003
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a family 45 endoglucanase from the thermophilic fungus <i>Melanocarpus albomyces</i> .	Finlandia	2002
The structure of <i>Rhodothermus marinus</i> Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution.	Reino unido	2002
Identification and molecular characterization of an endoglucanase gene, <i>celS</i> , from the extremely thermophilic archaeon <i>Sulfolobus solfataricus</i> .	Italia	2001
PCR con cebadores degenerados amplifica un fragmento de ADN subgenómico a partir del gen de endoglucanasa (s) de <i>Torula thermophila</i> , un termófilo hongo.	Turquía	2000
Temporal secretion of a multicellulolytic system in <i>Myxobacter</i> sp. AL-1. Molecular cloning and heterologous expression of <i>cel9</i> encoding a modular endocellulase clustered in an operon with <i>cel48</i> , an exocellobiohydrolase gene.	México	2000
Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw.	Grecia	2003
Structure of 20K endoglucanase from <i>Melanocarpus albomyces</i> at 1.8 Å resolution. <i>Acta Crystallogr D Biol Crystallogr</i> .	Finlandia	2003
Expression and import of an active cellulase from a thermophilic bacterium into the chloroplast both in vitro and in vivo.	EEUU	2003
A novel cellulolytic, anaerobic, and thermophilic bacterium, <i>Moorella</i> sp. strain F21.	Japón	2003
Molecular cloning, transcriptional, and expression analysis of the first cellulase gene (<i>cbh2</i>), encoding cellobiohydrolase II, from the moderately thermophilic fungus <i>Talaromyces emersonii</i> and structure prediction of the gene product.	Irlanda	2003
Purification and properties of an endocellulase from the thermophilic fungus <i>Chaetomium thermophile</i> .	China	2002
Atomic resolution structure of the major endoglucanase from <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	Belgica	2002
The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase CelS, the major enzymatic component of the <i>Clostridium thermocellum</i> Cellulosome.	Francia	2002

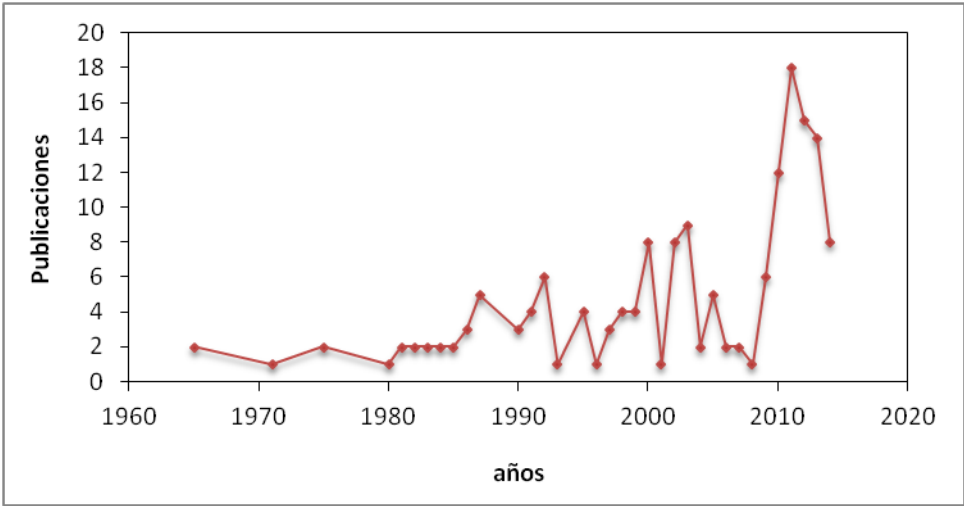
The structure of <i>Rhodothermus marinus</i> Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution.	Reino unido	2002
Increasing the thermal stability of cellulase C using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study.	Hungría	2002
The structure of <i>Rhodothermus marinus</i> Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution.	Reino unido	2002
Thermophilic fungi: their physiology and enzymes.	India	2000
Avicel-adsorbable endoglucanase production by the thermophilic fungus <i>Scytalidium thermophilum</i> type culture <i>Torula thermophila</i> .	Turquía	2000
Production and properties of hemicellulases by a <i>Thermomyces lanuginosus</i> strain.	Sudafrica	2000
Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and beta-glucosidase by the wild thermophilic fungus <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	Bangladesh	2000
<i>Streptomyces</i> sp. <i>thermocoprophilus</i> . nov., una celulasa estreptomiceto exento de endo-xilanasa productoras.	Reino unido	2000
Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic <i>Bacteroides</i> sp. strain P-1.	Tailandia	2000
Mechanistic studies of active site mutants of <i>Thermomonospora fusca</i> endocellulase E2.	EEUU	1999
Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme.	EEUU	1999
Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from <i>Humicola grisea</i> .	Japón	1999
The modular cellulase CelZ of the thermophilic bacterium <i>Clostridium stercorarium</i> contains a thermostabilizing domain.	Alemania	1998
Regulation of biosynthesis of individual cellulases in <i>Thermomonospora fusca</i> .	EEUU	1998
Cloning, sequencing and overexpression of a <i>Rhodothermus marinus</i> gene encoding a thermostable cellulase of glycosyl hydrolase family 12.	Islandia	1998
Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile ' <i>Anaerocellum thermophilum</i> ' with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains.	Rusia	1998
High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic <i>Bacillus</i> strain.	Francia	1997

