

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, Decana de América)

ESCUELA DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

TÍTULO DE LA TESIS

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS TERMOTOLERANTES
CELULOLÍTICAS Y XILANOLÍTICAS AISLADAS DE FUENTES
TERMALES DEL CALLEJON DE HUAYLAS**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

NOMBRES Y APELLIDOS

Mag. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES

LIMA – PERÚ

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 025-UPG-FCB-14

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Siendo las 10:10 horas del día 08 Julio en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Sustentación de Tesis presidido por:

Dr. Germán Vergaray Ulffe	e integrado por
Dra. Egma M. Mayta Huatuco	(Miembro)
Dr. Pedro L. Castellanos Sánchez	(Miembro)
Dr. Juan A. Jiménez Chunga	(Miembro)
Dr. Gabriel M. Gutiérrez Correa	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara la Magíster Doña CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES.

Después de darse lectura al Expediente N° 025-UPG-FCB-14, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“DIVERSIDAD DE BACTERIAS TERMOTOLERANTES CELULOLÍTICAS Y XILANOLÍTICAS AISLADAS DE FUENTES TERMALES DEL CALLEJON DE HUAYLAS”,

y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Excelente con la nota de 19*

A continuación el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas a la Magíster *DOÑA CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES*

Siendo las *11:55* se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 8 días del mes de julio del año 2014.

DR. GERMAN VERGARAY ULFFE
Profesor Principal a T.C.
PRESIDENTE

DR. GABRIEL M. GUTIERREZ CORREA
Profesor Principal UNALM
ASESOR

DRA. EGMA M. MAYTA HUATUCO
Profesora Principal a D.E.
MIEMBRO

DR. PEDRO L. CASTELLANOS SANCHEZ
Profesor Principal a T.C.
MIEMBRO

DR. JUAN A. JIMÉNEZ CHUNGA
Profesor Auxiliar a T. C.
MIEMBRO

AGRADECIMIENTO

- Al Dr. Marcel Gutiérrez Correa, por haberme asesorado en la realización de este trabajo de investigación, así mismo por orientarme dedicadamente en mi carrera profesional desde la etapa de pre-grado.
- A la Dr. Gretty Villena Chávez por haberme orientado en las técnicas utilizadas en el desarrollo de la tesis y por la confianza depositada.
- A mi esposo, Percy Olivera, quién me ha apoyado incondicionalmente en el desarrollo experimental de este trabajo, y en la realización de esta meta.
- A la Dra. Rina Ramírez Mesías, quien me orientó y enseñó el manejo de los softwares bioinformáticos de la parte molecular del presente trabajo.
- Al Consejo de Ciencia, Tecnología e Investigación (CONCYTEC), por el financiamiento de los estudios de doctorado y la tesis que se presenta.
- A los encargados del Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias – UNASAM, Huaraz: Jefes y técnicos que me han dado las facilidades para realizar la parte experimental del presente trabajo.
- A mi hermana Vicky, a Doña Mary Gonzales y a Don Alfredo Olivera, que me han dado su apoyo moral en todo el trayecto que ha demandado la culminación de esta meta.
- A todos aquellos que en alguna forma me han apoyado en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

En especial a mi mamá, Doña Delia Angeles quién me apoyó en todo momento y que ahora me ve desde el cielo junto a mi papá Don Victor Tamariz, a quién también dedico este trabajo.

A Lorena, Manuel y Mery, quienes ocupan el primer lugar en vida.

INDICE

CONTENIDO	Pág.
Lista de Ilustraciones	vii
Lista de Tablas	x
Lista de abreviaciones	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
- Celulosa y celulasas	3
- Xilano y xilanasas	7
- Microorganismos termotolerantes y termófilos con capacidad celulolítica y xilanolítica	9
- Ventajas de las enzimas termoestables	11
- Aislamiento y selección de microorganismos celulolíticos y xilanolíticos	12
- Cuantificación enzimática: celulasas y xilanasas	13
- Identificación taxonómica mediante 16s rDNA	16
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	18
- Colecta de la muestra	18

- Aislamiento de los microorganismos	18
- Enriquecimiento	19
- Selección cualitativa de cepas celulolíticas y xilanolíticas	19
- Análisis del 16S r DNA	20
- Cuantificación de actividad celulolítica y xilanolítica	21
- Cuantificación de proteínas totales	23
- Determinación de temperatura de crecimiento	23
- Elaboración de la lista de las cepas cultivables con actividad celulolítica y xilanolítica de las fuentes termales	24
- Evaluación de la temperatura óptima, pH óptimo y termoestabilidad enzimática	25
- Análisis estadístico	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
- Datos generales de las fuentes termales muestreadas	27
- Aislamiento de microorganismos	27
- Selección cualitativa	30
- Identificación de los microorganismos seleccionados mediante 16S rDNA	34
- Cuantificación de actividad celulolítica y xilanolítica	37
- Temperatura de crecimiento	48
- Lista de las cepas cultivables con actividad celulolítica y xilanolítica de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz	49

- Temperatura óptima, pH óptimo y estabilidad térmica	52
Actividad endoglucanasa	53
Actividad xilanasa	59
VI. CONCLUSIONES	65
VII. RECOMENDACIONES	66
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	67
IX. ANEXOS	
- ANEXO 01: Descripción y mapa de ubicación de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz	80
- ANEXO 02: Diámetros de los halos de hidrolisis sobre CMC y xilano de las cepas seleccionadas	83
- ANEXO 03: Fotografías de halos de hidrolisis sobre CMC	84
- ANEXO 04: Microfotografías de algunas cepas seleccionadas	85
- ANEXO 05: Fotografías de los geles de electroforesis de DNA	86
- ANEXO 06: Curva estándar de azúcares reductores	88
- ANEXO 07: Protocolo de la actividad enzimática miniaturizado	89
- ANEXO 08: Cálculos para la conversión a unidades enzimáticas	91
- ANEXO 09: Curva estándar de proteína	92
- ANEXO 10: Proteína extracelular	93
- ANEXO 11: Curvas de índice de velocidad de crecimiento	94
- ANEXO 12: Análisis estadísticos para la actividad enzimática, actividad específica y productividad	98
PUBLICACIÓN	116

LISTA DE ILUSTRACIONES

	Pág.	
Figura 1	Principales componentes de la pared celular de las plantas	4
Figura 2	Acción coordinada de las celulasas sobre la celulosa amorfa y cristalina	6
Figura 3	Lugares de acción de las xilanasas	8
Figura 4	Comparación entre el porcentaje de cepas aisladas y seleccionadas cualitativamente	31
Figura 5	Análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la fuente termal Chancos	35
Figura 6	Análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas seleccionadas por mostrar actividad hidrolítica sobre CMC y/o Xilano de la fuente termal Olleros	36
Figura 7	Análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas seleccionadas por mostrar actividad hidrolítica sobre CMC y/o Xilano de la fuente termal Huancarhuaz	37
Figura 8	Comparación de la actividad endoglucanasa y xilanasas de las cepas seleccionadas de Chancos en los medios LB-X y LB-CMC	45
Figura 9	Comparación de la actividad endoglucanasa y xilanasas de las cepas seleccionadas de Olleros en los medios LB-X y LB-CMC	46
Figura 10	Comparación de la actividad endoglucanasa y xilanasas de las cepas seleccionadas de Huancarhuaz en los medios LB-X y LB-CMC	47
Figura 11	Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de <i>B. subtilis</i> DO6	54

Figura 12	Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de <i>B. subtilis</i> DCH4	54
Figura 13	Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de <i>B. licheniformis</i> EOP2	56
Figura 14	Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de <i>C. laeviribosi</i> EHB4	56
Figura 15	Actividad endoglucanasa residual, luego de la incubación sin sustrato del extracto enzimático a 60, 70 y 80°C por 1 h	58
Figura 16	Temperatura y pH óptimos de la actividad xilanasa de <i>B. subtilis</i> DO6	60
Figura 17	Temperatura y pH óptimos de la actividad xilanasa de <i>B. subtilis</i> DCH4	60
Figura 18	Temperatura y pH óptimos de la actividad xilanasa de <i>B. licheniformis</i> EOP2	62
Figura 19	Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de <i>C. laeviribosi</i> EHB4.	62
Figura 20	Actividad xilanasa de residual luego de la incubación sin sustrato del extracto enzimático a 60, 70 y 80°C por 1 hora	64
Figura 21	Pozo exterior de la fuente termal Chancos	80
Figura 22	Pozo rústico de la fuente termal Huancarhuaz	81
Figura 23	Mapa de Ubicación de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancahuaz	82
Figura 24	Selección cualitativa de las cepas aisladas de las fuentes termales de Chancos, Olleros y Huancarhuaz	84
Figura 25	Microfotografía en luz blanca a 1000X, y coloración Gram de las cepas (a) <i>B. licheniformis</i> DCH3, (b) <i>B. subtilis</i>	85

ICHB1, (c) *B. licheniformis* DCH2, d) *B. licheniformis* EHB1, (e) *B. subtilis* DO6 y (f) *C. laeviribosi* EHB4

Figura 26	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la fuente termal Chancos	86
Figura 27	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la fuente termal Olleros	86
Figura 28	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la fuente termal Huancarhuaz.	87
Figura 29	Curvas estándar de glucosa a la izquierda y de xilosa a la derecha, elaborada con el método de DNS para microplaca.	88
Figura 30	Curva estándar para proteínas totales de acuerdo a la metodología de Bradford y utilizando BSA.	92
Figura 31	Proteína extracelular total obtenida en cultivos en LB-Xilano y LB-CMC.	93
Figura 32	Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal Chancos (I)	94
Figura 33	Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal Chancos (II)	95
Figura 34	Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal Olleros	96
Figura 35	Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal Huancahuaz	97

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Ubicación, temperatura y pH de las fuentes termales para el aislamiento de microorganismos celulolíticos	27
Tabla 2	Número y porcentaje de morfo-tipos de las cepas bacterianas aisladas de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz	29
Tabla 3	Número y porcentaje de las cepas seleccionadas de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz, por presentar halos de hidrólisis sobre CMC y/o xilano	30
Tabla 4	Códigos de las cepas que presentaron halos de hidrólisis sobre CMC y xilano de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz, que fueron seleccionadas por presentar halo de hidrólisis de CMC y/o xilano	33
Tabla 5	Actividad enzimática, productividad volumétrica y actividad específica endoglucanasa y xilanasas de los extractos crudos en LB-Xilano de las cepas seleccionadas de la fuente termal Chancos	41
Tabla 6	Actividad enzimática, productividad volumétrica y actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-CMC de las cepas seleccionadas de la fuente termal Chancos	42
Tabla 7	Actividad enzimática, productividad volumétrica y actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-Xilano de las cepas seleccionadas de la fuente termal Olleros	43
Tabla 8	Actividad enzimática, productividad volumétrica y actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-CMC de las cepas seleccionadas de la fuente termal Olleros	44

Tabla 9	Actividad enzimática, productividad volumétrica y actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-Xilano de las cepas seleccionadas de la fuente termal Huancarhuaz	44
Tabla 10	Actividad enzimática, productividad volumétrica y actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-CMC de las cepas seleccionadas de la fuente termal Huancarhuaz	44
Tabla 11	Cepas cultivables con actividad xilanasas y celulasa de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz	50
Tabla 12	Temperaturas y pH óptimos de las actividades endoglucanasa y xilanasas de los extractos crudos de las cepas DCH4, DO6, EOP2 y EHB4	52

LISTA DE ABREVIACIONES

16S rDNA	Molécula de DNA en el sector del gen 16S del ARN ribosomal
BSA	Albúmina de suero bovino
CMC	Carboximetil celulosa
DNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
Eg	Actividad enzimática endoglucanasa
FPasa	Actividad enzimática celulasa total sobre papel filtro
LB	Caldo Luria
LB-CMC	Caldo Luria suplementado con carboximetil celulosa
LB-X	Caldo Luria suplementado con carboximetil xilano
MBS	Medio basal salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TSB	Caldo tripticasa de soya
TSA	Agar tripticasa de soya
Xyl	Actividad xilanasa

RESUMEN

La elevada demanda de energía ha aumentado el interés en el uso de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles, en el cual las enzimas hidrolíticas termófilas y termoestables juegan un rol importante. En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue aislar y seleccionar bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas de las fuente termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz, ubicados en el Callejón de Huaylas, Ancash – Perú.

El aislamiento de las bacterias se hizo a partir de muestras frescas, enriquecidos *ex situ* y enriquecidos mediante cebos dejados *in situ*; se usó medio basal salino (MBS), 50°C y 6,5 de pH. La selección se realizó mediante la coloración con Rojo Congo sobre placas de cultivo suplementados con carboximetil celulosa (CMC) o xilano. Para la identificación taxonómica se analizó el gen 16S rDNA. Se cuantificó la actividad endoglucanasa, celulasa total y xilanasas de las cepas seleccionadas. A los extractos enzimáticos con los mejores resultados se les determinó la temperatura óptima, pH óptimo, y la estabilidad térmica.

Se aislaron 62 cepas de bacterias, de las cuales 29 mostraron halos de hidrólisis en CMC y xilano. Mediante el análisis del gen 16S rDNA se encontró que las cepas seleccionadas correspondían a *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* y *Cohnella laeviribosi*. La mayor actividad de celulasa y xilanasas se obtuvo en *B. subtilis* DCH4, *B. subtilis* DO6, *B. licheniformis* EPO2 y *C. laeviribosi* EHB4. Ensayos posteriores en estas cepas mostraron actividades endoglucanasas óptimas entre 45-60°C y pH entre 5-6. Las actividades xilanasas óptimas se obtuvieron entre 55-65°C y pH entre 6-7. El 50% de la actividad endoglucanasa de *C. laeviribosi* EHB4 se mantuvo después de una incubación a 80°C por 1 hora, resultado similar se obtuvo en la actividad xilanasas de *B. licheniformis* EPO2.

Se ha demostrado la presencia de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas en las fuentes termales de Chancos, Olleros y Huancarhuaz. Las cepas *C. laeviribosi* EHB4 y *B. licheniformis* EPO2 podrían ser utilizadas en el desarrollo de procesos de bioconversión de biomasa lignocelulolítica.

Palabras clave: *Termotolerante, fuente termal, celulasas, xilanasas, Bacillus Cohnella.*

ABSTRACT

The high demand of energy has increased interest in the use of lignocellulosic biomass to produce biofuel, wherein thermophilic and thermostable hydrolytic enzymes play an important role. In this context, the aim of this investigation was to isolate and select thermotolerant cellulolytic and xylanolytic bacteria from Chancos, Olleros and Huancarhuaz hot springs located in the Callejon de Huaylas, Ancash - Peru.

Isolation of bacteria was performed using fresh samples, *ex situ* enrichment and *in situ* baiting, in basal salt medium at 50°C and pH 6.5. The selection was performed by staining Congo Red on culture plates supplemented with carboxymethyl cellulose (CMC) or xylan. For taxonomic identification 16S rDNA gene was used. Endoglucanase, total cellulase and xylanase activities were quantified in selected strains. Some crude enzyme extracts that showed the best results were tested to determine optimum temperature, optimum pH, and thermal stability.

It was isolated 62 bacterial strains and 29 showed hydrolysis halo on CMC and xylan plates. The 16S rDNA gene analysis determined that the selected strains correspond to *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* and *Cohnella laeviribosi*. The highest cellulase and xylanase activities were obtained to *B. subtilis* DCH4, *B. subtilis* DO6, *B. licheniformis* EPO2 and *C. laeviribosi* EHB4. Subsequent assays in these strains showed endoglucanase activity optimum between 45-60°C and 5-6 of pH. The xylanase activity optimum was obtained at 55-65°C and pH 6-7. Fifty percent of the endoglucanase activity of *C. laeviribosi* EHB4 after incubation at 80 °C for 1 hour is maintained, a similar result was obtained in the xylanase activity of *B. licheniformis* EPO2.

It was demonstrated the presence of cellulolytic and xylanolytic thermotolerant bacteria in Chancos, Olleros and Huancarhuaz hot springs. *C. laeviribosi* EHB4 and *B. licheniformis* EPO2 may contribute to the development of lignocellulosic biomass bioconversion process.

Keywords: *Thermotolerant, hot spring, cellulases, xylanases, Bacillus, Cohnella.*

I. INTRODUCCION

Con el fin de reducir la dependencia a los combustibles fósiles se han iniciado amplias investigaciones acerca de la producción a gran escala de combustibles líquidos alternativos a partir de recursos renovables (van Dick y Pletschke, 2012), habiéndose orientado la investigación al uso de la biomasa lignocelulósica que es la materia prima renovable más abundante sobre la tierra y de bajo costo (Peng et al., 2012; Anwar et al., 2014). Además, el uso y la producción de bioetanol se hace atractiva como alternativa para reducir el calentamiento global y el efecto invernadero, donde los desechos de la agroindustria y forestería sin utilidad alimenticia podrían ser usados para producir biocombustibles de segunda generación y satisfacer la demanda energética (Saxena et al., 2009; Asgher et al., 2013; Bhalla et al., 2013).

La bioconversión de la biomasa a biocombustible es un proceso difícil debido a la composición y estructura compleja de la lignocelulosa conformada principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa (Weber et al., 2010; Peng et al., 2012; Bhalla et al., 2013), éstas dos últimas son las fuentes de carbohidratos más abundantes y con alto potencial de bioconversión a combustibles líquidos y gaseosos (Bhalla et al., 2013). La celulosa es un polímero no ramificado de glucosas unidas por enlace β -1,4; la hemicelulosa es un heteropolímero ramificado de D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido glucurónico; y la lignina es un heteropolímero complejo e hidrofóbico formado por moléculas aromáticas de tipo fenilpropanoides tales como alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Menon y Rao, 2012; Van Dick y Pletschke, 2012).

En la naturaleza la degradación de lignocelulosa está a cargo, principalmente, de hongos y bacterias que secretan un amplio rango de enzimas requeridas para la hidrólisis completa de celulosa, hemicelulosa y lignina (Paës et al., 2012). Del mismo modo, en los procesos de bioconversión para la producción de biocombustible se requiere superar la naturaleza recalcitrante de la lignocelulosa mediante pre-tratamientos físicos o químicos que rompen su estructura, a fin que las enzimas celulasas y hemicelulasas accedan al sustrato y mediante la acción

sinérgica liberen azúcares simples fermentables (Kumar et al., 2008; Bhalla et al., 2013; van Dick y Pletschke, 2012; Asgehr et al., 2013).

