

Caracterización enzimática de una celulasa producida por *Bacillus* sp. (GCB-13) para la degradación de sustratos lignocelulósicos

Enzymatic characterization of a cellulase produced by *Bacillus* sp. (GCB-13) for degradation of lignocellulosic substrates

¹Israel José Salazar Quispe

ORCID: 0000-0003-3255-5038

²Ariadna Zúñiga Llanos

ORCID: 0000-0003-0287-3344

³Julissa Naquiche Calero

ORCID: 0000-0002-7455-3076

⁴Cristina Ferrer Villena

⁵Roberto Castellanos Cabrera

ORCID: 0000-0002-9021-412x

RESUMEN

Para esta investigación, se estudió la cinética de la enzima celulasa producida por la bacteria *Bacillus* sp GCB-13, aislada de los géiseres de Candarave. La bacteria alcanzó una fase logarítmica a partir de las 24 horas de incubación. La producción enzimática fue desarrollada usando CMC como sustrato, determinándose la concentración de azúcares reductores mediante el método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS) y la evaluación de proteínas totales con el método de Bradford. El extracto enzimático crudo obtenido fue aplicado sobre sustratos lignocelulósicos naturales como tallos y hojas del geranio (*Pelargonium x hortorum*), y sobre sustratos sintéticos como papel bond y Carboximetilcelulosa (CMC), para evaluar su potencial de degradación. Es así que se obtuvieron los valores de azúcares reductores de **3.499 mg/ml**; 0.116 mg/ml, 0.083 mg/ml y 0.593 mg/ml. Los parámetros cinéticos fueron calculados empleando la ecuación de Eadie-Hofstee, obteniendo un valor de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de 3.43 μM de CMC y 0.012 mg/ml.min, respectivamente. Finalmente, se evaluaron las actividades enzimáticas a diferentes valores de pH y temperaturas, correspondiendo los mayores niveles de actividades de 4.4 U/ml a 45 °C a pH 7.0, 3.04 U/ml a 45 °C a pH 5.0 y 3.6 U/ml a 45 °C a pH 10.

Palabras clave: *Bacillus* sp., celulasas, cinética enzimática, GCB-13.

ABSTRACT

The kinetics of the cellulase enzyme produced by the *Bacillus* sp GCB-13 bacteria isolated from the Candarave geysers were studied. The bacteria reached a logarithmic phase after 24 hours of incubation. Enzymatic production was developed using CMC as a substrate, determining the concentration of reducing sugars using the Dinitrosalicylic Acid (DNS) method and the evaluation of total proteins with the Bradford method. The crude enzyme extract obtained was applied on natural lignocellulosic substrates such as geranium stems and leaves (*Pelargonium x hortorum*), and on synthetic substrates such as bond paper and carboxymethylcellulose (CMC), to assess its degradation potential. This is how reducing sugars values of 3,499 mg / ml; 0.116 mg / ml; 0.083 mg / ml and 0.593 mg / ml .were obtained The kinetic parameters were calculated using the Eadie-Hofstee equation obtaining a K_m and V_{max} value of 3.43 μM CMC and 0.012 mg / ml.min, respectively. Finally, the enzymatic activities were evaluated at different pH values and temperatures, corresponding to the highest activity levels of 4.4 U / ml at 45 ° C at pH 7.0; 3.04 U / ml at 45 ° C at pH 5.0 and 3.6 U / ml at 45 ° C at pH 10.

Keywords: *Bacillus* sp., cellulases, enzyme kinetics, GCB-13.

¹Laboratorio de Bioquímica. Escuela de Biología Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. E-mail: josep12864@gmail.com

²Laboratorio de Bioquímica. Escuela de Biología Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. E-mail: ariadnazunigallanos@gmail.com

³Laboratorio de Bioquímica. Escuela de Biología Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. E-mail: julycalero7@gmail.com

⁴Laboratorio de Bioquímica. Escuela de Biología Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. E-mail: ferrercristina06@gmail.com

⁵Laboratorio de Bioquímica. Escuela de Biología Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. E-mail: robertocastellanoscabrera@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

La tecnología enzimática es una de las tecnologías básicas de la biotecnología. El gasto mundial de enzimas se cifra en varios miles de millones de dólares anuales. Los procesos, además de buscar la rentabilidad industrial y económica, buscan la reducción de los costos sobre el medio ambiente, al disminuir el uso de productos químicos contaminantes (Sharma, Vaid, Bhat, Singh & Bajaj, 2019).