The cellulolytic system of <i>Clostridium cellulolyticum</i> .	Francia	1997
Structure of the endoglucanase I from <i>Fusarium oxysporum</i> : native, cellobiose, and 3,4-epoxybutyl beta-D-cellobioside-inhibited forms, at 2.3 Å resolution.	Reino Unido	1997
Affinity purification of cellulose-binding enzymes of <i>Clostridium stercorarium</i> .	Alemania	1996
Purification and characterization of the major beta-1,4-endoglucanase from <i>Thermomonospora curvata</i> .	EEUU	1995
Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose.	EEUU	1995
Production of cellulases by thermophilic fungi grown on <i>Leptochloa fusca</i> straw.	Bangladesh	1995
celA, another gene coding for a multidomain cellulase from the extreme thermophile <i>Caldocellum saccharolyticum</i> .	Nueva Zelanda	1995
Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase.	EEUU	1993
Cellulose degradation by <i>Clostridium thermocellum</i> : from manure to molecular biology.	Francia	1992
Isolation and characterization of a cellulase-free pectinolytic and hemicellulolytic thermophilic fungus.	Bangladesh	1992
Cellulase production by thermophilic fungi. <i>Biochem Soc Trans.</i>	Brazil	1992
Purification and characterization of a new endoglucanase from <i>Clostridium thermocellum</i> . <i>Biochem J.</i> 1992 Apr 1;283 (Pt 1):69-73.	Reino Unido	1992
Inclusion bodies of the thermophilic endoglucanase D from <i>Clostridium thermocellum</i> are made of native enzyme that resists 8 M urea.	Francia	1992
Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases.	EEUU	1992
Purification and characterization of endoglucanase Ss from <i>Clostridium thermocellum</i> .	Reino Unido	1991
Isolation and properties of a major cellobiohydrolase from the cellulosome of <i>Clostridium thermocellum</i> .	Israel	1991
Clonación, análisis de secuencia, y expresión en <i>Escherichia coli</i> de un gen que codifica una beta-mananasa de la extremadamente termófila bacteria " <i>Caldocellum saccharolyticum</i> ".	Nueva Zelanda	1991

Production of cellulase(s) by <i>Myriococcum albomyces</i> .	Egipto	1991
Cloning, sequencing and homologies of the <i>cbh-1</i> (exoglucanase) gene of <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> .	Reino unido	1990
Relationship of cellulosomal and noncellulosomal xylanases of <i>Clostridium thermocellum</i> to cellulose-degrading enzymes.	Israel	1990
<i>celB</i> , a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile " <i>Caldocellum saccharolyticum</i> "	Nueva zelanda	1990
<i>Sporotrichum thermophile</i> Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity.	India	1987
Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria.	Israel	1987
Synthesis and secretion of a heat-stable carboxymethylcellulose from <i>Clostridium thermocellum</i> in <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Bacillus stearothermophilus</i> .	Alemania	1987
Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage beta-glucans. <u>Anal Biochem.</u> 1987 Jul;164(1):72-7.	Alemania	1987
Hydrolysis of dilute acid pretreated mixed hardwood and purified microcrystalline cellulose by cell-free broth from <i>Clostridium thermocellum</i> .	EEUU	1987
Periodical batch culture of the immobilized growing fungi <i>Sporotrichum cellulophilum</i> producing cellulase in the nonwoven materials.	Japón	1986
Properties of a <i>Clostridium thermocellum</i> Endoglucanase Produced in <i>Escherichia coli</i> .	Alemania	1986
Comparison of Cellulolytic Activities in <i>Clostridium thermocellum</i> and Three Thermophilic, Cellulolytic Anaerobes.	Nueva Zelanda	1986
Relationship between the fine structure of native cellulose and cellulose degradability by the cellulase complexes of <i>Trichoderma reesei</i> and <i>Clostridium thermocellum</i> .	EEUU	1985
Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium <i>Clostridium thermocellum</i> .	Francia	1985
Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in <i>Thermomonospora curvata</i> .	EEUU	1984
Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of <i>Thermomonospora curvata</i> .	EEUU	1984
Thermophilic <i>Myceliophthora thermophila</i> decomposes cellulose.	Rusia	1983