El bioproceso típico de conversión de lignocelulosa a biocombustible es poco eficiente y de alto costo porque involucra varios pasos: pre-tratamiento, producción de enzimas e hidrólisis de la biomasa, liberación de azúcares fermentables y producción de etanol; por lo cual la implementación de procesos fermentativos termófilos con enzimas termoestables podría superar esta limitación y reducir etapas (van Dick y Pletschke, 2012). Por otro lado, las enzimas termotolerantes son de gran interés para otros procesos industriales y pueden ser encontrados en microorganismos que toleran y viven a altas temperaturas (Mehta y Satyanarayana, 2013).

Existen varios reportes sobre la diversidad microbiana en fuentes termales de diferentes partes del mundo y se ha demostrado que son hábitats de importancia para este tipo de microorganismos (Mehta y Satyanarayana, 2013). Por lo tanto, no habiéndose encontrado estudios en fuentes termales peruanas, el objetivo del siguiente trabajo fue explorar la microflora lignocelulolítica termotolerante de las fuentes termales Chancos, Olleros, y Huancarhuaz, ubicados zona andina peruana, para lo cual se utilizaron técnicas tradicionales de aislamiento y selección, seguida de la cuantificación de la actividad enzimática e identificación taxonómica mediante la técnica 16S rDNA. Adicionalmente, se evaluaron condiciones de temperatura óptima, pH óptimo y termoestabilidad de cuatro extractos enzimáticos crudos que mostraron la mayor actividad.

II. ANTECEDENTES

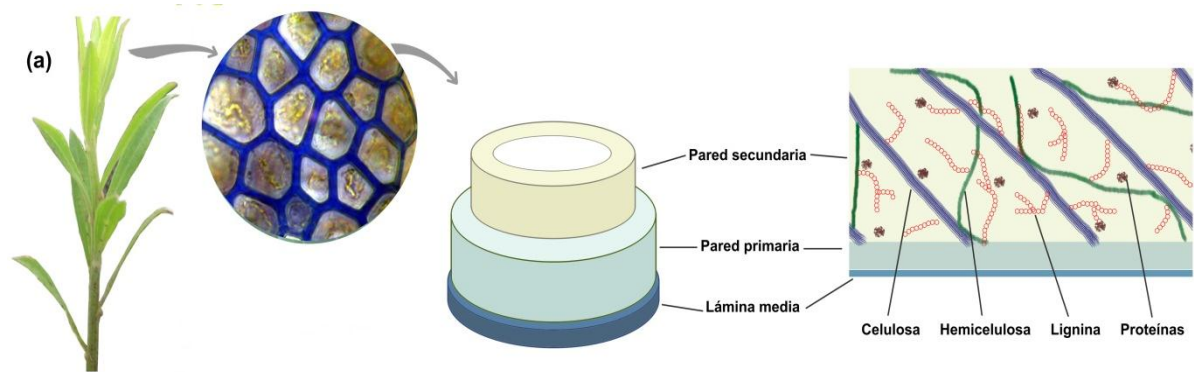
CELULOSA Y CELULASAS

La biomasa vegetal contiene entre 40-50% de celulosa, que se encuentra asociada principalmente con hemicelulosa y lignina, y en su conjunto es conocida como material lignocelulósico (Anwar et al., 2014), ver figura 1a.

La celulosa es el polisacárido más abundante de las paredes celulares de las plantas y está compuesto por largas cadenas de más de 25 000 moléculas de β -glucosa unidas por enlaces β -1,4 (Juturu y Wu, 2014). Las mismas que se ordenan en fibras y paquetes mediante numerosos enlaces no covalentes de hidrógeno (Figura 1b), convirtiéndose en una sustancia cristalina, insoluble, recalcitrante y sin capacidad de degradación espontánea (Wilson, 2008; van Dick y Pletschke, 2012). En estado natural, la celulosa se encuentra en forma paracristalina o heterogénea, es decir tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas (Juturu y Wu, 2014). Las regiones cristalinas son altamente ordenadas y más resistente a la degradación enzimática; mientras que las regiones amorfas son poco ordenadas y más sensibles a la degradación (Voutilainen et al. 2008).

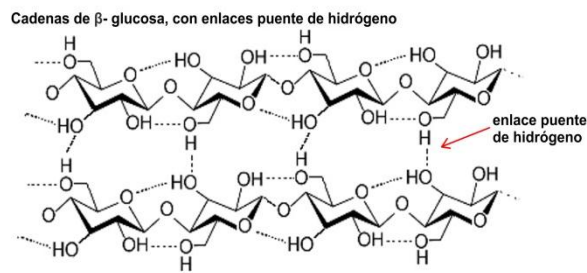
Debido a que la celulosa es el polímero más abundante de la tierra y puede ser utilizada como fuente de carbono para la producción de sustancias químicas valiosas (Assaret et al., 2012; Juturu y Wu, 2014); la degradación de celulosa a monómeros de glucosa es un paso importante para los procesos fermentativos (Assaret et al. 2012; van Dick y Pletschke, 2012). Este proceso se puede realizar de dos maneras: mediante la hidrólisis química, con la aplicación de ácidos inorgánicos que generan contaminación y toxinas, o por medio de hidrólisis biológica, con aplicación de enzimas como parte de las tecnologías limpias que no contaminan (Juturu y Wu, 2014).

En este sentido la hidrólisis de celulosa mediante enzimas nace como una prominente tecnología para convertir biomasa lignocelulósica en azúcares simples para la producción de bioetanol (van Dick y Pletschke, 2012).



CELULOSA

(b)



HEMICELULOSA-XILANO

(c)

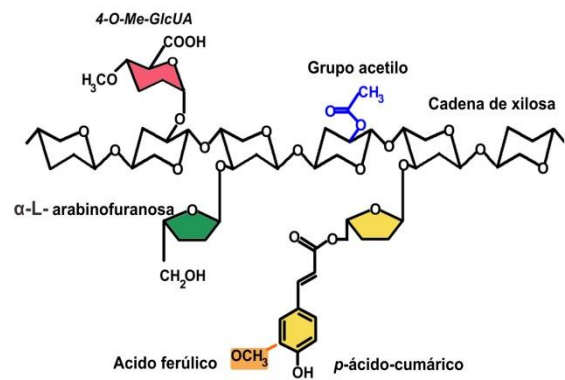


Figura 1: Principales componentes de la pared celular de las plantas. (a) Ubicación de la celulosa, hemicelulosa y xilano en la pared celular, (b) estructura de la celulosa y (c) estructura de la hemicelulosa tipo xilano. *Diagramación realizada en base a Anwar et al. (2014) con modificaciones.*

Para lograrlo, los microorganismos juegan un rol muy importante porque muchos de ellos producen enzimas hidrolíticas llamadas celulasas, las cuales cortan los enlaces β -1,4 de la celulosa y producen como productos primarios moléculas de glucosa, celobiosa y celo-oligosacáridos (Shingania et al., 2010).

La degradación de la celulosa a monómeros de glucosa requiere la actuación sinérgica de un complejo enzimático, compuesto por tres tipos de enzimas celulasas que han sido clasificadas de acuerdo al lugar de hidrólisis en (i) endoglucanasas EC 3.2.1.4, (ii) exoglucanasas (exoglucanasa EC 3.2.1.9 y celobiohidrolasa EC 3.2.1.176) y (iii) β -glucosidasas o celobiasas EC 3.2.1.21 (Lynd et al., 2002; van Dick y Pletschke, 2012; Jurutu y Wu, 2014).

Las endoglucanasas cortan la cadena polisacárida de celulosa en sitios internos de regiones amorfas, generando oligosacáridos de varias longitudes; las exoglucanasas R actúan sobre los extremos reducidos de celulosa liberando la glucosa o celobiosa; las celobiohidrolasas (exoglucanasas NR) actúan sobre los extremos no reducidos produciendo celobiosa, y finalmente las β -glucosidasas hidrolizan las celodextrinas y celobiosa solubles cortando los enlaces glucosídicos β -1,4 para liberar β -glucosa (Lynd et al., 2002; Juturu y Wu, 2012). La figura 2, presenta un esquema del modo de acción de los tres tipos de celulasas.

El rol e importancia de las celulasas en la naturaleza es el reciclaje de celulosa dentro del ciclo del carbono (Hongpattarakere, 2002; Percival et al, 2006). Sin embargo, en la actualidad la producción de celulasas se constituye en la tercera industria más grande a nivel mundial debido a sus aplicaciones biotecnológicas variadas (Shingania et al., 2010), tales como el procesamiento del algodón, el reciclaje de papel, las industrias alimentarias humana y animal, industria de los detergentes y textilera, industria del papel, producción de bioetanol, entre otros (Bhat, 2000; Lynd et al., 2002; Collins et al., 2005; Bayer et al, 2007; Voutilainen et al., 2008; Blumer et al., 2008; Shingania et al., 2010; van Dick y Pletschke, 2012; Yan y Wu, 2013). Dentro de las cuales, su aplicación en la bioconversión de biomasa a etanol es una alternativa sustentable en la producción de combustibles renovables (Shingania et al., 2010).

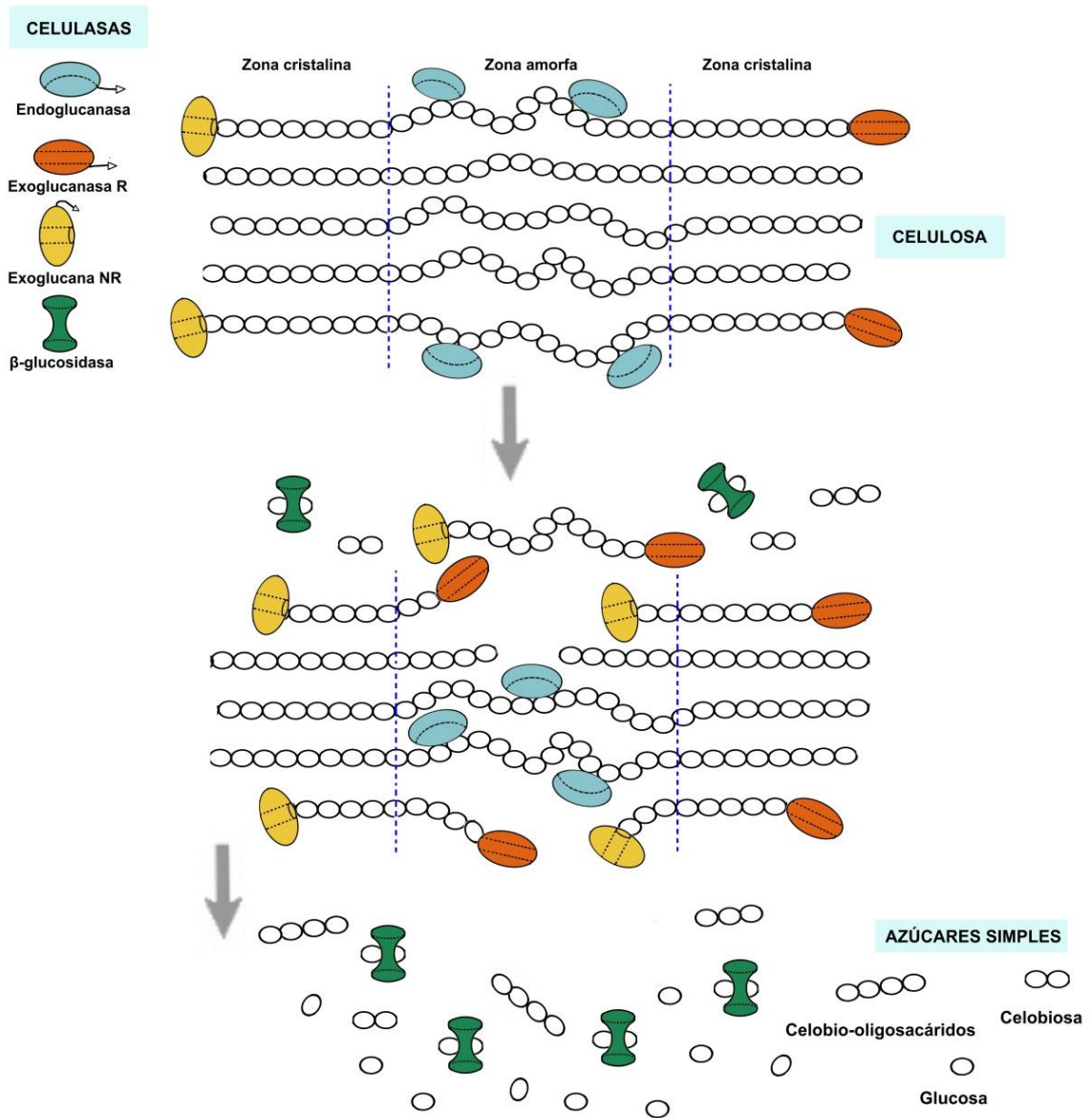


Figura 2: Acción coordinada de las celulasas sobre la celulosa amorfa y cristalina. *El diagrama fue realizado en base a Lynd et al.(2002)*

XILANO Y XILANASAS

El xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa y después de la celulosa aporta una tercera parte de la energía renovable de la tierra (Jiang et al., 2004; Collins et al., 2005). Se encuentra en las paredes celulares de las plantas constituyendo hasta en 20-30% del peso seco de las plantas leñosas y anuales (Dhiman et al., 2008), ver figura 1a.

El xilano, manano, galactano y arabinano son hemicelulosas cuya composición mayoritaria son moléculas de xilosa, manosa, galactosa y arabinosa respectivamente (Dhiman et al., 2008). El xilano es una molécula compleja altamente ramificada conformada por heteropolisacáridos unidos con enlace β -1,4 a una cadena principal homopolimérica β -D-xilanopiranososa (Kulkarni et al., 1999; Collins et al., 2005; Jiang et al., 2005). En la cadena principal las unidades del β -D-xilanopiranosilo pueden estar sustituidos en diversos grados por grupos de cadenas de 4-O-metil-D-glucuronopiranosilo, α -L-arabinofuranosilo, acetilo, ácido feruloilo y/o *p*-cumaroilo (Collins, et al., 2005), ver figura 1c. Además, las moléculas de xilano de diferentes fuentes muestran significativa variación en su composición y estructura (Butt et al., 2008),

Los microorganismos involucrados en la degradación de hemicelulosas son variados y algunos de ellos producen xilanasas termofílicas (Sharma y Kumar, 2013). El término xilanasas por lo general hace referencia a un grupo de enzimas que actúan en conjunto y sinérgicamente para degradar xilano en azúcares simples (Jiang et al., 2004; Collins et al., 2005; Butt et al., 2008; Peng, et al. 2012; Sharma y Kumar, 2013).

Las principales xilanasas involucradas son β -1,4-endoxilanasas EC 3.2.1.8 y β -xilosidasa EC 3.2.1.37 (Peng et al., 2012). Tal como se muestra en la figura 3, las endo-xilanasas inician la conversión del xilano cortando al azar los enlaces glucosídicos internos de la cadena principal, generando una mezcla de xilooligosacáridos (Collins et al., 2005; Butt et al., 2008; Sharma y Kumar, 2013). La β -xilosidasa remueve las xilasas terminales del extremo no reductor de los xilooligosacáridos (Peng et al., 2012).

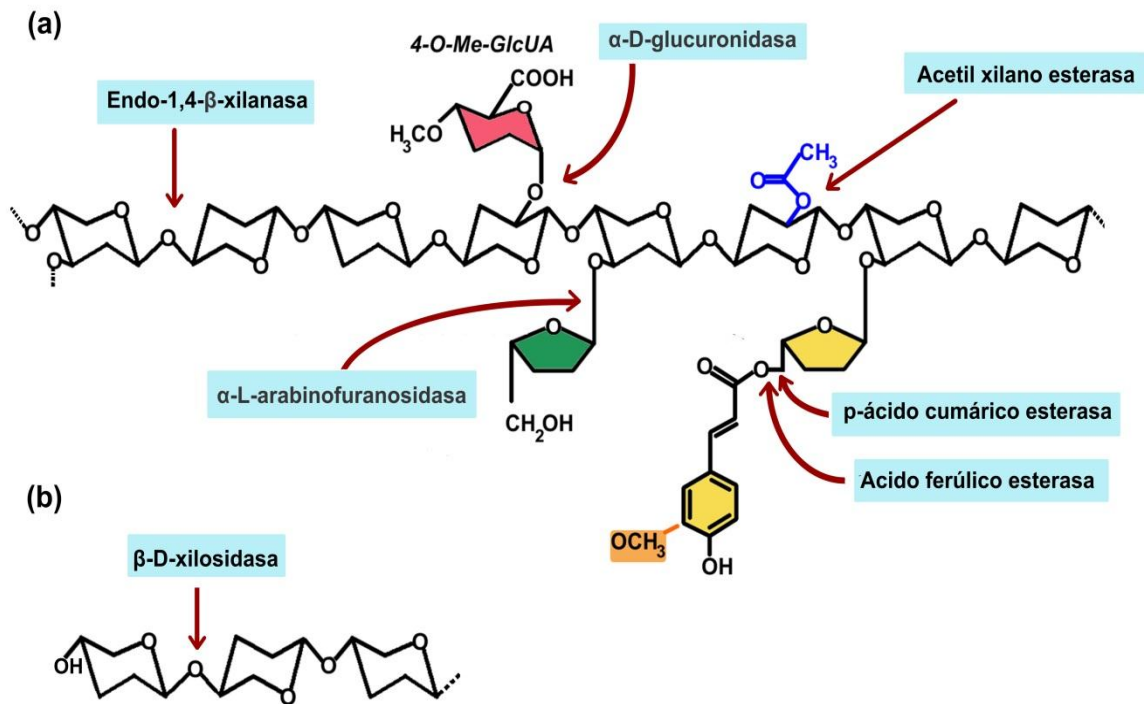


Figura 3: Lugares de acción de las xilanasas, (a) estructura completa del xilano y los sitios de ataque de las enzimas xilanolíticas. (b) hidrólisis de la xilooligosacárido por la β-xilosidasas. *Diagrama de acuerdo a Collins et al. (2005).*

Adicionalmente, se da la participación de enzimas accesorias tales como: α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) que hidroliza residuos de L-arabinosa que se encuentran a 2 y/o 3 posiciones de la cadena del xilano; α -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) que corta enlaces α -1,2 entre los residuos del ácido glucurónico; β -D-xilopiranosilo, acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72) que remueve el grupo O-acetilo del acetil xilano; ácido ferúlico esterasa y ácido cumárico esterasa (EC 3.1.1.73) que hidrolisan los ácidos fenólicos unidos en la posición 4 del residuo arabinofuranósido (Peng et al., 2012).