Actualmente, las áreas industriales donde se utilizan las enzimas celulasas son diversas, tales como en los biocombustibles, detergentes, industria del papel, industria textil, industria del cuero, producción en farmacéutica, industria de alimentos y cosmética, además, como herramientas para la investigación y el desarrollo (Dumorné, Camacho Córdova, Astorga-Eló & Renganathan, 2017).

Estos procesos industriales se llevan a cabo a elevadas temperaturas y por consiguiente nace el interés en las enzimas producidas por organismos termófilos, ya que al provenir de estos microorganismos adaptados a ambientes extremos, las enzimas que se obtienen son estables a altas temperaturas y pueden ser utilizadas en diversos procesos industriales (Patel, Singhanian, Sim y Pandey, 2019).

Para una óptima aplicación de las enzimas adaptadas a elevadas temperaturas en la industria, es necesario realizar la caracterización para obtener valores estándares de producción de esta enzima y, asimismo, evaluar su potencial degradación sobre sustratos reales. En ese sentido, la presente investigación se centró en la caracterización de la enzima celulasa producida por *Bacillus sp.* GCB-13 y en la evaluación de su potencial para degradar sustratos lignocelulósicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Métodos microbiológicos

Obtención, activación y adaptación del microorganismo

La cepa *Bacillus sp.* GCB-13, aislada de muestras

de fuentes termales (Géiseres de Calientes-Candarave) a 4300 msnm en Tacna, fue cedida por el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann en Tacna, Perú. Esta cepa, previamente, fue descrita e identificada por sus características macroscópicas y microscópicas y su análisis molecular por el secuenciamiento de nucleótidos a través del gen ARNr 16S, mediante servicio en la empresa MacroGen Inc. Luego, se ensamblaron y alienaron las secuencias usando el programa MEGA X y finalmente se compararon con las secuencias disponibles en GenBank usando BLAST search, donde se obtuvo una cobertura del 100 %, un E-value de 0.0, 1534 nucleótidos y un porcentaje de identidad del 97 % con la cepa *Bacillus sp.* Por tanto, la cepa GCB-13 fue identificada como *Bacillus sp.*

La reactivación y adaptación se llevó a cabo en medio Luria Bertani (LB), conteniendo 10 g/L de Peptona, 5 g/L de Extracto de levadura y 10 g/L de NaCl ajustado a pH 7 e incubada a 45 °C durante 24 horas y, posteriormente, visualizando su pureza mediante tinción diferencial Gram.

Producción y concentración de la enzima celulasa

Para la producción de la enzima se realizó una fermentación discontinua, utilizando un inóculo del 10 %. El medio de producción contenía 0.5 % de Carboximetilcelulosa (CMC), 0.1 % de K_2HPO_4 , 0.1 % de KH_2PO_4 , 0.5 % de $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 % de $CaCl_2$, 2.5 % de extracto de levadura y 2.5 % de peptona universal. Todo esto se incubó a 45 °C ajustándolo a pH 7. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min para obtener el extracto enzimático de celulasas.

Para la concentración y precipitación de la enzima se utilizó el método de saturación con 90 % de sulfato de amonio.

Finalmente, se procedió a eliminar el sulfato de amonio mediante diálisis, resuspendiéndose la enzima en buffer tris-HCL 50 mM a pH 7 para obtener la enzima concentrada.

Evaluación de la curva de crecimiento durante la producción de celulasas

Se evaluó la curva de crecimiento celular mediante recuento directo en la cámara de Neubauer durante un periodo de 6 horas con intervalos de 1 hora y posteriormente cada 12

horas hasta alcanzar las 144 horas (Aguirre, 2003).

Métodos enzimáticos

Determinación de glucosa por el método DNS. (Miller, 1959)

La determinación de glucosa y azúcares reductores del extracto crudo se realizó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a una longitud de onda de 540 nm.