Purification and characterization of an endoglucanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium.	Francia	1983
Enhanced cellulase production in mutants of <i>Thermomonospora curvata</i> .	EEUU	1982
Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from <i>Clostridium thermocellum</i> .	Reino Unido	1982
Purification and properties of an endo-beta-1,4-glucanase from <i>Clostridium thermocellum</i> .	EEUU	1981
Substrate specificity and mode of action of the cellulases from the thermophilic fungus <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	Nueva Zelanda	1981
Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	Nueva Zelanda	1980
Cellulase production by a thermophilic clostridium species.	Canada	1975
Studies on thermophilic cellulolytic fungi.	EEUU	1975
Cellulase production by <i>Thermomonospora curvata</i> isolated from municipal solid waste compost.	EEUU	1971
Study of cellulase in thermophilic bacteria.	Rusia	1965
El termófilo hongo <i>Aspergillus fumigatus</i> formando activo celulasa.	Rusia	1965

Anexo 23. Producción de trabajos de investigación de enzimas celulolíticas termófilas según la base de datos NCBI.



Anexo 24. Caracterización de los geiseres de Calientes, Candarave-Tacna.

GEISER	COORDENADA	TEMPRATURA	pH	PRESENCIA DE MATERIA ORGANICA(M) Y/O ALGAS(A)	TEXTURA DEL GEISER	DIAMETRO
G-1	1.19 K 0366686 UTM 808351 Alt.4148	82°C	7,14	Mucosidad verdosa ++	Con sedimentos rocosos -anaranjado	4m largo X 4m ancho Cráter 1m
G-2	2.19K 0378969 UTM 8108424 Alt.4164	80°C	6,99	Si hay vegetación alrededor +	Con sedimento rocoso calcáreo Rojiza- anaranjado	718m largo X 4,4m ancho
G-3	3.19K 0378515 UTM 8107756 Alt.4147	50°C	6,90	Materia orgánica en abundancia (vegetación musgos) ++	Presencia de tapetes -color rojizo	3,49m ancho x 6,5m largo
G-4	3.19K 0378512 UTM 8107756 Alt.4158	80°C	7,17	Escasa materia orgánica (vegetación puro musgos) Superficie rocosa ++	Rocoso arenoso sedimento arenoso -marrón	2,3 m largo x 1,55 m ancho
G-5	3.19K 0378510 UTM 8107756 Alt.4150	70°C	7,53	Abundante vegetación , musgos líquenes y más +++	Sedimento blando Calcáreo -marrón oscuro	80 cm largo x 50 cm ancho
G-6	1.19 K 0378505 UTM 8107728 Alt.4148	75°C	6,44	No presencia de materia +	Sedimento rocoso color marrón fondo con verde	10m X 7m
G-7	2.19K 0378550 UTM 810 7597 Alt.4164	80°C	6,85	No presencia de materia orgánica	Sedimento rocoso calcáreo color rojo café	3,04m X 3,49m Diámetro de ancho 1m
G-8	3.19K 0378515 UTM 8107582 Alt.4147	50°C	6,18	Escasa vegetación a simple vista +/detrás de sedimentos algas c/tapetes microbianos	Sedimento calcáreo Color rojizo- reverso verde (presencia de algas)	3,06m X 112cm



Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

Asesor



Bach. Freddy Eddinson Ninaja Zegarra

Tesista