Al igual que en las celulasas la actividad de las xilanasas son importantes en el mantenimiento del flujo y ciclo del carbono (Sharma y Kumar, 2013). Sin embargo, las xilanasas son investigadas por su amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas tales como la producción de bioetanol, preparación de alimentos para animales, producción de xilo-oligosacáridos (XOs), industria del papel, industria de la panificación y clarificación de jugos, entre otros (Dhiman et al. 2008; Sharma y Kumar, 2013).

Por otro lado, se ha reportado que algunas enzimas tienen actividad endoxilanasas y celulasas a la vez, es decir son bifuncionales (van Dick et al., 2009, Sharma y Kumar, 2013). El uso de éstas puede ser más eficiente y barato en los procesos de bioconversión de residuos agrícolas, industriales y municipales porque pueden degradar la celulosa y el xilano simultáneamente (Sharma y Kumar, 2013). Sin embargo, para el blanqueamiento de la pulpa de papel se requiere xilanasas libres de actividad celulasas (Dhiman et al., 2008; Sharma y Kumar, 2013).

MICROORGANISMOS TERMOTOLERANTES Y TERMOFILOS CON CAPACIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA

Las celulasas son producidas por una amplia diversidad de organismos, incluyendo entre ellos a bacterias, hongos, protozoos y algunos animales tales como insectos y cangrejos (Yan y Wu, 2013). De igual manera se ha encontrado que las xilanasas son producidas por una variedad de microorganismos entre ellos las bacterias, hongos filamentosos, actinomicetos y levaduras (Sharma y

Kumar, 2013). Los hábitats donde se encuentran estos microorganismos por lo general incluyen ambientes con alta cantidad de lignocelulosa, donde los microorganismos han desarrollado estrategias para su utilización mediante la interacción entre microorganismos degradadores y no degradadores (Lynd et al., 2002; Collins et al., 2005). En ese sentido, los hábitats con mayores investigaciones son el rumen de los animales y el compost (Wilson, 2008).

El microorganismo más estudiado para la producción de estas enzimas ha sido *Trichoderma reesei*, pero la aplicación de éstas en diversos procesos requiere la incorporación de enzimas termoestables y robustas provenientes de otras fuentes (Bischoff et al., 2006). Es así que muchos de los estudios en nuestros días están encaminadas en la búsqueda de enzimas termoestables y extremófilas, cuya fuente principal son microorganismos termotolerantes y termófilos provenientes de fuentes termales, piscinas calientes, compost, etc. (Collins et al., 2005).

El término termófilo proviene de dos palabras griegas: *termotita* (calor) y *fila* (amor), de acuerdo a estas raíces los microorganismos termófilos no solo toleran altas temperaturas sino que requieren altas temperaturas para sobrevivir (Madigan et al., 1998; Robb et al., 2008; Mehta y Satyanarayana, 2013); pero este concepto aun no es muy claro en cuanto a la delimitación entre mesófilo termotolerante y termófilo. Según Mehta y Satyanarayana (2013), los microorganismos termófilos por lo general crecen sobre 50°C hasta 121°C y se clasifican en dos grupos: termófilos moderados o facultativos y termófilos obligatorios; éste último grupo se separa a su vez en termófilos extremos e hipertermófilos. Los termófilos facultativos no requieren de muy altas temperatura para vivir y sus temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre 40-60°C, en el segundo grupo los termófilos extremos tienen temperaturas de crecimiento de 60-85°C y los hipertermófilos muestran temperaturas óptimas de crecimiento mayores a 85°C (Mehta y Satyanarayana, 2013).

Los microorganismos termotolerantes y termófilos se encuentran ampliamente distribuidos en diversos hábitats, pero los lugares volcánicos, geotérmicos (fumaloras, fuentes termales, géiseres), y profundos respiraderos hidrotermales de los océanos son los lugares con mayor ocurrencia (Mehta y Satyanarayana, 2013). Existen diversos estudios de la composición microbiana de las fuentes

termales donde se han encontrado variedad de cepas termófilas pertenecientes a los géneros *Brevibacillus*, *Thermus*, *Paenibacillus*, *Cohnella*, *Anoxybacillus*, *Moorella*, *Geobacillus*, etc., con temperaturas óptimas de crecimiento desde 40 a 94°C, aeróbicos y/o anaeróbicos, amplia diversidad metabólica (Mehta y Satyanarayana, 2013) y producción de enzimas termoestables (Bhalla et al., 2013).

Adicionalmente, se han encontrado bacterias termotolerantes y termófilas productoras de enzimas hidrolíticas en fuentes termales, entre ellas se reportan varias representantes del género *Bacillus* que muestran actividad celulítica y/o xilanolítica (Helianti, 2007; Derekova et al., 2008; Lee et al., 2008; Pakpitcharoena et al., 2008; Kamble and Jadhav 2011; Acharya y Chaudhary, 2012; Acharya et al., 2012; Pathania et al., 2012).

VENTAJAS DE LAS ENZIMAS TERMOESTABLES

La termoestabilidad enzimática es definida como la capacidad que tiene una enzima para retener su conformación estructural activa a altas temperaturas y tiempos prolongados (Bhalla et al., 2013). Las enzimas termófilas son de mucho interés a nivel industrial porque presentan mejores ventajas biotecnológicas comparadas con las mesófilas: (a) pueden ser clonadas y producidas en huéspedes mesófilos, y posteriormente purificadas con procesos que involucren incorporación de calor, (b) pueden presentar mayor nivel de resistencia a factores desnaturalizantes, (c) muestran alta estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento (Sakuraba y Ohshima, 2013).

Adicionalmente, las enzimas termoestables ofrecen ventajas potenciales en la hidrólisis de lignocelulosa: (a) incrementan la solubilidad de los sustratos y productos, lo cual aumenta la velocidad de la reacción y reduce la cantidad de enzima requerida; (b) acortan el tiempo de hidrólisis; (c) reducen el riesgo de contaminación e incrementan la productividad; (e) facilitan la recuperación de los productos volátiles, por ejemplo el etanol; (f) reducen el costo energético que implica el enfriamiento del sustrato después del pre-tratamiento térmico (Bhalla et al. 2013).

Por las razones expuestas, las celulasas y xilanasas termófilas son de gran interés para diversos procesos industriales y comerciales, donde una de las principales utilidades se enmarca en la bioconversión de biomasa.

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS Y XILANOLÍTICOS

Las celulasas y xilanasas son enzimas expresadas por una gran variedad de microorganismos, por lo tanto el aislamiento, tamizaje y cultivo de los microorganismos con actividad hidrolítica son pasos para la obtención de nuevas enzimas y requieren el uso de medios de cultivo selectivos con la incorporación sustrato carbonado limitante (Lynd et al., 2002; Jurutu y Wu, 2014).

En ese sentido, los sustratos carbonados lignocelulósicos pueden ser variados y se agrupan en compuestos sintéticos como la carboxi-metil-celulosa (Lynd et al., 2002; Achayra y Chaudhary, 2012), celulosa microcristalina (Asshared et al. 2012), xilano comercial (Sharma y Kumar, 2013), entre otros; y sustratos insolubles, conformado por papel filtro y biomasa lignocelulósica pre-tratada, muchos de ellos son residuos agroindustriales (Song y Wei, 2010; Wang et al., 2012).

La metodología de aislamiento puede ser de manera directa mediante la técnica de dilución sobre agar, utilizando una muestra fresca que contiene los microorganismos, pero también se aplican enriquecimientos *ex situ* con sustratos específicos tal como el carboxi-metil-celulosa (Achayra y Chaudhary, 2012), celulosa microcristalina (Asshared et al., 2012), residuos agroindustriales (Adsul et al. 2004, Cammassola y Dillon, 2007; Song y Weid, 2010; Wang et al. 2012) y papel filtro (Wang et al. 2012). Así mismo, en algunas fuentes termales se han practicado enriquecimientos *in situ*, habiéndose dejado sustratos específicos a manera de cebos para promover del desarrollo de los microorganismos de interés (Kublanov et al., 2009).

La selección cualitativa o semi-cualitativa de la actividad hidrolítica de los microorganismos, evalúa la capacidad celulolítica y xilanolítica por lo general

sobre placas de cultivo que contienen el polisacárido de interés, luego se tiñe con soluciones coloreadas que detectan el polisacárido residual formándose un halo de hidrólisis alrededor de las cepas con actividad hidrolítica (Sirisena y Manamendra, 1995; Percival et al., 2006). De acuerdo a esta metodología, para la selección de microorganismos celulolíticos generalmente se utiliza placas de cultivo suplementado con CMC, con el inconveniente que no siempre los microorganismos que hidrolizan CMC pueden hidrolizar celulosa (Lynd et al. 2002; Percival et al., 2006). Además Percival et al. (2006) indican que con el uso de placas con CMC por lo general se detecta la actividad endoglucanasa, mientras que la actividad exoglucanasa es difícilmente detectada. Los reportes sobre el sustrato para la selección y evaluación de actividad xilanolítica indican que por lo general se usa el xilano de *birchwood*; sin embargo el uso de xilanos provenientes de otras plantas también es reportado (Salem et al., 2012; Sharma y Kumar, 2013)

La producción enzimática de celulasas y xilanasas es altamente influenciada por las condiciones del medio de cultivo, tales como: el sustrato carbonado, pH del medio, disponibilidad de los nutrientes, presencia y concentración de inductores o represores, temperatura y tiempo de incubación; por lo tanto, es necesario optimizar los medios de producción para cada cepa con actividad (Shinghania et al., 2012). También se ha definido que la producción en estadios tempranos de crecimiento microbiano es una característica de importancia que se debe considerar en los trabajos de bioprospección (Achayra y Chaudary, 2012).

CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA: CELULASAS Y XILANASAS

Los ensayos cuantitativos para la evaluación de actividad enzimática pueden ser de tres tipos: (a) la cuantificación de la acumulación de productos después de la hidrólisis, (b) la cuantificación de la desaparición del sustrato, y (c) el cambio de las propiedades físicas de los sustratos (Percival et al., 2006; Zhang et al. en Dashtban et al., 2010).

La cuantificación de la actividad celulasas y xilanasas se realiza generalmente mediante ensayos de azúcares reductores, es decir, se cuantifican los productos

de la hidrólisis enzimática que expresan la capacidad hidrolítica (Dashtban et al., 2010; Jurutu y Wu, 2014). La evaluación cuantitativa mediante la acumulación de productos después de la actividad hidrolítica se puede hacer usando papel filtro, CMC, celobiosa ó xilano (Shingani et al., 2010; Asgher et al. 2013, Jurutu y Wu, 2014); pero es necesario considerar que estos ensayos no predicen completamente la eficiencia de las celulasas y xilanasas durante la bioconversión de materiales lignocelulósicos, porque no hay una clara relación entre la actividad sobre sustratos solubles con los insolubles (Shingani et al., 2010).

La formación de productos de la hidrólisis frecuentemente se mide mediante el método de DNS ó el método de Nelson Somogy porque tienen un alto grado de detección de azúcares reductores y poca interferencia con la celulasa (Percival et al., 2006). El reactivo de DNS es usado como un método colorimétrico y tiene los siguientes componentes: 3,5-ácido dinitrosalicílico que reacciona con la glucosa, tartrato de potasio que decrece la tendencia de que la muestra se una el oxígeno, fenol que incrementa la coloración producida por la reacción, bisulfito de sodio que estabiliza el color producido por los reactantes y un buffer alcalino para la reacción redox entre el DNS y el azúcar reductor (Dashtban et al., 2010). Una de las desventajas de este método es que algunos azúcares reductores pueden ser degradados durante el desarrollo del protocolo (Miller en Dashtban et al., 2010).

La cuantificación de la actividad celulolítica se puede hacer (a) mediante la evaluación individual de cada tipo de celulasa: endoglucanasa, exoglucanasa y glucosidasa, (b) midiendo celulasas totales (Percival et al., 2006). Para la actividad endoglucanasa se utiliza una celulosa soluble con alto grado de polimerización como es la carboximetil celulosa (Dashtban et al., 2010). Las exoglucanasas muestran relativamente alta actividad sobre Avicel (Percival et al., 2006; Dashtban et al., 2010). Sin embargo, el Avicel contiene algunas regiones amorfas y celodextrinas solubles que podría servir de sustrato para endoglucanasas durante la hidrólisis por exoglucanasas (Dashtban et al., 2010). Además, otros sustratos menos comunes para medir o detectar la actividad exoglucanasa son usados tales como el *p*-D-celobiosido en hongos y bacterias, celulosa microcristalina y MU- β -D-celobiosido en bacterias (Dashtban et al., 2010). La actividad glucosidasa puede ser cuantificada por varios sustratos

cromatogénicos por ejemplo *p*-nitrofenol- β -glucósido y celobiosa (Percival et al., 2006; Dashtban et al., 2010).

La cuantificación de la actividad de celulasa total mide la acción sinérgica de los tres tipos de celulasas, y siempre se usa sustratos insolubles tal como el papel filtro, algodón, celulosa microcristalina, lignocelulosa pre-tratada, etc. (Percival et al., 2006). Sin embargo, en 1987 la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) estandarizó el método del papel filtro (FPA), que tradicionalmente utiliza como sustrato una tira de 1x 6 cm de papel filtro Whatman N° 1 y para la cuantificación se emplea el método del DNS (Dashtban et al., 2010). Sin embargo, en la actualidad se han desarrollado métodos miniturizados para la determinación de la actividad enzimática basado en el método clásico, es decir los azúcares reductores liberados del papel filtro, Avicel, caña de maíz, CMC y arabinosaxilano pueden ser cuantificados usando placas de microtitulación de 96 pozos (King et al., 2009). Este método no sólo puede ser usado para la bio-prospección de nuevas enzimas, sino también reemplaza los ensayos colorimétricos de cuantificación tradicional aplicados a la actividad de celulasas conocidas, donde las ventajas son (a) pequeños volúmenes de reactivo requerido, (b) reducción de costos, (c) minimización de errores y (d) reducción del tiempo de cuantificación (Dashtban et al., 2010). Por otro lado, se vienen desarrollando otros métodos tales como: microbalance de cuarzo cristalino, ensayo automatizado de FPA, microfibrillas fluorescentes y biosensor amperométricos de la celobiosa deshidrogenasa (Percival et al., 2006; Dashtban et al., 2010).

Finalmente, se puede precisar que todos los procesos enzimáticos de hidrólisis dependen completamente de una variedad de factores tales como pH, tiempo, temperatura, sustratos y las propias características de las enzimas (Anwar et al., 2014). Por otro lado, las condiciones de los procesos industriales son generalmente hostiles en términos de temperatura y pH extremos, presencia de inhibidores, etc. por lo que se requiere hacer la búsqueda de enzimas robustas y con características apropiadas para soportar dichas condiciones (Bajaj y Manhas, 2012).

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MEDIANTE 16S rDNA

Uno de los potenciales más atractivos en el uso del gen 16S rRNA, es que la secuencia permite la identificación del género y especie de las cepas bacterianas aisladas sin necesidad de ningún ensayo de reconocimiento bioquímico (Janda y Abbot, 2007). Es así que la identificación taxonómica mediante el análisis de la secuencia del gen 16S, es una técnica muy aceptable debido a que cumple con las siguientes características (Woese, 1987):

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales y constituye una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios evolutivos.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas. Sin embargo, contienen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño de aproximadamente 1500 bp minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar existen bases de datos del gen 16S en continuo crecimiento.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Existen bacterias termotolerantes con capacidad celulolítica y xilanolítica en las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancahuaz, ubicados en el Callejón de Huaylas.

OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y seleccionar bacterias termotolerantes con capacidad celulolítica y xilanolítica de fuentes termales del Callejón de Huaylas

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar bacterias termotolerantes de las fuentes termales del Callejón de Huaylas.
- Seleccionar las bacterias termotolerantes con capacidad celulolítica y xilanolítica.
- Identificar la especie de cada bacteria seleccionada, usando la técnica molecular 16S rDNA.
- Cuantificar la actividad celulasa y xilanasas de los extractos crudos de las bacterias seleccionadas
- Evaluar la temperatura óptima, pH óptimo y estabilidad térmica de las celulasas y xilanasas obtenidos de los extractos crudos de las bacterias con mayor capacidad hidrolítica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

COLECTA DE LA MUESTRA

Las muestras fueron tomadas de tres fuentes termales ubicadas en el Callejón de Huaylas: Chancos, Olleros y Huancarhuaz.

De acuerdo a las características de los lugares de muestreo se colectaron agua con sedimento para realizar el aislamiento directo a partir de la muestra fresca, y para preparar muestras enriquecidas *ex situ*. Para el enriquecimiento *in situ* mediante cebos, se dejaron los sustratos específicos en el fondo de las pozas. Durante la toma de muestras se registró la ubicación geográfica, la temperatura y el pH.

AISLAMIENTO

El aislamiento de microorganismos se realizó a partir de tres tipos de muestras para cada fuente: (i) muestra fresca (aislamiento directo), (ii) muestra a partir de enriquecimientos *in situ* mediante cebos dejados en el lugar, y (iii) muestra proveniente de enriquecimiento *ex situ* con sustratos de enriquecimiento en el laboratorio.

Para el aislamiento de los microorganismos en los tres tipos de muestras se utilizó el método de dilución-agar. Para lo cual se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} de la muestra, se inoculó 0,1 ml de cada dilución mediante extensión sobre la superficie del medio de cultivo, se incubó a 50°C hasta 15 días. El medio de cultivo consistió en un medio basal de sales (MBS) conteniendo (g.l^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (11,7), KH_2PO_4 (3,7), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,8), extracto de levadura (0,5), peptona (0,5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,16), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,14) y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,37); suplementado con glucosa (10,0), y Agar-agar microbiológico Merck (15,0), el pH fue ajustado a 6,5 y esterilizado a 120°C, 1Atm. por 15 min. Todas las diluciones se sembraron por duplicado.

Después de la incubación, las bacterias con diferente color, tamaño y aspecto fueron aislados y purificados mediante estrías varias veces hasta conseguir cepas puras. Las cepas puras fueron conservadas en tubos inclinados de Agar Tripticosa de Soya (TSA, Merck) a 4°C.

ENRIQUECIMIENTO

Se realizaron dos formas de enriquecimiento (i) enriquecimiento *ex situ* en el laboratorio y (ii) enriquecimiento *in situ* dejando cebos en la fuente termal.