Cuantificación de proteínas totales por el método de (Bradford, 1973)

La determinación de proteínas totales del extracto crudo se realizó por el método de Bradford a una longitud de onda de 595 nm.

Determinación de actividad celulasa

La actividad enzimática se determinó por el método Ghose (1987). La reacción contenía 0.25 ml de carboximetilcelulosa al 0.5 % como sustrato en buffer fosfato de potasio a pH 7 y 0.25 ml de enzima, luego se incubó a 45 °C durante 30 min. La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ Mol de glucosa, desde el sustrato utilizado, por minuto, a 45 °C.

Cinética enzimática

Determinación de parámetros cinéticos enzimáticos

Se calcularon las constantes cinéticas de la enzima: la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m), mediante la ecuación de Eadie-Hofstee, obteniendo datos de velocidades de la enzima a partir de 1.1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 3 mg/ml, 6 mg/ml y 10 mg/ml de concentraciones de sustrato.

Evaluación de la acción enzimática sobre sustratos lignocelulósicos.

Para determinar la acción del extracto enzimático producida por *Bacillus* sp CGB-13, se trabajó con sustratos lignocelulósicos como hojas y tallos de *Pelargonium x hortorum* (Geranio), hojas de papel A4 y carboximetilcelulosa (CMC).

Se realizó un procedimiento de lavado, molido y esterilización de los sustratos para evitar contaminación y crecimiento bacteriano que afecte los resultados. Finalmente, se incubó a 60 °C durante 24 horas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para

la evaluación de las interacciones de temperaturas y pH, con una significancia del 0.05. Los datos se evaluaron mediante tablas y gráficas utilizando los programas SPSS 22 y OriginPro 9.1.

RESULTADOS

Con respecto a la obtención, activación y adaptación del microorganismo se realizó una coloración Gram, donde se observó bacilos Gram positivos delgados y de regular tamaño como se muestra en la Figura 1.

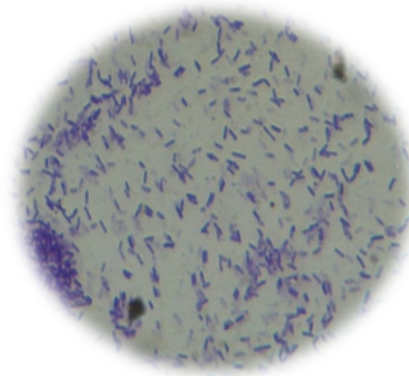


Figura 1. Fotografía de la tinción Gram de *Bacillus* sp CGB-13

La producción y concentración de la enzima celulasa producida por *Bacillus* sp. GCB-13 se realizó a pH 7 y 45 °C de incubación. Durante la producción, se evaluaron la curva de crecimiento bacteriana, así como la producción de azúcares reductores y proteínas totales.

En la evaluación de la curva de crecimiento durante la producción de celulasas, se observó la fase exponencial a partir de las 24 horas, evaluándose hasta las 120 horas tal como se muestra en la Figura 2.

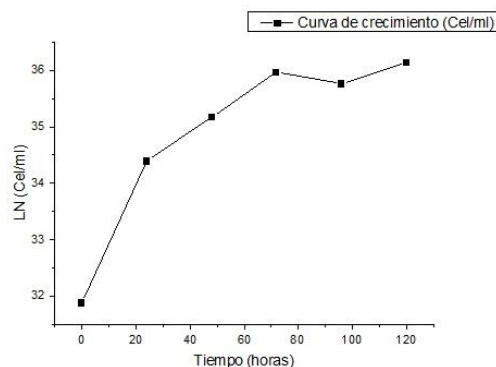


Figura 2. Perfil del crecimiento bacteriano en medio CMC a 45 °C y pH 7.

Los resultados de la determinación de azúcares reductores y proteínas totales nos muestran que a las 48 horas empieza la mayor liberación de azúcares reductores y proteínas totales como se muestra en la Figura 3.