Los enriquecimientos *ex situ* se prepararon mezclando 25 ml de la muestra con 25 ml del medio salino (MBS) suplementado con bagacillo de caña de azúcar pre-tratado (0,5 g), celulosa microgranular (0,5 g), xilano de *beechwood* (0,5g), o papel filtro *Whatman* N°1 (2 cm x 2 cm) como única fuente carbonada. Las muestras se incubaron a 50°C por 14 días en condiciones estáticas. Cumplido el tiempo se aplicó el método de dilución-agar para el aislamiento.

El enriquecimiento *in situ* mediante cebos fue realizado de acuerdo a Kublanov et al. (2009), con algunas modificaciones. Se dejaron en el fondo de la poza de la fuente termal sobres hechos de tela sintética cosidos con hilo de Nylon conteniendo los siguientes sustratos: 50 mg de bagacillo de caña de azúcar con pre-tratamiento alcalino, 2 x 2cm de papel filtro *Whatman* N°1, 50 mg de celulosa micro granular (Sigma-Aldrich) envuelta en papel filtro 2 x 2 cm, ó 50 mg xilano de *beechwood* (Sigma-Aldrich). A los 14 días fueron recogidos y llevados al laboratorio en termos estériles para el aislamiento mediante el método de dilución-agar antes descrito. Se prepararon dos cebos por cada sustrato, que se juntaron para el aislamiento.

SELECCIÓN CUALITATIVA DE CEPAS CELULOLÍTICAS Y XILANOLÍTICAS

La selección cualitativa de las cepas de bacterias con actividad celulolítica y xilanolítica se hizo usando medios selectivos con sustratos carbonados limitantes

y la aplicación de la metodología de coloración con el Rojo Congo (Sirisena y Manamendra, 1995).

Las cepas aisladas fueron cultivadas en Caldo Tripticasa de Soya (TSB, Merck) a 50°C por 20 horas. Luego, 5µl de cada cultivo fue inoculado sobre placas que contenían MBS suplementado con Agar-agar (15,0 g.l⁻¹) y carboximetil celulosa de viscosidad media (CMC, 10,0 g.l⁻¹, Sigma-Aldrich) o xilano de beechwood (10,0 g.l⁻¹), el pH final fue ajustado a 6,5 antes de la esterilización. Las placas inoculadas fueron incubadas a 50°C por 5 días. Se prepararon dos repeticiones por cepa.

Para evaluar la hidrólisis de los sustratos, las placas fueron teñidas con Rojo Congo en solución al 1% (p/v) durante 10 minutos, luego fueron lavadas con NaCl 1 M por tres veces de 10 minutos cada uno. El proceso se realizó usando un agitador orbital a 40 rpm.

Las cepas que mostraron zonas claras alrededor (halos) fueron seleccionadas, se tomó la medida de los halos de hidrólisis como información cualitativa.

ANALISIS DEL 16S rDNA

Los DNA genómicos de las cepas de bacterias seleccionadas fueron extraídos con el Kit AxyPrep Bacterial Genomic Miniprep (Axygen) de acuerdo al protocolo del fabricante.

Para la amplificación del 16S rDNA, se usaron los primers universales: 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTA AG 3') y 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') de acuerdo a Reinsenbach et al. (2000). Se preparó 50µl de reacción conteniendo: 5µl de Buffer 10X; 5µl de dNTP 10 mM; 0,5 µl de 27F 10µM; 0,5 µl de 1492R 10µM; 0,25 µl de Dream Taq polimerasa 5U.µl⁻¹ y 5 µl DNA 10 ng.µl⁻¹. El protocolo térmico fue: desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, 20 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos, y elongación final de 72°C por 5 minutos.

La confirmación de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), utilizando 5µl de cada producto de la amplificación (PCR) o del marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA, Thermo Scientific). El revelado se hizo con bromuro de etidio y el tamaño de los productos del PCR se hizo por comparación con el marcador de peso molecular.

Los fragmentos amplificados se secuenciaron en la empresa, MacroGen Korea Inc. con primers universales internos: 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') y 800R (5'- TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'). Las secuencias fueron editadas y ensambladas usando los programas Chromas Lite versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2007), CAP3 (Huang y Madan, 1999), respectivamente. Luego fueron comparadas con la base de datos del NCBI GenBank (The National Center for Biotechnology Information U. S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando BLASTN. Posteriormente, las secuencias del presente trabajo y secuencias obtenidas en el GenBank fueron alineadas usando el programa CLUSTALX version 2.0 (Larkin et al. 2007) y finalmente el árbol filogenético se elaboró con el programa MEGA5 (Tamura et al. 2011) usando la metodología del Neighbor-Joining con 1000 Bootstraps, y Kimura 2-parámetros.

CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA

Preparación de extractos con enzimas extracelulares

Para la cuantificación de la actividad enzimática se prepararon extractos crudos enzimáticos extracelulares provenientes de cultivos líquidos suplementados con CMC o xilano de beechwood.

Para preparar los inóculos, las cepas de bacterias seleccionadas fueron sembradas en Caldo Tripticasa de Soya (TSB) e incubadas durante 8 horas a 50°C con rotación orbital de 180 rpm. Los cultivos obtenidos, se diluyeron en tubos con solución fisiológica estéril hasta conseguir diluciones con 0,1 de densidad óptica (D.O.) a 620nm de longitud de onda. 2,5 ml de estas diluciones, fueron inoculadas en 50ml de caldo LB (triptona 10 g.l⁻¹, NaCl10 g.l⁻¹, extracto de

levadura 5 g.l⁻¹) suplementado con CMC 1% (p/v) o xilano de beechwood 1% (p/v), pH 6,5. La incubación fue a 50°C, rotación orbitale de 180 rpm por 20 horas.

Después de la incubación los cultivos fueron mantenidos a 4°C por 1 hora y luego centrifugados a 10595 g (9000 rpm) por 10 minutos para retirar la masa celular, luego todos los extractos fueron filtrados al vacío sobre una membrana Millipore de 0,2 µm para retirar la masa celular residual.

Método del Acido 3,5-dinitrosalicílico para microplaca

Los extractos crudos libres de células y conteniendo las enzimas extracelulares fueron usados para la determinación de actividad endoglucanasas (o CMCase), celulasas totales (o PFase) y xilanasas. En todos los casos se utilizó el método del DNS descrito para microplacas por King et al. (2009), con algunas modificaciones.

Los ensayos usaron como sustratos: 1% de CMC para endoglucanasas, discos de papel filtro de 7 mm diámetro para celulasas totales y 1% xilano de beechwood para xilanasas, todos fueron preparados con buffer fosfato 0,05 M a pH 6. La hidrólisis se realizó a 50°C por 2 horas para endoglucanasas y xilanasas; mientras que para celulasas totales se incubó por 20 horas.

Para la cuantificación de los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis se mezcló 60µl de la muestra de hidrólisis con 120 µl del reactivo de DNS en microplacas de PCR, se cerraron herméticamente y fueron incubadas a 92°C por 10 minutos. Luego la microplaca fue colocada por 10 min. dentro de una fuente con agua helada, 36 µl de la mezcla fue transferida a una microplaca de microtitulación transparente y fondo plano que contenía 160 µl de agua destilada por pozo, se mezcló bien y se midió la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro para microplaca (Biotek Instruments, Inc.).

La curva estándar se preparó usando glucosa anhidra para la actividad endoglucanasa y celulasa total; y xilosa anhidra para la actividad xilanasa, ambos azúcares fueron preparados en buffer fosfato de pH 6 y 0,05 M a concentraciones de 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 µg.ml⁻¹. Todas las muestras y

los estándares fueron preparados por triplicado y las absorbancias fueron medidas dos veces, obteniéndose en total seis mediciones por muestra.

Se define como una unidad enzimática (U), a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de producto (azúcar reductor) por minuto bajo las condiciones del ensayo: 50°C y pH 6. La productividad enzimática indica las unidades enzimáticas producidas en una hora de cultivo del microorganismo en el medio de producción; mientras que la actividad específica relaciona la actividad enzimática con respecto a la cantidad de proteína presente en el extracto. Los detalles de la preparación de la curva estándar, la prueba de hidrólisis y los cálculos de conversión se encuentran en los anexos 07 y 08.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación del contenido total de proteínas de los extractos crudos se realizó mediante el ensayo de Bradford (1976). Para elaborar la curva estándar se utilizó albúmina del suero bovino (BSA, Sigma) a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El ensayo se preparó para el formato de microplaca de 96 pozos, mezclando 100 μl del extracto o el estándar proteico (BSA) con 100 μl del reactivo de Bradford (ver Anexo 09).

El ensayo se hizo con tres repeticiones por muestra y las absorbancias se midieron a 595nm de longitud de onda por duplicado en un espectrofotómetro para microplaca. Los valores obtenidos fueron convertidos a $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ según la curva estándar elaborada y se utilizaron para calcular la actividad enzimática específica de cada extracto.

DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA ÓPTIMA DE CRECIMIENTO

Las bacterias seleccionadas fueron cultivadas a 30, 35, 45, 50, 55 y 60°C para evaluar su velocidad de crecimiento durante la fase exponencial y determinar su temperatura óptima de crecimiento.

Se inoculó 250µl de cultivo fresco de 8 horas y 0,1 de D.O. a 620nm en tubos con 5ml de TSB. El tiempo de incubación fue de 12 horas con 30 minutos y agitación orbital de 180 rpm. Para realizar la curva de crecimiento, se midió D.O. a 620nm cada 2 horas y media. Se prepararon dos repeticiones y dos lecturas, con un total de 4 mediciones. Para obtener la temperatura óptima de crecimiento se calculó la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial a cada temperatura de incubación usando las curvas aritméticas de D.O con respecto al tiempo. Los valores obtenidos fueron graficados como velocidad vs temperatura de crecimiento (Madigan et al. 1998), determinándose como temperatura óptima al valor de máxima velocidad.

ELABORACIÓN DE LA LISTA DE LAS CEPAS DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA

Para la elaboración del listado de las cepas bacterianas con actividad celulolítica y xilanolítica de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz, se resumieron los resultados de las evaluaciones antes descritas y se complementó la información con algunas pruebas bioquímicas: catalasa, urea, rojo de metilo, citrato y amilasa.

Para las evaluaciones cualitativas en placa se calificó como (+) para el caso de presencia de halo de hidrólisis, y (-) en caso de ausencia. Respecto a los resultados cuantitativos de la actividad enzimática se tomó como 5+ el valor más alto de la actividad enzimática ($U.l^{-1}$) y se formaron 5 grupos en el intervalo del valor más bajo y el valor más alto.

La lista se ordenó de acuerdo a los géneros y especies encontrados con la siguiente información:

- Nombre de la especie
- Cepa
- Número de accesión en el Genbank (opcional)
- Hidrólisis de CMC y Xilano de acuerdo al análisis cuantitativo
- Actividad enzimática endoglucanasa/ xilanasas de acuerdo al análisis cualitativo

- Temperatura óptima de crecimiento
- Pruebas bioquímicas

EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA, pH ÓPTIMO Y TERMOESTABILIDAD ENZIMÁTICA

Los extractos crudos de las cepas que mostraron las mayores actividades enzimáticas fueron evaluados para la determinación del pH óptimo, temperatura óptima y estabilidad térmica de las endoglucanasas y xilanasas. Las metodologías de hidrólisis enzimática y de la cuantificación de azúcares reductores se realizaron de acuerdo a las metodologías descritas en la parte de cuantificación de actividad, con ciertas modificaciones en temperatura de incubación y pH del buffer cuando era necesario.

Para la evaluación de la temperatura óptima se prepararon las muestras y sus blancos respectivos a pH 6. La hidrólisis se realizó a 45, 50, 55, 60, 65 y 70°C de temperatura. Luego fueron colocados a 4°C por 20 minutos aproximadamente para que descendiera la temperatura y de esta manera cuantificar los azúcares reductores liberados mediante el método del DNS.

Se determinó el pH óptimo evaluando la actividad enzimática a 3, 4, 5, 6, 7 y 7,8 de pH; para lo cual se prepararon los sustratos: CMC 1% y xilano 1%, en buffer acetato (0,05M) a pH 3, 4 y 5; y buffer fosfato (0,05M) a 6, 7 y 7,8 de pH. Se prepararon muestras de hidrólisis, blanco de muestra y blanco de sustrato a cada pH, la hidrólisis enzimática fue evaluada a 50°C y 2 horas de reacción.

Para evaluar la estabilidad térmica, se agregaron alícuotas de 500 µl de cada muestra (extracto) en microtubos de 1,5ml; así mismo se prepararon blancos de sustrato con 500µl de CMC 1% o Xilano 1% en buffer fosfato a pH 6. Tanto los extractos y los blancos de sustrato fueron sometidos a 60, 70 y 80°C por 1 hora. Concluido el tiempo fueron retirados y colocados de inmediato a 4°C por 20 minutos, para que descendiera la temperatura. A partir de cada extracto tratado térmicamente se prepararon los blancos de muestra y las muestras de hidrólisis. De igual manera los blancos tratados fueron utilizados para preparar el blanco de

sustrato de cada temperatura. Los ensayos de hidrólisis y la cuantificación enzimática siguieron los protocolos antes descritos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante el software SPSS (versión 20.1). Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) por el modelo general lineal. Para encontrar diferencias significativas de las actividades enzimáticas entre las cepas se usó la prueba de Duncan's y para comparar la actividad enzimática entre los extractos enzimáticos de la misma cepa de bacteria se utilizó la prueba T-Student para muestras independientes. Todos los análisis se realizaron con el nivel de significancia de 0,01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DATOS GENERALES DE LAS FUENTES TERMALES MUESTREADAS

La tabla 1, muestra los datos de cada fuente termal tomados durante la recolección de muestra, se indica el código otorgado al lugar de muestreo, el mismo que fue usado para la codificación de las cepas de bacterias aisladas, las coordenadas de ubicación en grados decimales, temperatura y pH obtenidos durante la toma de muestras. Así mismo, la descripción y el mapa de ubicación de las fuentes termales se encuentran en el Anexo 1.

Tabla 1: Ubicación, temperatura y pH de las fuentes termales para el aislamiento de microorganismos celulolíticos

Fuente termal	Cód.	Coordenadas de ubicación	Temperatura (°C)	pH
Chancos	CH	9°19'09.39"S, 77°34'24.59"W	47,3 ± 3,2	6,5 ± 0,2
Olleros	O	9°40'02.69"S, 77°27'48.14"W	44,6 ± 2,1	6,6 ± 0,1
Huancarhuaz	H	8°56'31.86"S, 77°47'00.53"W	70,0 ± 1,0	6,5 ± 0,1

Los valores de temperatura y pH, son promedios de 3 repeticiones ± DS

AISLAMIENTO

En el presente trabajo, el aislamiento no se hizo de manera selectiva, tal como se reporta en otros trabajos (Aygan et al., 2011; Acharya y Chaudhary, 2012, entre otros), porque en los cultivos enriquecidos pueden crecer microorganismos no degradadores de celulosa que podrían cooperar con otros microorganismos celulolíticos, incrementando la capacidad hidrolítica de los cultivos mixtos (Kato et al., 2004), en tal sentido, el aislamiento de éstos podrían ser de utilidad en trabajos futuros.

Con dicha perspectiva, se aislaron un total de 62 cepas a partir de las fuentes termal Chancos, Olleros y Huancarhuaz, aplicando tres metodologías: aislamiento directo a partir de muestra fresca, enriquecimiento *ex situ* y enriquecimiento *in situ* mediante cebos; además en el caso de los enriquecimientos se usaron varios sustratos.

El número de cepas aisladas y el porcentaje respectivo por cada fuente termal y metodología utilizada se presentan en la Tabla 2 en el que se puede observar que el porcentaje de aislamiento por cada tratamiento entre las fuentes termal no sigue el mismo patrón, por lo contrario muestran cierta variación.

Es así que, en la fuente termal Huancarhuaz a diferencia de Olleros y Chancos, no se aislaron muchas bacterias usando muestra fresca, es decir mediante el aislamiento directo. En ese sentido, los resultados y la eficiencia del aislamiento directo puede estar en función de la carga microbiana (Kuvlanov et al. 2009) y que a su vez podría estar en relación a la temperatura de origen, porque la fuente de Huancarhuaz mostró temperaturas de 68-70°C; mientras que las otras dos tuvieron temperaturas de 45-50°C.

En el caso de los enriquecimientos *in situ* por medio de cebos, la fuente termal Olleros presentó un porcentaje pequeño de cepas aisladas (9%), lo cual podría estar en relación con las condiciones del sedimento de la fuente, porque en esta fuente el sedimento fue escaso sobre una superficie rocosa y compacta. Resultados diferentes se encontraron en el enriquecimiento *in situ* mediante cebos en la fuente termal Chancos, probablemente porque éste presentó un sedimento más abundante compuesto de arena que pudo haber entrado en mayor contacto con los cebos dejados.

Respecto a los resultados aplicando enriquecimiento *in situ* y *ex situ*, a excepción de la fuente termal Olleros, se observa que el bagacillo de caña de azúcar fue uno de los sustratos con mayor número de cepas aisladas (Tabla 2 y Fig. 4c), lo cual podría estar relacionado con la capacidad metabólica de los microorganismos para utilizar dicho residuo (Lynd, 2002), o la naturaleza semi-esponjosa del bagacillo pre-tratado permitiría la formación de biopelículas sobre el sustrato.

Por lo tanto, debido a que los porcentajes en el número de cepas aisladas por tratamiento reflejan variabilidad entre las fuentes termales muestreadas, y considerando, que este resultado no sólo estaría relacionado con la habilidad de utilizar los sustratos empleados en el caso de los enriquecimientos, sino que podría depender además de la carga microbiana, temperatura de origen y la naturaleza del sedimento de la fuente, se podría decir, que la elección de la metodología para el aislamiento de los microorganismos a partir de muestras ambientales debe tomar en consideración las variables antes mencionadas para garantizar el mayor número de aislamientos posibles.

Tabla 2: Número y porcentaje de morfo-tipos de las cepas bacterianas aisladas de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz

Método	Sustrato de enriquecimiento	Número (Porcentaje) de cepas aisladas		
		CH	O	H
Directo (D)		8 (26)	4 (36)	2 (11)
Ex situ (E)	Bagacillo de caña de azúcar	6 (19)	1 (9)	6 (32)
	Papel filtro	1 (3)	5 (45)	0 (0)
	Celulosa microgranular	1 (3)	1 (9)	3 (16)
	Xilano de beechwood	1 (3)	0 (0)	3 (16)
In situ (I)	Bagacillo de caña de azúcar	11 (35)	0 (0)	4 (21)
	Papel filtro	2 (6)	1 (9)	1 (5)
	FP + celulosa microgranular	1 (3)	0 (0)	0 (0)
	Xilano de beechwood	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total por fuente		31 (100)	12 (100)	19 (100)

SELECCIÓN CUALITATIVA

La selección cualitativa se realizó con medios de cultivo sólidos con fuente carbonada selectiva: CMC para celulolíticos y xilano para xilanolíticos, utilizando la metodología de tinción con Rojo Congo para evaluar el halo de hidrólisis (Sirisena y Manamendra 1995).

La Tabla 3 muestra el número y porcentaje de cepas aisladas por cada tratamiento, en el que se observa que 29 cepas mostraron halos de hidrólisis en los medios con CMC y xilano, de los cuales catorce corresponden a la fuente termal Chancos, siete a Olleros y ocho a Huancarhuaz. Así mismo, el Anexo 2 muestra los valores de los diámetros de los halos de actividad hidrolítica, donde se puede observar que todas las cepas seleccionadas presentaron mayor actividad endoglucanasa que xilanasa, adicionalmente el Anexo 3 muestra algunas fotografías.

Tabla 3: Número y porcentaje de las cepas seleccionadas de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz, por presentar halos de hidrólisis sobre CMC y/o xilano

Método	Sustrato de enriquecimiento	Número (Porcentaje) de cepas seleccionadas		
		CH	O	H
Directo (D)		5 (36)	3 (43)	0 (0)
Ex situ (E)	Bagacillo de caña de azúcar	0 (0)	0 (0)	4 (50)
	Papel filtro	0 (0)	2 (29)	0 (0)
	Celulosa microgranular	1 (7)	1 (14)	2 (25)
	Xilano de beechwood	0 (0)	0 (0)	0 (0)
In situ (I)	Bagacillo de caña de azúcar	7 (50)	0 (0)	2 (25)
	Papel filtro	1 (7)	1 (14)	0 (0)
	FP + celulosa microgranular	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Xilano de beechwood	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total por fuente		14 (100)	7 (100)	8 (100)

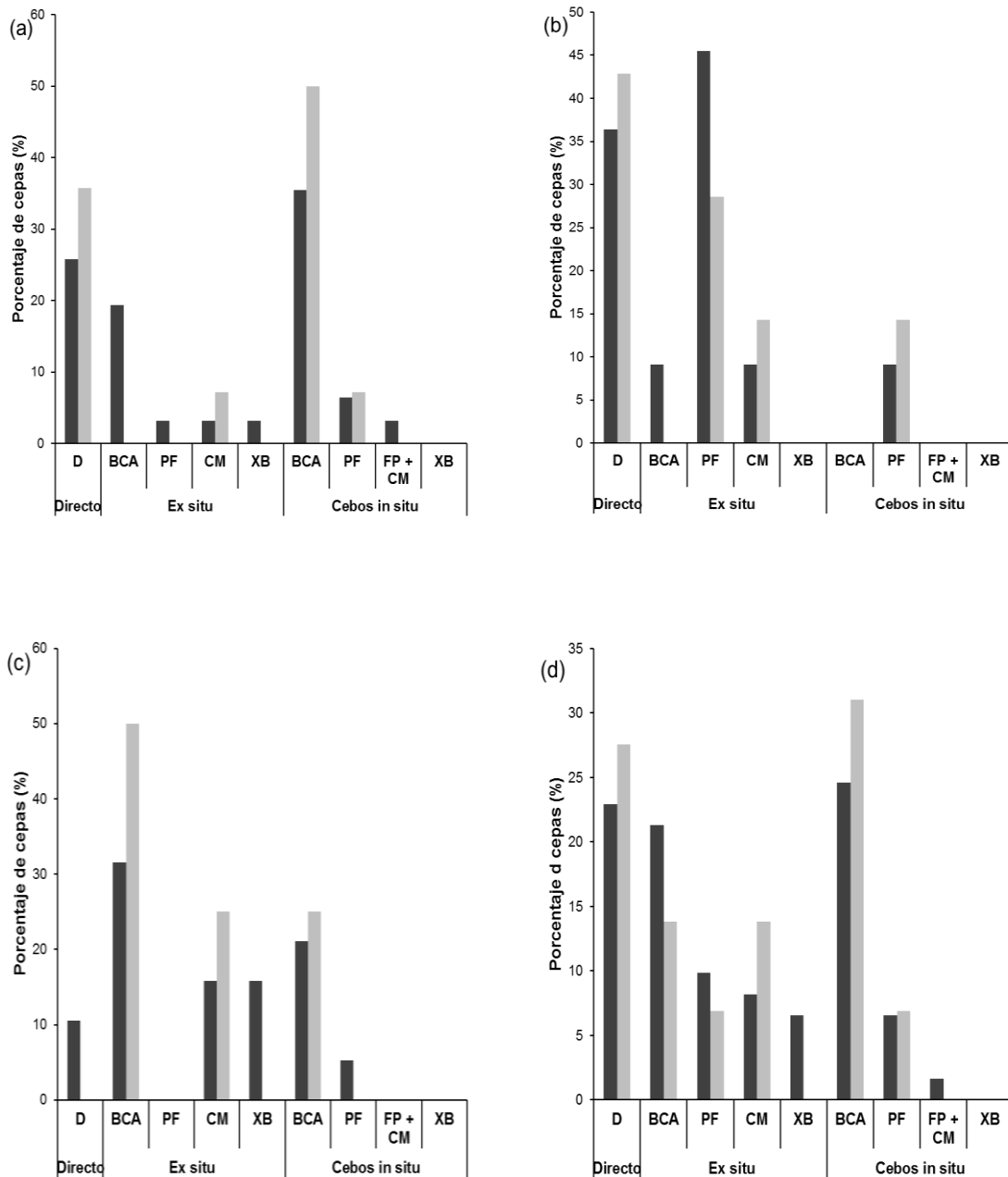


Figura 4: Comparación entre el porcentaje de cepas aisladas y seleccionadas cualitativamente

(a) Fuente termal Chancos; (b) Fuente termal Olleros; (c) Fuente termal Huancarhuaz y (d) Resumen de todas las Fuentes. El porcentaje de las cepas aisladas se encuentra en barras oscuras y el de seleccionadas en barras claras. BCA, bagacillo de caña de azúcar; PF, papel filtro; CM, Celulosa microgranular; XB, xilano de birchwood.

Haciendo una comparación entre el porcentaje de cepas aisladas y seleccionadas se puede observar que el mayor número de las cepas seleccionadas de las fuentes Chancos y Huancarhuaz provienen de los enriquecimientos con bagacillo de caña de azúcar con cebos *in situ* y con ambos enriquecidos, respectivamente (Fig. 4a y 4c). Estos resultados, podrían deberse a la composición y forma de los azúcares del bagacillo que favorecerían el crecimiento de cepas productoras de enzimas lignocelulolíticas, tal como se indica para el caso de comunidades microbianas productoras de celulasas y xilanasas (Ajjolakewu et al., 2013). Del mismo modo este sustrato ha sido reportado como buen sustrato para producción de celulasas y/o xilanasas en bio-procesos fermentativos (Adsul et al. 2004, Cammassola y Dillon, 2007; Song y Weid, 2010).

Por otro lado, la Fig. 4b muestra que las cepas seleccionadas en la fuente termal de Olleros en mayor porcentaje corresponden a los enriquecidos con papel filtro. Estos resultados concuerdan con los reportados por Wang et al. (2012), quienes hicieron enriquecimientos de comunidades microbianas *ex situ* con tiras de papel filtro encontrando la degradación casi completa del papel filtro en 6 semanas con evidente actividad xilanasa y celulasa.

Finalmente la Tabla 4 muestra los códigos de las cepas de bacterias seleccionadas, las cuales fueron identificadas genéticamente y evaluadas cuantitativamente en sus actividades celulolíticas y xilanolíticas.

Tabla 4: Código de las cepas que presentaron halos de hidrólisis sobre CMC y xilano de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancahuaz, que fueron seleccionadas por presentar halo de hidrólisis de CMC y/o xilano

Método	Sustrato de enriquecimiento	Cepas seleccionadas		
		CH	O	H
Directo (D)		DCH1, DCH2, DCH3, DCH4, DCH5	DOA1, DOA2, DOA6	-
	Bagacillo de caña de azúcar	-	-	EHB1, EHB2, EHB3, EHB4
Ex situ (E)	Papel filtro	-	EOP2, EOP3	-
	Celulosas microgranular	ECHC4	EOC1	EHC2, EHC3
	Xilano de beechwood	-	-	-
In situ (I)	Bagacillo de caña de azúcar	ICHB1, ICHB6, ICHB7, ICHB4, ICHB5, ICHB2, ICHB3	-	IHB1, IHB2
	Papel filtro	ICHP1	-	-
	FP + celulosa microgranular	-	IOPC2	-
	Xilano de beechwood	-	-	-

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS MEDIANTE 16S rDNA

En primer lugar se realizaron observaciones microscópicas de las cepas seleccionadas, donde se encontró que todos eran bacillos Gram-positivos y formadores de endosporas, el Anexo 4 muestra algunas de las microfotografías. Luego se realizó la identificación taxonómica mediante la técnica molecular 16S.

De acuerdo a la electroforesis de los productos del PCR (Anexo 5), los fragmentos amplificados concuerdan con el tamaño del gen 16S rDNA (Woese, 1987). Todas las secuencias ensambladas fueron editadas a un tamaño de 1537 bp que corresponde al rango del tamaño completo del gen 16S. En el análisis BlastN se obtuvo porcentajes de identidad entre 99-100% con algunas cepas del GenBank. El análisis de alineamiento múltiple y filogenético muestra que la especie predominante en las tres fuentes termales fue *B. licheniformis*, seguido de *B. subtilis* que sólo fue aislado de las fuentes Chancos y Olleros; además se aisló y seleccionó una cepa de *Cohnella laeviribosi* en la fuente termal de Huancarhuaz. (Fig. 5, 6 y 7).

Estos resultados concuerdan con los estudios y aislamientos de microorganismos de fuentes termales a nivel mundial, donde se han encontrado diversas especies del género *Bacillus* como componentes de la microflora de estos hábitats (Pakpitcharoena, et al. 2008; Acharya y Chaudhary, 2012; Ibrahim et al., 2013; Suthar et al., 2009; entre otros), además estas cepas son muy importantes para propósitos industriales (Nogi et al. 2005; Metha y Satyanaryana, 2013).

En este sentido, diversas cepas de *B. licheniformis*, han sido aisladas de fuentes termales, y han mostrado interesantes habilidades en la producción de enzimas hidrolíticas, biosurfactantes y otros productos de uso industrial. Por ejemplo, Kamble y Jadhav (2011), Lee et al. (2008), Dereкова et al. (2008), Acharya et al. (2012), Pakpitcharoena et al. (2008) reportan cepas de *B. licheniformis* con actividad celulítica y/o xilanolítica. Ibrahim et al. (2013) reportan el aislamiento de *B. licheniformis* BT5.9 con la capacidad de producir altas cantidades de amilasas, Suthar et al. (2009) y Pakpitcharoena et al. (2008) indican que *B. licheniformis* TT33 y *B. licheniformis* CM8.2 respectivamente, poseen buena capacidad de producción de biosurfactante.

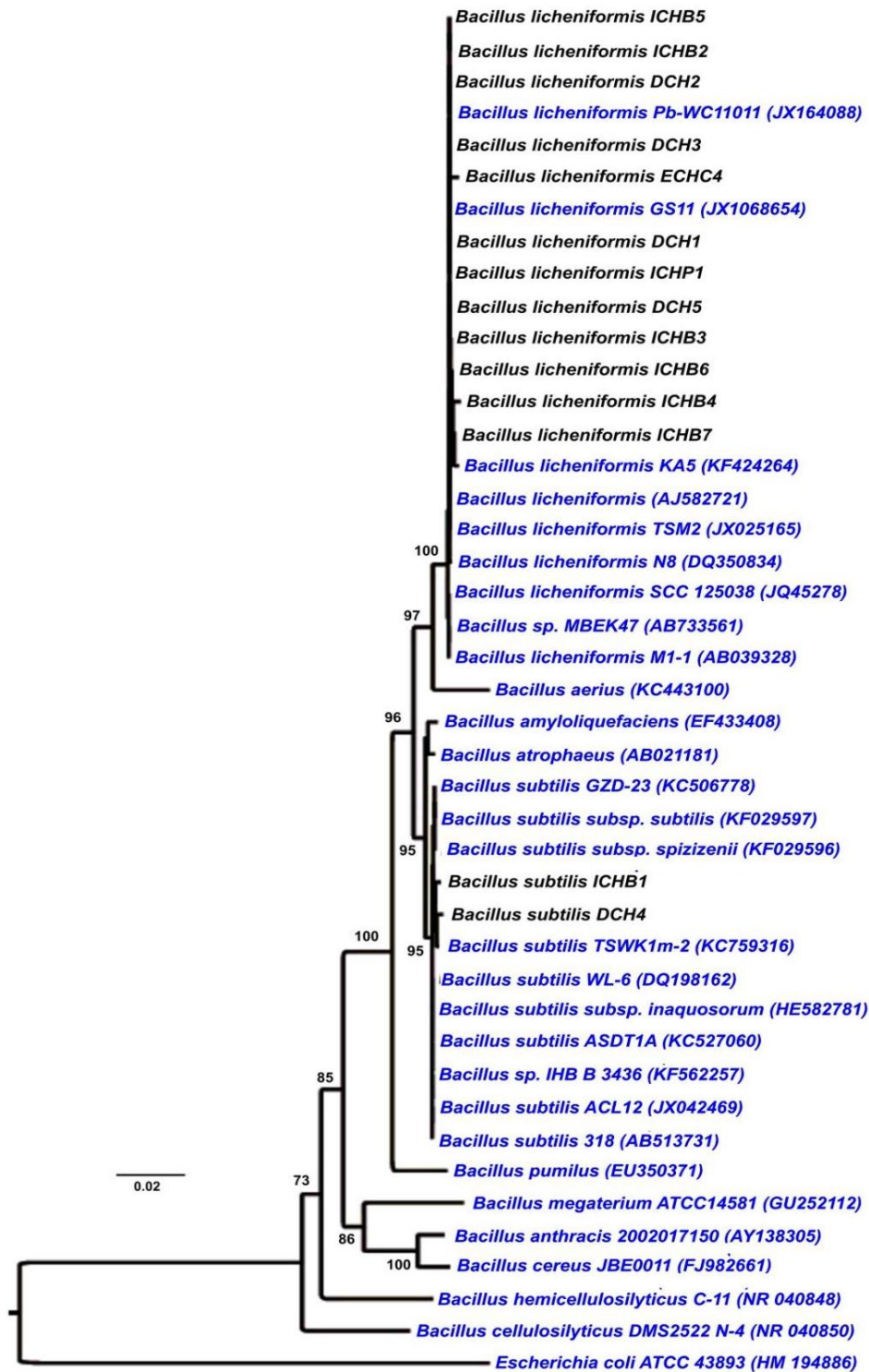


Figura 5: Análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas seleccionadas de fuente termal de Chancos: DCH1, DCH2, DCH3, DCH4, DCH5, ICHB1, ICHB2, ICHB3, ICHB4, ICHB5, ICHB6, ICHB7, ICHP1, ECHC4 y especies relacionadas obtenidas en el NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El árbol filogenético ha usado el método Neighbour-joining con 1000 bootstraps. *Escherichia coli* ATCC43893 ha sido empleada como grupo externo. La barra representa 2 substituciones por 100 posiciones de nucleótidos

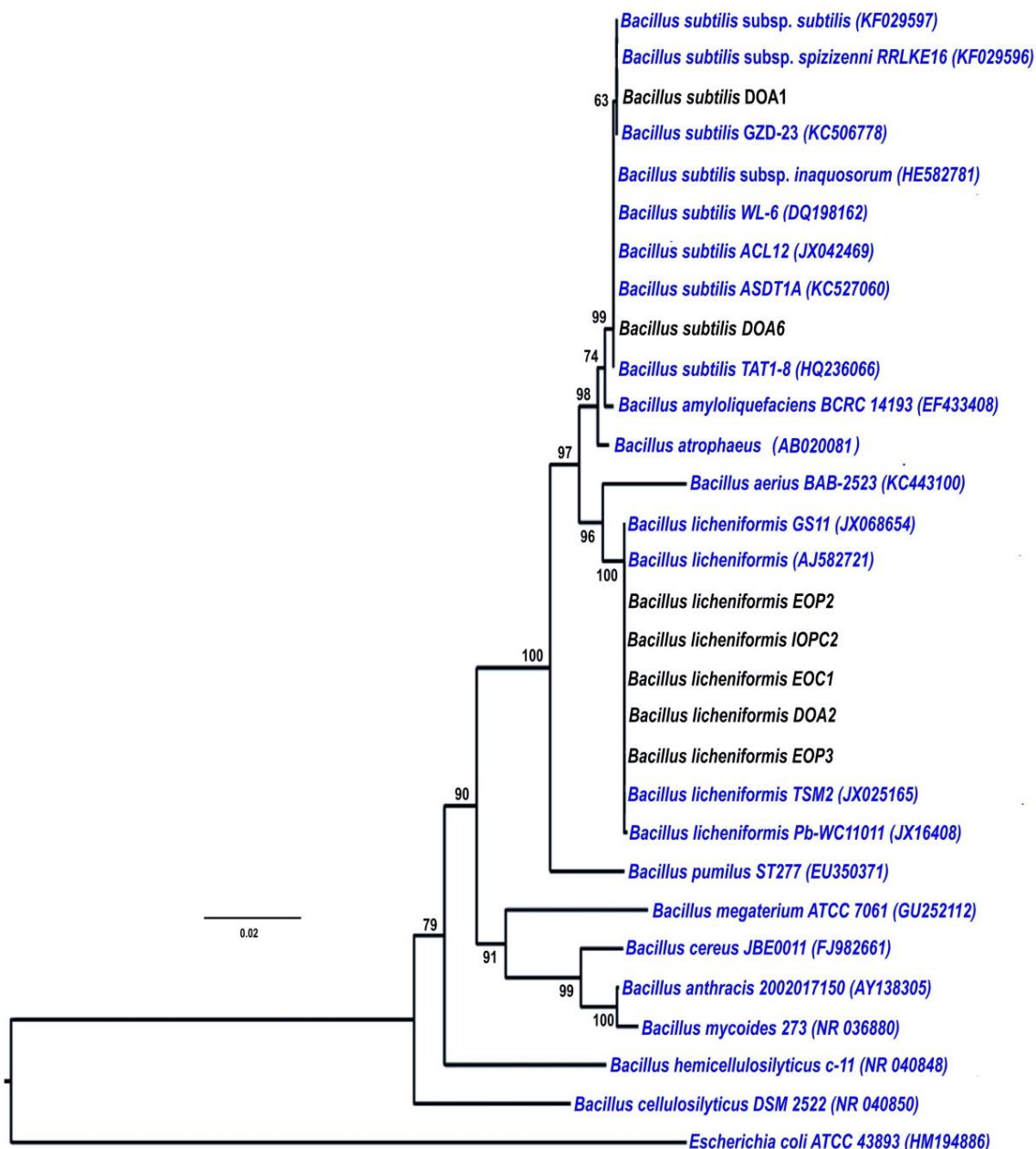


Figura 6: Análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas seleccionadas por mostrar actividad hidrolítica sobre CMC y/o Xilano de la fuente termal Olleros: DO1, DO2, DO6, EOP2, EOP3, EOC1, IOPC2, y especies relacionadas obtenidas en el NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El árbol filogenético ha usado el método Neighbour-joining con 1000 bootstraps. *Escherichia coli* ATCC43893 ha sido empleada como grupo externo. La barra representa 2 sustituciones por 100 posiciones de nucleótidos.