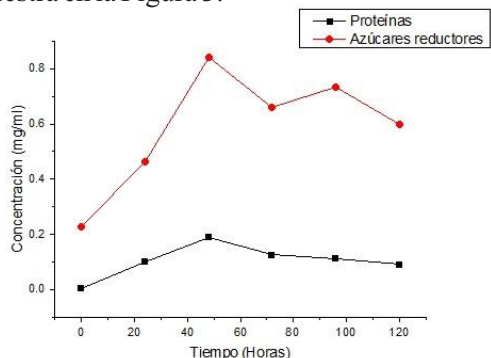


Figura 3. Producción de azúcares reductores y contenido de proteínas totales.

En la evaluación de la degradación de celulosa en diferentes sustratos, se observó la acción del extracto enzimático sobre sustratos lignocelulósicos tal como se muestra en la Figura 4, donde se observó que la mayor liberación de azúcares reductores se dio en los tallos de *Pelargonium x hortorum*.

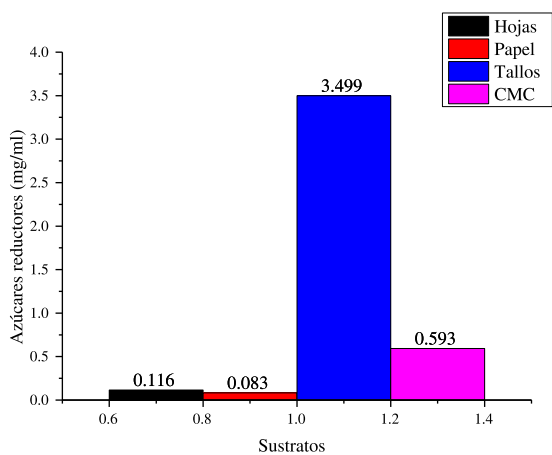


Figura 4. Diagrama de barras que muestra la cantidad de azúcares reductores liberados por acción del extracto crudo de la celulasa producida por *Bacillus sp.* GCB-13 a partir de los diferentes sustratos utilizados.

En la Figura 4 se observa el diagrama de barras de la liberación de azúcares reductores de los diferentes sustratos evaluados: *Pelargonium x hortorum*, papel, tallos de *Pelargonium x hortorum* y CMC. Donde se observa que la mayor liberación de azúcares reductores corresponde a los tallos de *Pelargonium x hortorum*.

El análisis estadístico muestra que existe diferencia significativa. La liberación de azúcares reductores del tallo es 6 veces mayor con respecto a CMC, por tanto sería altamente significativa en

la degradación de sustratos lignocelulósicos tal como se muestra en la Tabla 1. Asimismo, se puede apreciar que los tallos presentaron mayor significancia en sus medias comparando con los demás sustratos (Tabla 2).

Tabla 1. Análisis de varianza de la degradación de los diferentes sustratos lignocelulósicos

Model		Line			
Equation		y = A + B*x			
Adj. R-Square		0.97166			
Vm: 0.012mg/min.ml		Value	Standard Error		
Km: 2.4 mg/ml (~3.43 μM)	A	0.01127	4.57E-04		
	B	2.33096	0.1775		
Fuente de variación	Gl	Sc	Cm	Fc	Sig.
Tratamiento	3	24.01	8.00	945.46	0.00
Error experimental	8	0.067	0.00		
Total	11	24.08			

Tabla 2. Prueba de Tukey (α=0.05) para los diferentes sustratos según su orden de mérito de las medias.

Orden	Tratamiento	Promedio	Sig.
1°	Tallos	3.499	a
2°	CMC	0.591	b
3°	Hojas	0.116	c
4°	Papel	0.087	c

En la determinación de parámetros cinéticos enzimáticos, se calcularon los valores de Vmax y Km mediante ecuación de Eadie-Hofstee, tal como se muestra en la Figura 5. Se obtuvieron valores de 0.012mg/min.ml y 2.4 mg/ml respectivamente.

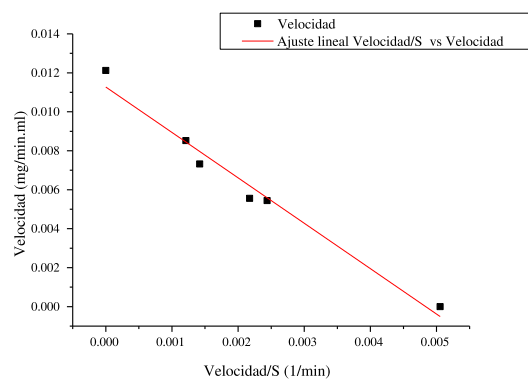


Figura 5. Representación de la ecuación de Eadie-Hofstee.