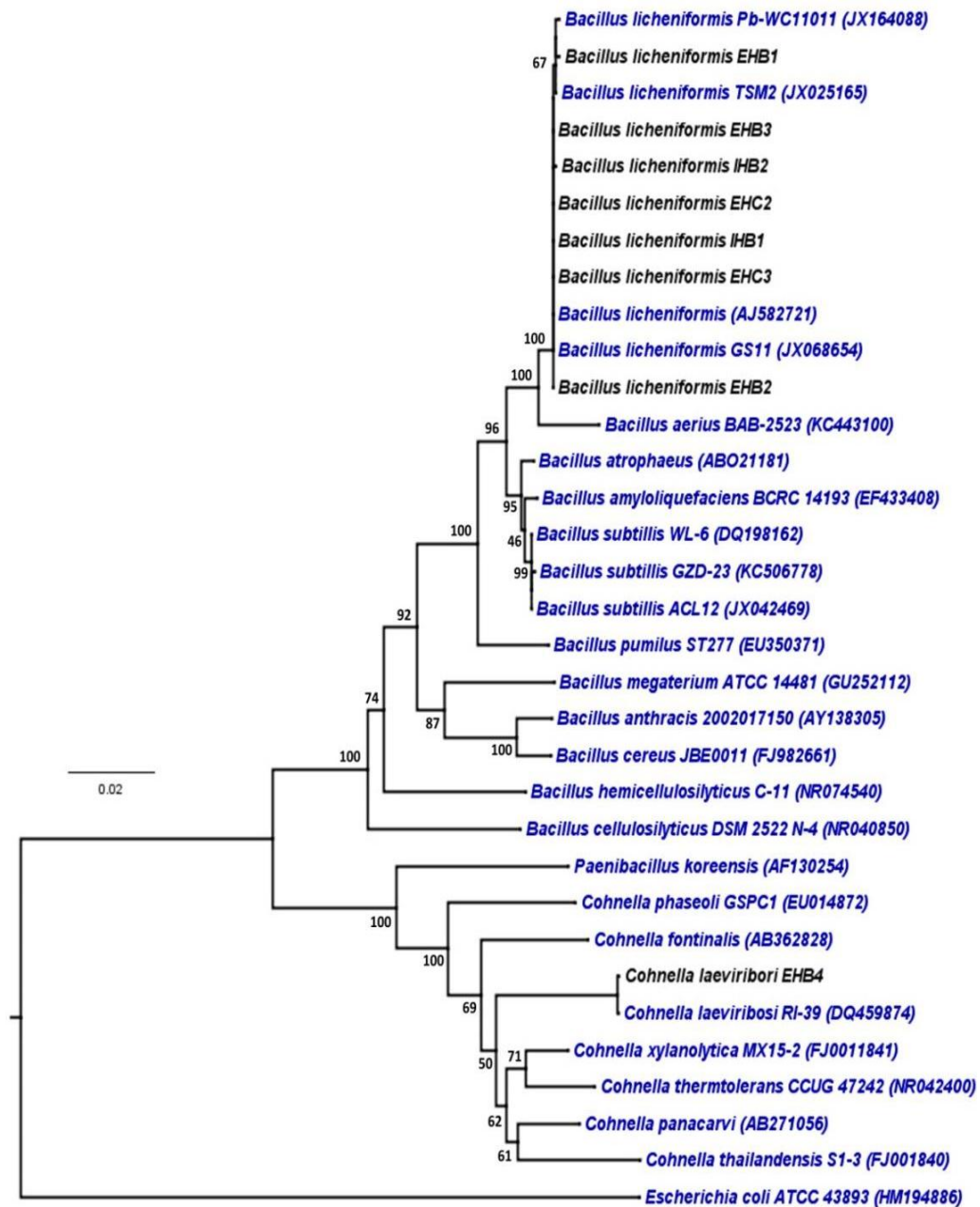


Figura 7: Análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas seleccionadas por mostrar actividad hidrolítica sobre CMC y/o Xilano de la fuente termal Huancarhuaz: EHB1, EHB2, EHB3, EHB4, EHC2, EHC3, IHB1, IHB2, y especies relacionadas obtenidas en el NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El árbol filogenético ha usado el método Neighbour-joining con 1000 bootstraps. *Escherichia coli* ATCC43893 ha sido empleada como grupo externo. La barra representa 2 substituciones por 100 posiciones de nucleótidos.

Del mismo modo, *B. subtilis* es un microorganismo ampliamente distribuido en suelos y aguas (Ayyachamy y Vatsala, 2007; H.-B. Lee et al. 2010; Rawat y Tewari, 2012). Ha sido encontrado y aislado de diversas fuentes termales, habiendo demostrado ser productor importante de enzimas y biomoléculas para la industria, medicina y bioremediación (Sá-Pereira, 2002; Baysal et al., 2003; Salem et al., 2010; Asoodeh y Lagzian, 2012; Pillai y Archana, 2012; Emtenani et al., 2013).

Finalmente, la especie *Cohnella laeviribosi* fue definida como nueva especie el 2007, la cepa descrita fue aislada de una fuente termal en una área volcánica de Indonesia, y es considerada como una bacteria formadora de endospora, termófila moderada (Cho et al., 2007a) y presenta actividad D-Lisosa (L-ribosa) isomerasa (Cho et al., 2007b).

CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA

La cuantificación de la capacidad hidrolítica se realizó midiendo la actividad enzimática de los extractos extracelulares crudos de los microorganismos cultivados en Caldo Luria (LB) suplementado con carboximetil celulosa (LB-CMC) o xilano de beechwod (LB-X). Ambos extractos libres de células fueron evaluados para cuantificar la actividad endoglucanasa (CMCasa), celulasa total (PFasa) y xilanasa, mediante la metodología del DNS para microplaca (King et al. 2009).

Los valores de la actividad enzimática, productividad enzimática y la actividad enzimática específica de los extractos LB-X y LB-CMC de las cepas de Chancos se muestran en las Tablas 5 y 6, las Tablas 7 y 8 corresponde a las cepas de Olleros, las Tablas 9 y 10 a la fuente termal de Huancarhuaz. Los resultados obtenidos fueron sometidos a los análisis estadísticos ANOVA y Duncan's con un nivel de significancia de 0,01 (Anexo 12), los cuales permitieron establecer diferencias significativas entre ellos y agruparlos de acuerdo a los valores obtenidos.

Los resultados muestran que los extractos LB-CMC y LB-X de todas las cepas seleccionadas cualitativamente poseen actividad xilanolítica; mientras que la

actividad endoglucanasa no fue evidente en algunas cepas de *B. licheniformis* de las fuentes termales de Chancos y Olleros (Tablas 5-10).

Por otro lado, la actividad celulasa total evaluada mediante la metodología de la hidrólisis del papel filtro fue muy baja en todas las cepas, resultados similares han sido reportados en otras especies de *Bacillus* (van Dick et al. 2009; Rastori et al., 2010). Sin embargo, se puede rescatar que *B. subtilis* DCH4 mostró la mayor actividad celulasa total en el extracto LB-CMC de $108 \pm 14 \text{ U.l}^{-1}$; mientras que la productividad volumétrica y actividad específica fueron de $5,4 \pm 0,7 \text{ U.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; $2862 \pm 371 \text{ U.l}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente.

Haciendo la comparación de la actividad enzimática celulolítica ó xilanolítica obtenidas en los extractos LB-X y LB-CMC mediante la prueba T para muestras independientes a un nivel de confianza de 99%, se observa que en la mayoría de los casos la actividad depende del sustrato carbonado del medio de cultivo (Figuras 8, 9 y 10). Así mismo, en la mayoría de los casos, la actividad endoglucanasa es mayor en el medio LB-Xilano, lo cual podría tener cierta relación con los resultados en algunas especies de *Bacillus* que mostraron mayor actividad endoglucanasa en cultivos con residuos agroindustriales en comparación que cuando fueron cultivados con CMC (Acharya y Chaudhary, 2012).

Por otro lado, la producción enzimática es influenciada por factores nutricionales y ambientales de cultivo (Acharya y Chaudhary, 2012), diversos trabajos de optimización de medios de producción de xilanasas y celulasas consideran que la fuente nitrógenada es un factor de importancia en la producción enzimática. En ese sentido, Sepahy et al. (2011) encontraron mayor producción de xilanasas en especies de *Bacillus* cuando usaron nitrógeno orgánico, e indican que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ podría causar inhibición del sistema de excreción o síntesis de xilanasas. Este efecto podría explicar los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa y cuantitativa de xilanasas del presente trabajo, donde el medio de cultivo utilizado en la evaluación cualitativa fue preparado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como principal fuente nitrogenada, habiéndose obtenido halos de hidrólisis muy pequeños en las placas de cultivo con xilano (Anexo 02). Sin embargo, el medio de cultivo para los ensayos cuantitativos utilizó triptona (10 g/l) y extracto de

levadura (5 g/l), observándose una evidente producción de xilanasas detectada por el método cuantitativo del DNS (Fig. 8-10).

Una relación inversa se encontró en la actividad celulolítica, donde la actividad endoglucanasa presentó halos de hidrólisis evidentes en las placas de cultivo con CMC y nitrógeno inorgánico (Anexo 02 y Fig. 24) y baja actividad endoglucanasa en el caldo LB que contiene fuente nitrogenada orgánica. Estos resultados, podrían estar en relación con los obtenidos por Bano et al. (2013), quienes encontraron mayor producción de endoglucanasas de *B. subtilis* usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fuente nitrogenada inorgánica.

Finalmente, de acuerdo a los análisis estadísticos las cepas con mejor actividad enzimática, productividad volumétrica y actividad específica para la actividad celulolítica y xilanolítica fueron *B. subtilis* DHC4 (Chancos), *B. subtilis* DO6 (Olleros), y *Cohnella laevirosi* EHB4 (Huancarhuaz). El ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de 1% ($p=0,01$) y según los resultados del análisis Duncan's aplicado a un nivel de confianza de 1% ($p=0,01$) la cepa *B. subtilis* DHC4 ocupa el primer lugar seguido de *B. subtilis* DO6 y *C. laevirosi* EHB4; con actividades endoglucanasas de 1252 ± 142 , 676 ± 5 , 393 ± 14 ; y xilanasas de 2396 ± 133 , 1677 ± 65 , y 652 ± 14 U.l⁻¹, respectivamente (Anexo12.13).

Tabla 5: Actividad enzimática, Productividad volumétrica y Actividad específica endoglucanasa y xilanasas de los extractos crudos en LB-Xilano de las cepas seleccionadas de la Fuente Termal Chancos

Cepa	Actividad endoglucanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica endoglucanasa (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica endoglucanasa (U.g ⁻¹ de proteína)	Actividad Enzimática Xilanasas (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica xilanasas (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica xilanasas (U.g ⁻¹ de proteína)
<i>B. licheniformis</i> DCH1	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	489 ± 5 ^c	24,5 ± 0,2 ^c	16130 ± 161 ^{d,e,f}
<i>B. licheniformis</i> DCH2	160 ± 10 ^c	8,0 ± 0,5 ^c	4039 ± 247 ^c	508 ± 4 ^c	25,4 ± 0,1 ^c	12812 ± 64 ^g
<i>B. licheniformis</i> DCH3	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	488 ± 15 ^c	24,4 ± 0,8 ^c	17101 ± 539 ^{c,d,e}
<i>B. subtilis</i> DCH4	1252 ± 142 ^a	62,6 ± 7,1 ^a	28051 ± 3176 ^a	2168 ± 111 ^a	108,4 ± 5,5 ^a	48569 ± 2485 ^a
<i>B. licheniformis</i> DCH5	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	494 ± 18 ^c	24,7 ± 0,9 ^c	15061 ± 556 ^{e,f,g}
<i>B. licheniformis</i> ECHC4	161 ± 4 ^c	8,0 ± 0,2 ^c	5720 ± 152 ^c	501 ± 6 ^c	25,0 ± 0,3 ^c	17808 ± 231 ^{c,d}
<i>B. subtilis</i> ICHB1	572 ± 93 ^b	28,6 ± 4,7 ^b	16566 ± 2699 ^b	1381 ± 147 ^b	69,1 ± 7,4 ^b	40008 ± 4267 ^b
<i>B. licheniformis</i> ICHB2	157 ± 4 ^c	7,9 ± 0,2 ^c	4747 ± 117 ^c	483 ± 4 ^c	24,1 ± 0,2 ^c	14584 ± 122 ^{f,g}
<i>B. licheniformis</i> ICHB3	174 ± 11 ^c	8,7 ± 0,6 ^c	4757 ± 314 ^c	518 ± 12 ^c	25,9 ± 0,6 ^c	14166 ± 318 ^{f,g}
<i>B. licheniformis</i> ICHB4	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	530 ± 11 ^c	26,5 ± 0,5 ^c	14182 ± 292 ^{f,g}
<i>B. licheniformis</i> ICHB5	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	491 ± 20 ^c	24,6 ± 1,0 ^c	14689 ± 584 ^{f,g}
<i>B. licheniformis</i> ICHB6	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	498 ± 5 ^c	24,9 ± 0,3 ^c	18557 ± 190 ^c
<i>B. licheniformis</i> ICHB7	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	518 ± 37 ^c	25,9 ± 1,9 ^c	15478 ± 1118 ^{e,f}
<i>B. licheniformis</i> ICHP1	0 ^d ± 0	0,0 ^d ± 0	0 ^d ± 0	497 ± 3 ^c	24,9 ± 0,2 ^c	16443 ± 108 ^{c,d,e,f}

Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ($p < 0,01$)

Tabla 6: Actividad enzimática, Productividad volumétrica y Actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-CMC de las cepas seleccionadas de la Fuente Termal Chancos

Cepa	Actividad endoglucanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica endoglucanasa (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica endoglucanasa (U.g ⁻¹ de proteína)	Actividad Enzimática Xilanasas (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica xilanasas (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica xilanasas (U.g ⁻¹ de proteína)
<i>B. licheniformis</i> DCH1	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	584±8 ^{c,d,e}	29,2±0,4 ^{c,d,e}	18036±242 ^{d,e,f}
<i>B. licheniformis</i> DCH2	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	640±33 ^c	32,0±1,7 ^c	19273±993 ^d
<i>B. licheniformis</i> DCH3	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	579±12 ^{c,d,e}	29,0±0,6 ^{c,d,e}	18089±388 ^{d,e,f}
<i>B. subtilis</i> DCH4	1094±46 ^a	54,7±2,3 ^a	29053±1222 ^a	2396±133 ^a	119,8±6,7 ^a	63651±3535 ^a
<i>B. licheniformis</i> DCH5	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	537±41 ^e	26,8±2,0 ^e	16233±1239 ^{e,g}
<i>B. licheniformis</i> ECHC4	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	539±18 ^e	26,9±0,9 ^e	16093±543 ^{e,g}
<i>B. subtilis</i> ICHB1	363±20 ^b	18,1±1,0 ^b	12577±704 ^b	958±14 ^b	47,9±0,7 ^b	33206±486 ^b
<i>B. licheniformis</i> ICHB2	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	552±15 ^{d,e}	27,6±0,7 ^{d,e}	22023±586 ^c
<i>B. licheniformis</i> ICHB3	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	622±55 ^{c,d}	31,1±2,8 ^{c,d}	18668±1657 ^{d,e}
<i>B. licheniformis</i> ICHB4	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	608±23 ^{c,d,e}	30,4±1,2 ^{c,d,e}	16563±629 ^{e,f,g}
<i>B. licheniformis</i> ICHB5	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	560±45 ^{c,d,e}	28,0±2,2 ^{c,d,e}	15482±1238 ^g
<i>B. licheniformis</i> ICHB6	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	560±40 ^{c,d,e}	28,0±2,0 ^{c,d,e}	19524±1408 ^d
<i>B. licheniformis</i> ICHB7	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	602±38 ^{c,d,e}	30,1±1,9 ^{c,d,e}	17920±1119 ^{d,e,f}
<i>B. licheniformis</i> ICHP1	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	562±19 ^{c,d,e}	28,1±1,0 ^{c,d,e}	19219±660 ^d

Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ($p < 0,01$)

Tabla 7: Actividad enzimática, Productividad volumétrica y Actividad específica endoglucanasa y xilanasa de extractos crudos en LB-Xilano de las cepas seleccionadas de la Fuente Termal Olleros

Cepa	Actividad endoglucanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica endogluc. (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica endoglucanasa (U.g ⁻¹ de proteína)	Actividad Enzimática Xilanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica xilanasa (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica xilanasa (U.g ⁻¹ de proteína)
<i>B. subtilis</i> DO1	206± 25 ^b	10,3±1,3 ^b	54491± 671 ^b	602± 58 ^b	30,1±2,9 ^b	15888±1521 ^b
<i>B. licheniformis</i> DO2	154± 2 ^d	7,7 ±0,1 ^d	4271± 49 ^c	538± 5 ^{b,c}	26,9±0,3 ^{b,c}	14970±1 50 ^{b,c}
<i>B. subtilis</i> DO6	676 ±5 ^a	33,8 ±0,3 ^a	18502± 146 ^a	883 ±88 ^a	44,2 ±4,4 ^a	24172±2407 ^a
<i>B. licheniformis</i> EOC1	0 ^e ± 0	0,0 ^e ± 0	0 ^d ± 0	522± 12 ^{b,c}	26,1 ±0,6 ^{b,c}	13847±313 ^{b,c}
<i>B. licheniformis</i> EOP2	180 ±16 ^c	9,0 ±0,8 ^c	5116± 459 ^b	496± 13 ^c	24,6 ±0,6 ^b	14069±364 ^{b,c}
<i>B. licheniformis</i> EOP3	0 ^e ± 0	0,0 ^e ± 0	0 ^d ± 0	547± 22 ^{b,c}	27,4 ±1,1 ^{b,c}	15939±655 ^b
<i>B. licheniformis</i> IOPC2	0 ^e ± 0	0,0 ^e ± 0	0 ^d ± 0	590± 77 ^b	29,5 ±3,8 ^b	13528±1761 ^c

Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ($p<0,01$)

Tabla 8: Actividad enzimática, Productividad volumétrica y Actividad específica endoglucanasa y xilanasa de extractos crudos en LB-CMC de las cepas seleccionadas de la Fuente Termal Olleros

Cepa	Actividad endoglucanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica endogluc. (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica endoglucanasa (U.g ⁻¹ de proteína)	Actividad Enzimática Xilanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica xilanasa (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica xilanasa (U.g ⁻¹ de proteína)
<i>B. subtilis</i> DO1	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	646±23 ^b	32,3± 1,1 ^b	18496±656 ^c
<i>B. licheniformis</i> DO2	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	542±16 ^c	27,1 ± 0,8 ^c	15229±436 ^{d,e}
<i>B. subtilis</i> DO6	411±26 ^a	20,6±1,3 ^a	12084±752 ^a	1677±65 ^a	83,9± 3,2 ^a	49294±1896 ^a
<i>B. licheniformis</i> EOC1	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	538±33 ^c	26,9±1,7 ^c	15011±1540 ^e
<i>B. licheniformis</i> EOP2	204±2 ^b	10,2±0,1 ^b	6190±68 ^b	559±29 ^c	27,9±1,4 ^c	16966±877 ^{c,d}
<i>B. licheniformis</i> EOP3	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	536±15 ^c	26,8±0,8 ^c	23980±683 ^b
<i>B. licheniformis</i> IOPC2	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0	0 ^c ± 0	594±37 ^{b,c}	29,7±1,8 ^{b,c}	17945±1103 ^c

Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ($p<0,01$)

Tabla 9: Actividad enzimática, Productividad volumétrica y Actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-Xilano de las cepas seleccionadas de la Fuente Termal Huancarhuaz

Cepa	Actividad endoglucanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica endogluc. (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica endoglucanasa (U.g ⁻¹ de proteína)	Actividad Enzimática Xilanasas (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica xilanasas (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica xilanasas (U.g ⁻¹ de proteína)
<i>B. licheniformis</i> EHB1	238 ^b ± 8	11,9 ^b ± 0,4	4040 ^b ± 132	476 ^d ± 7	23,8 ^d ± 0,3	8065 ^e ± 116
<i>B. licheniformis</i> EHB2	185 ^c ± 9	9,2 ^c ± 0,4	3030 ^c ± 147	507 ^{b,c} ± 15	25,4 ^c ± 0,7	8316 ^e ± 239
<i>B. licheniformis</i> EHB3	0 ^e ± 0	0,0 ^e ± 0	0 ^d ± 0	489 ^{b,c,d} ± 28	24,5 ^{c,d} ± 1,4	9784 ^c ± 554
<i>C. laeviribosi</i> EHB4	393 ^a ± 14	19,6 ^a ± 0,7	8921 ^a ± 323	652 ^a ± 14	32,6 ^a ± 1,0	14814 ^a ± 455
<i>B. licheniformis</i> EHC2	167 ^d ± 13	8,3 ^d ± 0,6	4067 ^b ± 312	443 ^e ± 14	22,2 ^e ± 0,7	10813 ^b ± 334
<i>B. licheniformis</i> EHC3	172 ^{c,d} ± 10	8,6 ^{c,d} ± 0,5	3369 ^c ± 199	479 ^{c,d} ± 21	24,0 ^{c,d} ± 1,1	9394 ^{c,d} ± 411
<i>B. licheniformis</i> IHB1	225 ^b ± 19	11,2 ^b ± 0,9	4160 ^b ± 343	501 ^{b,c,d} ± 9	25,1 ^{c,d} ± 0,5	9280 ^{c,b} ± 169
<i>B. licheniformis</i> IHB2	0 ^e ± 0	0,0 ^e ± 0	0 ^d ± 0	517 ^b ± 17	25,8 ^b ± 0,8	8908 ^d ± 285

Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ($p < 0,01$)

Tabla 10: Actividad enzimática, Productividad volumétrica y Actividad específica endoglucanasa y xilanasas de extractos crudos en LB-CMC de las cepas seleccionadas de la Fuente Termal Huancarhuaz

Cepa	Actividad endoglucanasa (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica endogluc. (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica endoglucanasa (U.g ⁻¹ de proteína)	Actividad Enzimática Xilanasas (U.l ⁻¹)	Productividad volumétrica xilanasas (U.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Actividad específica xilanasas (U.g ⁻¹ de proteína)
<i>B. licheniformis</i> EHB1	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0,0	0 ^c ± 0	573 ^{abc} ± 14	28,7 ^{abc} ± 0,7	28670 ^b ± 681
<i>B. licheniformis</i> EHB2	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0,0	0 ^c ± 0	557 ^c ± 10	27,9 ^c ± 0,5	20648 ^d ± 357
<i>B. licheniformis</i> EHB3	170,4 ^b ± 10,2	8,5 ^b ± 0,5	7098 ^d ± 423	599 ^{ab} ± 22	29,9 ^{ab} ± 1,1	24945 ^c ± 904
<i>C. laeviribosi</i> EHB4	167,2 ^b ± 8,1	8,4 ^b ± 0,4	3894 ^b ± 188	600 ^{ab} ± 43	30,0 ^{ab} ± 2,2	13956 ^g ± 1006
<i>B. licheniformis</i> EHC2	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0,0	0 ^c ± 0	575 ^{abc} ± 19	28,7 ^{abc} ± 0,9	44218 ^a ± 1428
<i>B. licheniformis</i> EHC3	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0,0	0 ^c ± 0	549 ^c ± 25	27,5 ^c ± 1,3	18306 ^e ± 843
<i>B. licheniformis</i> IHB1	0 ^c ± 0	0,0 ^c ± 0,0	0 ^c ± 0	562 ^{bc} ± 19	28,1 ^{bc} ± 0,9	19386 ^{d,e} ± 655
<i>B. licheniformis</i> IHB2	194,2 ^a ± 5,1	9,7 ^a ± 0,3	5112 ^a ± 134	608 ^a ± 21	30,4 ^a ± 1,1	15993 ^f ± 561

Los valores son las medias de seis replicas ± DS. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ($p < 0,01$)

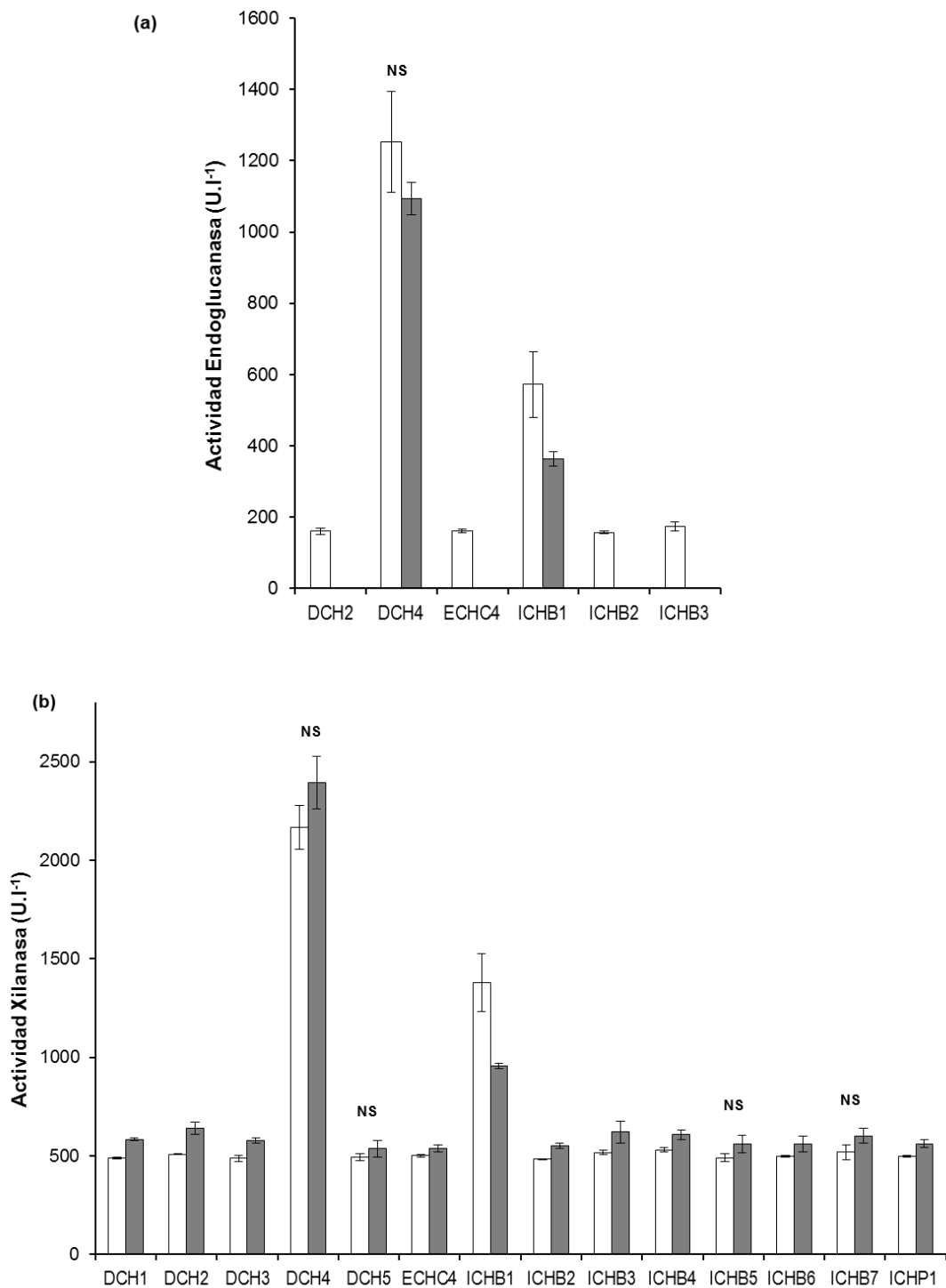


Figura 8: Comparación de la actividad endoglucanasa y xilanasas de las cepas seleccionadas de Chancos en los medios LB-X y LB-CMC

a) Actividad endoglucanasa y b) actividad xilanasas. Medio de cultivo LB-xilano en barras blancas y LB-CMC en barras oscuras. NS, no hay diferencias significativas en la prueba T-student al 99% de confianza. Los valores son promedios de seis replicas \pm SD.

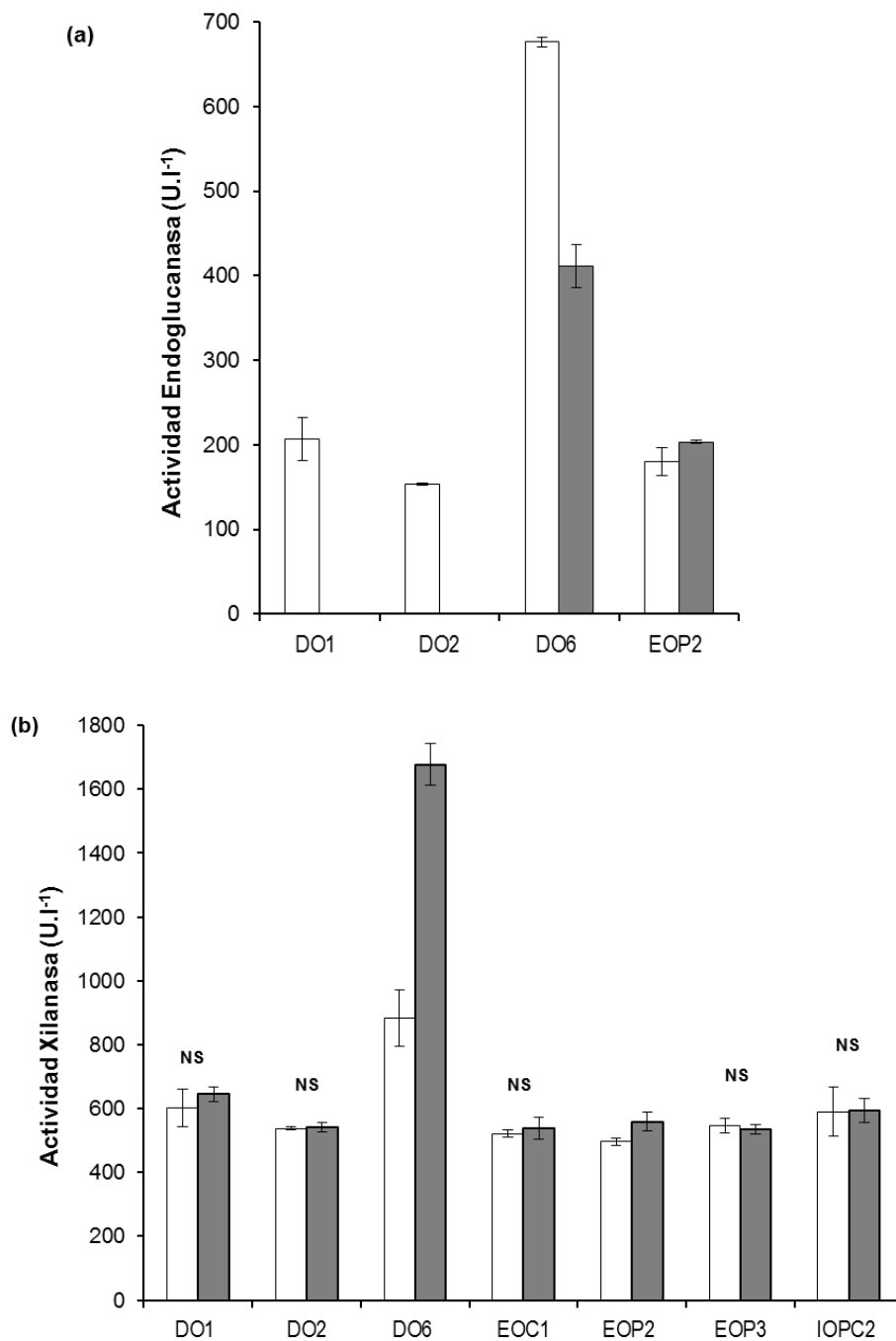


Figura 9: Comparación de la actividad endoglucanasa y xilanasa de las cepas seleccionadas de Olleros en los medios LB-X y LB-CMC

a) Actividad endoglucanasa y b) actividad xilanasa. Medio de cultivo LB-xilano en barras blancas y LB-CMC en barras oscuras. NS, no hay diferencias significativas en la prueba T-student al 99% de confianza. Los valores son promedios de seis replicas \pm SD.

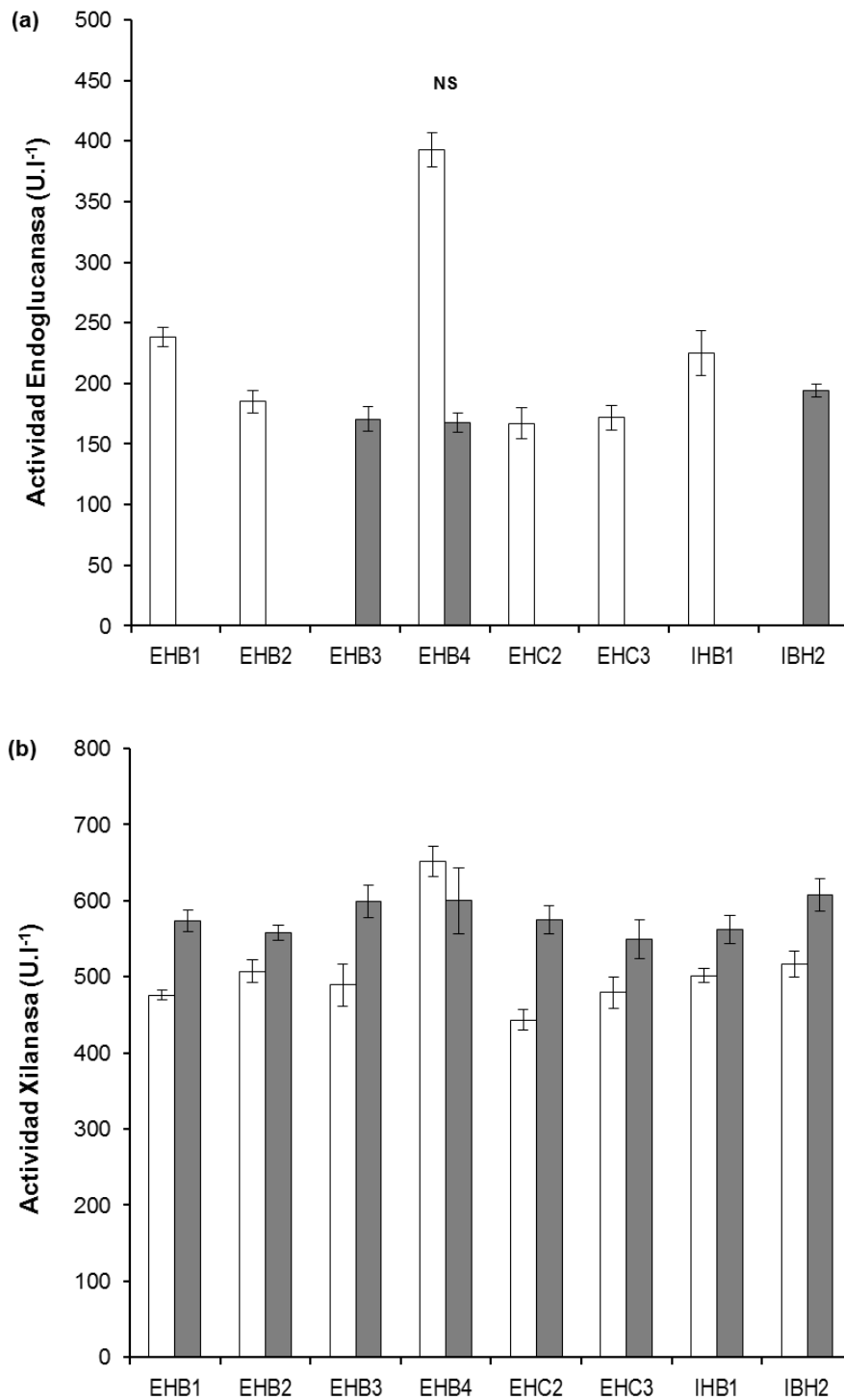


Figura 10: Comparación de la actividad endoglucanasa y xilanasas de las cepas seleccionadas de Huancarhuaz en los medios LB-X y LB-CMC

a) Actividad endoglucanasa y b) actividad xilanasas. Medio de cultivo LB-xilano en barras blancas y LB-CMC en barras oscuras. NS, no hay diferencias significativas en la prueba T-student al 99% de confianza. Los valores son promedios de seis replicas \pm SD.