Los resultados obtenidos al estudiar caracterización cinética de la enzima celulasa producida por la bacteria termófila a diferentes pHs y temperaturas se presentan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividad enzimática a diferentes pHs y temperaturas

T °	pH = 5	pH = 7	pH = 10
	Actividad (U/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad (U/ml)
30 °C	1.59	1.8	1.9
45 °C	3.04	4.4	3.6
60 °C	2.30	3.2	2.2
75 °C	1.74	1.7	1.4

En la tabla 3 se puede observar los valores de actividad enzimática resultantes de la evaluación de interacción de temperaturas (30 °C, 45 °C, 60 °C y 75 °C) frente a pH (5, 7 y 8), obteniendo la mayor actividad de 4.4 U/ml a 45 °C y pH 7.

Tabla 4. Análisis de Varianza de interacciones pHs y temperaturas

Fuente de V	GL	SC	CM	Fc	Sig.
Temperatura	2	4.22	2.11	1.05	0.456
pH	2	3.30	1.65	0.82	0.371
T*pH	4	4.29	1.07	0.53	0.709
Error experimental	18	36.1	2.00		
TOTAL	26	47.9			

En la Tabla 4 se observa el análisis de varianza de la evaluación de las interacciones de temperaturas y pH. Se observa que la significancia posee un valor mayor a 0.05, por lo que se infiere que no existe diferencia significativa entre la interacción de las variables de temperatura y pH.

DISCUSIÓN

Activación y adaptación del microorganismo

El tiempo de activación del microorganismo fue de 48 horas en medio LB. Este tiempo fue menor al reportado por Marin (2007), quien indica que el tiempo necesario para la reactivación y para la adaptación del microorganismo productor de celulasas fue de 96 horas.

La tinción de Gram muestra las características microscópicas propias de la cepa bacteriana utilizada. Se trata de bacilos Gram positivos, delgados y de regular tamaño.

Producción y concentración de la enzima celulasa

Evaluación de la curva de crecimiento durante la producción de celulasas

En la evaluación de la curva de crecimiento, se observó que en las primeras horas existió un incremento ligero de la población bacteriana, iniciando su fase exponencial a las 24 horas con una población bacteriana de 2.16×10^8 (Cel/ml) hasta alcanzar una población máxima de 1.24×10^9 (Cel/ml), donde se mantuvo en fase estacionaria hasta las 120 horas. Esto nos indica su rápido crecimiento, con lo cual se puede obtener enzimas en un corto tiempo a nivel industrial.

Determinación de azúcares reductores por el método DNS

Los mejores resultados de azúcares reductores se obtuvieron a las 48 horas, alcanzando valores de 0.841 mg/ml. Este valor muestra la relación con el recuento bacteriano y la cantidad de proteínas totales, ya que el hecho de que se produzca más enzima extracelular en el medio hace suponer que habrá mayor degradación del sustrato CMC y una mayor liberación de azúcares reductores. Al momento de analizar la producción de azúcares reductores, de proteínas y de biomasa celular, se observa la relación hasta el tercer día. A partir de ahí, la curva de crecimiento celular empieza a crecer y la producción de proteínas y azúcares reductores disminuyen. Este análisis es muy importante, ya que nos indica que la máxima producción de enzimas se da a las 48 horas, con lo cual conocemos exactamente el tiempo adecuado de producción y ahorramos tiempo y costos.

Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

En la cuantificación de proteínas totales podemos observar que estas guardan relación con el crecimiento celular. Observamos que a las 48 horas hubo una concentración de proteínas máxima de 0.193 mg/ml y una disminución a las 120 horas con 0.091 mg/ml. Con lo cual podemos decir que la producción de enzima celulolítica disminuyó a partir de dicho tiempo. Esta cuantificación nos da como referencia que se están produciendo diversos tipos de proteínas en este tiempo, dentro del cual está la producción de nuestra enzima de interés, con lo que es importante conocerlo para una óptima producción.

Evaluación de la degradación de celulosa a diferentes sustratos

En este ensayo, los sustratos utilizados como hojas de *Pelargonium x hortorum* y papel de oficina A4 no presentaron una elevada liberación de azúcares reductores. Se obtuvieron valores de 0.116 mg /ml de las hojas de *Pelargonium x hortorum* y 0.083 mg/ml del papel bond, esto debido a la complejidad de la estructura de la planta y de las moléculas que la componen. En muchas investigaciones, se les da un pre tratamiento alcalino, ya que la aplicación de álcalis, como el NaOH, produce la ruptura de la lignina. De esta forma se incrementa el área superficial de la celulosa, además de producirse una disminución en su cristalinidad (Chaparro et al., 2009).

Con respecto a los resultados que se obtuvieron de la carboximetilcelulosa (CMC), comprobamos que en 24 horas se pudo liberar 0.593 mg/ml de azúcares reductores. Esta cantidad está en el rango de producción de la enzima entre 24 a 48 horas, acorde a nuestro ensayo de producción trabajado. El sustrato que presentó una mayor degradación fue el tallo de *Pelargonium x hortorum*, ya que se observó una liberación elevada de azúcares reductores. En el inicio del experimento, se determinó que existía una cantidad considerable de azúcares. La razón de esta cantidad inicial es debido a la naturaleza del sustrato y la función que desempeña, la cual es almacenar reservas alimenticias que son, en su mayoría, carbohidratos. Sin embargo, el ensayo permitió corroborar que sí existe degradación enzimática en este sustrato lignocelulósico. Además, se logró observar, definitivamente, que al cabo de 24 horas se dio una liberación de azúcares reductores de 3.499 mg/ml, la cual fue elevada, en comparación con trabajos similares como de Gaitán y Pérez (2007), donde se trabajó la degradación con tallos de Crisantemo y se obtuvo un valor de 1.474 mg/ml. Dicha diferencia de valores se puede dar debido a que los sustratos lignocelulósicos, como tallos y hojas, difieren en sus características fisicoquímicas, aspecto de microfibrillas y las moléculas de celulosa en las regiones amorfas, además del grado de cristalinidad de la celulosa (Malherbe & Cloele, 2002; Petre et al., 1999; Zhang et al., 2006).

Determinación de parámetros cinéticos

La caracterización cinética mediante la ecuación de Eadie-Hofstee dio valores de velocidad máxima (V_m) y constante de Michaelis-Menten (K_m) de 0.012 mg/ml.min y K_m de 3.43 μ M

respectivamente. Este último valor representa la afinidad entre nuestra enzima y el sustrato (CMC), lo cual no indica que la enzima obtenida tuviera una alta afinidad por el CMC, ya que nuestro rango de análisis de sustrato fue de 1.6 a 14.3 μ M, y mientras menor sea la concentración mayor será la afinidad al sustrato. Este dato es de mucha importancia si se quiere, más adelante, realizar estudios de inhibiciones de la enzima obtenida.

Caracterización cinética de la enzima celulasa producida por *Bacillus sp* GCB-13 a diferentes pHs y temperaturas

En la evaluación a diferentes pHs y temperaturas, se observaron las mejores actividades dentro del grupo de los pHs 7. Se obtuvo una actividad mayor de 4.4 U/ml a una temperatura de 45 °C, lo cual indicó que coincide con la temperatura óptima de la fermentación. Le siguen las actividades de 3.2 U/ml a una temperatura de 60 °C y actividades de 1.8 U/ml y 1.7 U/ml a 30 °C y 75 °C respectivamente. Dentro del grupo de los pHs 5, se mostró que hubo una pérdida de actividad a temperaturas de 30 °C y 75 °C, dándonos valores de 1.59 U/ml y 1.74 U/ml respectivamente, manteniendo la actividad a la temperatura de 45 °C con un valor de 3.04 U/ml, lo cual indica que esto ayudó a mantener la actividad. También se observó que la enzima no se ve afectada a un pH de 10. Si bien es cierto se dio una pérdida de actividad, la enzima conservó parte de ella, obteniéndose valores de 1.9 U/ml a una temperatura de 30 °C, 3.6 U/ml a una temperatura de 45 °C, 2.2 U/ml a una temperatura de 60 °C y 1.4 U/ml a una temperatura de 75 °C.

Con lo anterior, se puede decir que esta celulasa posee un comportamiento enzimático neutro, pero que se adapta a un pH alcalino, ya que otras enzimas endoglucanasas generalmente pierden bastante actividad a pHs alcalinos. Por lo tanto, esta condición favorece su uso en la industria, porque indica que es apta para actuar en diferentes usos como aditivos a detergentes, ya que esto requiere que posean actividad en amplios rangos de pHs alcalinos.

Con los resultados obtenidos en la investigación, observamos que la celulasa producida por *Bacillus sp* GCB-13 se puede emplear para la degradación de sustratos lignocelulósicos debido a que su acción de degradación es superior a otros trabajos reportados. Por lo tanto, es posible su aplicación a nivel industrial optimizando su proceso de purificación y conservación enzimática.

CONCLUSIONES

La evaluación de la curva de crecimiento guarda relación con la producción de azúcares reductores y proteínas totales del medio líquido, teniendo valores elevados a partir de las 72 horas.

En la evaluación con sustratos celulósicos como tallos, hojas de geranio (*Pelargonium x hortorum*), papel bond y CMC para evaluar su potencial de degradación, se obtuvieron valores de azúcares reductores de 3.499 mg/ml, 0.116 mg/ml, 0.083 mg/ml y 0.593 mg/ml respectivamente.

La celulasa obtenida posee parámetros cinéticos de K_m y $V_{máx}$, los cuales son respectivamente 3.43 μM y 0.013 mg/ml, este valor de K_m se obtuvo del resultado de la ecuación de Eadie-Hofstee.

En la evaluación de las interacciones de temperaturas y pHs, mediante el diseño experimental de análisis de varianza factorial, no existió diferencia significativa entre las interacciones, indicando una probable estabilidad en los rangos de pH de 5 a 10. La actividad relativamente máxima se alcanza a pH 7.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresamos nuestro agradecimiento a CONCYTEC-FINCYT por el financiamiento brindado, del mismo modo al responsable del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna, por brindarnos sus instalaciones para la ejecución de esta investigación.

REFERENCIAS

AGUIRRE, Jesús, RIOS-MOMBERG, Mauricio, HEWITT, David, HANSBERG, Wansberg. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* (13):111-118. 2003. DOI: 10.1016/j.tim.2005.01.007

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding, *Anal. Biochem.*, (72): 248-254.1976.

CHAPARRO, Deisy; ROSAS, Diana y VARELA, Amanda. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4): 238-243. 2009.

DUMORNÉ, Kelly; CAMACHO, David,

ASTORGA-ELÓ, Marcia & RENGANATHAN, Prabhakaran. Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(4): 649-659. 2017. DOI: 10.4014/jmb.1611.11006

GAITÁN, Diana y PÉREZ, Liliana. *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (dendrarthema grandiflora)*. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2007.

GHOSE, T.K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59(2): 257-268. 1987.

MALHERBE, Stephanus & CLOELE, T. E. Lignocellulose Biodegradation Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*(1): 105-114. 2002

MARÍN, Romela. *Caracterización y Expresión Recombinante de una Celulasa de Origen Antártico*. Tesis de pregrado. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 2007.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428. 1959.

PATEL, Anil; SINGHANIA, Reeta; SIM, Sang & PANDEY, Ashok. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. *Bioresource Technology*, 279: 385-392. 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.01.049

PETRE, M; ZARNEA, G; ADRIAN, P; GHEORGHIN, E. Biodegradation and Bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolimerized hydrogels. *Resources, Conservation and Recycling*, 27: 309-332. 1999.

SHARMA, Sunny; VAID, Surbhi; BHAT, Bilqeesa; SINGH, Satbir & BAJAJ, Bijender. Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology. *Advances in Enzyme Technology*. 469-495. 2019. DOI: 10.1016/b978-0-444-64114-4.00017-0

ZHANG, Percival, HIMMEL, ME & MIELENZ JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.*, 24(5): 452-481. 2006. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003