TEMPERATURA DE CRECIMIENTO

Para conocer el grado de termotolerancia de las cepas seleccionadas, se calculó la velocidad de crecimiento entre 30°C y 60°C (Madigan et al, 1998). Los gráficos de la velocidad de crecimiento en relación a la temperatura de incubación se encuentran en el Anexo 11, las temperaturas óptimas de cultivo en TSA y el rango de temperatura en el que se observa crecimiento en la Tabla 12.

Según la temperatura óptima de crecimiento la mayoría de *B. licheniformis* seleccionados podrían ser considerados termófilos moderados o facultativos (Mehta y Satyanarayana, 2013), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kamble y Jadhav (2011) y Lee et al. (2008), quienes también aislaron cepas de esta especie con características termófilas moderadas y habilidad hidrolítica.

Por otro lado, todas las cepas de *B. subtilis* seleccionadas tienen temperatura óptima de crecimiento entre 40°C y 45°C, que muestra su condición mesófila con termotolerancia porque mantiene un buen crecimiento hasta en 50°C. Estos resultados pueden estar en concordancia con los resultados de otras fuentes termales donde se han aislado cepas de *B. subtilis* (Emtenani et al., 2013; Baysal et al., 2003; Pradhan et al. 2013). Del mismo modo la presencia de esta especie mesófila termotolerante en las fuentes Chancos y Olleros podría estar relacionada con las temperaturas de los lugares de aislamiento que son menores de 48°C; además ningún representante de esta especie fue seleccionada para la fuente termal de Huancarhuaz cuya temperatura es aproximadamente de 68 – 71°C.

C. laeviribosi ha sido descrita como una cepa termófila moderada, con temperatura óptima de 45°C y buen crecimiento en Caldo Tripticosa de Soya, TSA (Cho et al., 2007a). Sin embargo, la cepa EHB4 aislada en el presente trabajo tiene una velocidad de crecimiento muy bajo, haciéndose máxima a 55°C; además esta cepa no muestra crecimiento a 40°C, lo cual indicaría que requiere temperatura elevada para crecer, característica relevante de los termófilos obligatorios (Mehta y Satyanarayana, 2013).

LISTA DE LAS CEPAS CULTIVABLES CON ACTIVIDAD CELULOLITICA Y XILANOLÍTICA DE LAS FUENTES TERMALES DE CHANCOS, OLLEROS Y HUANCARHUAZ

Se elaboró un listado inicial de bacterias termotolerantes con actividad celulolítica y xilanolítica de las fuentes termales evaluadas. Las cepas se han ordenado de acuerdo a la especie, además todas muestran crecimiento y capacidades hidrolíticas sobre CMC y xilano cuando son cultivadas a 50°C, característica que podría ser de utilidad en los procesos de bioconversión de biomasa lignocelulósica (Shingania et al, 2010).

Por otro lado, se ha complementado la información con algunas pruebas bioquímicas donde se observa que la mayoría de cepas son catalasa y urea positivas; mientras que son pocas las que pueden usar el citrato y producir ácidos a partir de la fermentación de glucosa (prueba de rojo de metilo).

También se observa que *B. licheniformis* DCH2, *B. licheniformis* DO2, *B. subtilis* DCH4, *B. subtilis* D06 y *C. laeviribosi* EHB4 muestran actividad amilolítica. Esta habilidad ha sido descrita para algunas especies del género *Bacillus* entre ellas *B. licheniformis* y *B. subtilis* (Baysal et al, 2003); del mismo modo se menciona la habilidad amilolítica de *C. laeviribosi* en la descripción inicial de la especie (Cho et al., 2007a).

Finalmente, la Tabla 12 muestra la presencia de una microflora celulolítica y xilanolítica de bacterias baciliares formadoras de endosporas, donde el género *Bacillus* es predominante. Éste es considerado como uno de los géneros más importantes en la investigación, no sólo porque produce enzimas comerciales, sino también porque puede ser estudiada en sus mecanismos de excreción enzimática y capacidad de hospedero en procesos de clonación, en especial *B. licheniformis* es usado en la biotecnología industrial por estar considerado dentro del estatus de microorganismos reconocidos como seguros para la salud- GRAS (Aftab et al., 2012).

TABLA 11: CEPAS CULTIVABLES CON ACTIVIDAD XILANASA Y CELULASA DE LAS FUENTES TERMALES DE OLLEROS, HUANCARHUAZ Y CHANCOS

Cepa	Número Accesión GenBank	Fuente termal	Halo de hidrólisis		Actividad Enzimática			Temperatura de crecimiento		Pruebas bioquímicas					
			CMC	Xilano	Eg LBX/LBCMC	Cel total LBX/LBCMC	Xyl LBX/LBCMC	T ^o óptima (°C)	Intervalo (°C)	Citrato	Urea	Catalasa	Indol	RM	Amlasa
<i>Bacillus licheniformis</i>															
ICHB2		Chancos	+	+	1+/-	-/-	1+/1+	50 ^{TF}	30-55	+	+	-	-	-	-
ICHB3		Chancos	+	+	1+/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	-
ICHB4		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	-
ICHB5		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	-
ICHB6		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	-
ICHB7		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	-
ICHP1		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	-	-	-	-
DCH1		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	+	-
DCH2		Chancos	+	+	1+/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	+
DCH3		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	-
DCH5		Chancos	+	+	-/-	-/-	1+/1+	45 ^M	30-55	-	+	+	-	-	-
DO2		Olleros	+	+	1+/-	-/-	1+/1+	45 ^M	30-55	+	-	+	-	+	+
ECHC4		Chancos	+	+	1+/-	-/-	1+/2+	45 ^M	30-50	-	+	-	-	-	-
EHB1	KF911393	Huancarhuaz	+	+	1+/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	-	-
EHB2	KF911391	Huancarhuaz	+	+	1+/-	-/-	1+/1+	50 ^{TF}	35-55	-	+	+	-	-	-

continúa en la página siguiente

Cepa	Número Accesión GenBank	Fuente termal	Halo de hidrólisis		Actividad Enzimática			Temperatura de crecimiento		Pruebas bioquímicas					
			CMC	Xilano	Eg LBX/LBCMC	Cel total LBX/LBCMC	Xyl LBX/LBCMC	T ^{óptima} (°C)	Intervalo (°C)	Citrato	Urea	Catalasa	Indol	RM	Amilasa
<i>Bacillus licheniformis</i> (continuación)															
EHB3	KF911396	Huancarhuaz	+	+	1+/1+	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	+	+	+	-	+	-
EHC2	KF911394	Huancarhuaz	+	+	1+/-	-/-	1+/2+	45 ^M	30-55	-	+	+	-	+	-
EHC3	KF911392	Huancarhuaz	+	+	1+/-	-/-	1+/1+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	+	-
EOC1		Olleros	+	+	-/-	-/-	1+/1+	50 ^{TF}	30-55	+	+	+	-	+	-
EOP2		Olleros	+	+	1+/1+	-/-	1+/1+	50 ^{TF}	30-55	-	-	+	-	+	-
EOP3		Olleros	+	+	-/-	-/-	1+/1+	50 ^{TF}	30-55	-	-	+	-	+	-
IHB1	KF911390	Huancarhuaz	+	+	1+/-	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	-	-	-	-
IHB2	KF911395	Huancarhuaz	+	+	-/1+	-/-	1+/2+	50 ^{TF}	30-55	-	+	+	-	+	-
IOPC2		Olleros	+	+	-/-	-/-	2+/2+	50 ^{TF}	30-55	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>															
DCH4		Chancos	+	+	3+/2+	+/-	5+/5+	45 ^M	30-50	+	+	+	-	+	+
DO1		Olleros	+	+	1+/-	-/-	2+/2+	45 ^M	30-50	-	+	+	-	-	+
DO6		Olleros	+	+	2+/1+	-/-	2+/4+	45 ^M	30-50	-	+	+	-	+	-
ICHB1		Chancos	+	+	2+/1+	-/-	3+/2+	45 ^M	30-55	+	+	+	-	+	-
<i>Cohnella laeviribosi</i>															
EHB4	KF911397	Huancarhuaz	+	+	1+/1+	-/-	2+/2+	55 ^{TO}	40-60	-	+	-	-	+	+

1+, 100-559; 2+, 560-1019; 3+, 1020-1479; 4+, 1480-1939; 5+, 1940-2399 de actividad enzimática (U.l⁻¹). Xyl, actividad xilanasa; Eg, actividad endoglucanasa; Cel/ Total, celulasa total. ^M, mesófilas termotolerante; ^{TF}, termófilas facultativas; ^{TO}, termófilas obligadas. RM, prueba rojo de metilo.

TEMPERATURA ÓPTIMA, pH ÓPTIMO Y ESTABILIDAD TÉRMICA

La actividad óptima de las enzimas depende de las condiciones de temperatura, pH, presencia de inhibidores entre otros (Shinghania et al. 2010; Anwar et. 2014). En ese sentido, se realizó una primera determinación de la temperatura óptima, pH óptimo y estabilidad térmica de los extractos crudos de las cepas que presentaron mayor actividad endoglucanasa y xilanasa: *B. subtilis* DO6, *B. subtilis* DCH4, y *C. laeviribosi* EHB4 porque se considera que estas características son de importancia para definir el grado de utilidad industrial de las enzimas. Además se incorporó en los ensayos a la cepa *B. licheniformis* EOP2, porque presentó mayor actividad endoglucanasa y xilanasa entre las cepas de esta especie.

Con esta finalidad, se utilizaron los extractos que dieron los mayores valores de actividad enzimática. En el caso de *B. subtilis* DO6 y DCH4 se usaron los extractos LB-X para la actividad endoglucanasa y LB-CMC para la actividad xilanasa, en *B. licheniformis* EOP2 se usó LB-CMC y en *C. laeviribosi* EHB4 se utilizó LB-X para ambas actividades.

Los resultados de temperatura óptima y pH óptimo para la actividad endoglucanasa y xilanasa de las cepas evaluadas se encuentra en la Tabla 12, y las Fig. 11-15 y 16- 20 presentan las actividades obtenidas a diferentes temperaturas, pH y estabilidad térmica de ambas actividades.

Tabla 12: Temperaturas y pH óptimos de las actividades endoglucanasa y xilanasa de los extractos crudos de las cepas DCH4, DO6, EOP2 y EHB4

Cepas	ENDOGLUCANASA				XILANASA			
	T° óptima		pH óptimo		T° óptima		pH óptimo	
	°C	U.l ⁻¹	pH	U.l ⁻¹	°C	U.l ⁻¹	pH	U.l ⁻¹
<i>B. subtilis</i> DCH4	45	1086 ± 80	5	1128 ± 60	55	2978 ± 24	6	3766 ± 22
<i>B. subtilis</i> DO6	60	307 ± 9	5	354 ± 48	55	1347 ± 20	7	1353 ± 24
<i>B. licheniformis</i> EOP2	60	281 ± 18	6	183 ± 14	65	679 ± 7	6	541 ± 44
<i>C. laeviribosi</i> EHB4	60	753 ± 56	6	413 ± 56	65	1015 ± 28	7	789 ± 71

Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) es el promedio de seis replicas ± DS.

Actividad endoglucanasa

Los procesos de bioconversión de celulosa por lo general se realiza a 50°C (Shinghania et al., 2010). Adicionalmente Rawat y Tewari (2012), indican que la temperatura óptima en las celulasas comerciales es principalmente de 60°C. En ese sentido, la temperatura óptima para la actividad endoglucanasa del extracto de *B. subtilis* DO6 concuerda con la característica establecida (Fig.11a), al igual que la endoglucasa purificada de *B. subtilis* LFS3 (Rawat y Tewari, 2012) y el extracto de *B. subtilis* KIBGE-HAS cultivado en bagacillo como sustrato carbonado (Bano et al., 2013).

Por otro lado, *B. subtilis* DCH4 presentó actividad endoglucanasa máxima a 45°C, menor a las necesidades industriales. Sin embargo, en el rango de 50-70°C la actividad se mantiene sobre el 75% (Fig. 12a), mostrando un amplio espectro de actividad con respecto a la temperatura y dejando en consideración la posibilidad de su estudio para el uso en procesos industriales y bioconversión.

En los procesos de bioconversión, por lo general las celulasas ácidas son las más deseadas, porque en muchos casos la biomasa es pre-tratada con ácidos o se preparan mezclas con enzimas de *T. reesei* con pH óptimos cercanos a 5 (Shinghania et al., 2010). Por lo tanto, la actividad endoglucanasas de los extractos DO6 y DCH4, tienen pH óptimos adecuados para estos fines (Tabla 12). También se puede observar que la actividad endoglucanasa del extracto DO6 se mantiene hasta en 81% a 6 de pH (Fig. 11b); mientras para el caso de DCH4 se observa que se mantienen hasta en 52% a 7,8 de pH (Fig. 12b) este comportamiento también a sido reportado para la CMCasa de *B. subtilis* LFS3 la cual además muestra un pH óptimo de 4 y estabilidad alcalina (Rawat y Tewari, 2012); mientras que *B. subtilis* KIBGE-HAS mostró pH óptimo de 7 y estabilidad ácida y alcalina (Bano et al., 2013)

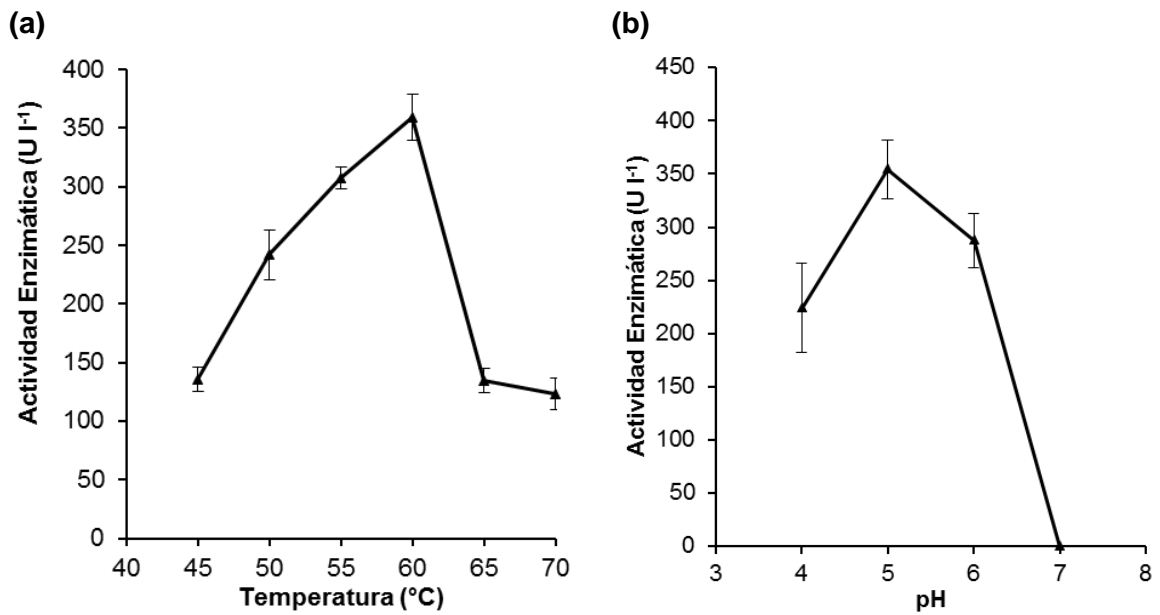


Figura 11: Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de *B. subtilis* DO6. (a) Corresponde a la temperatura óptima y (b) al pH óptimo. Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas \pm DS.

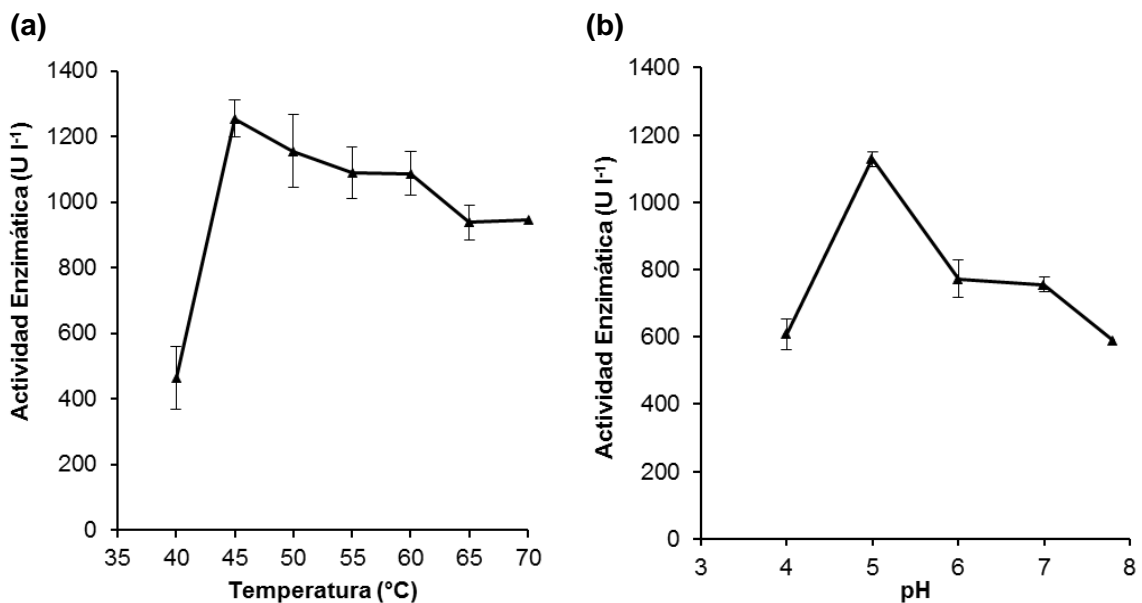


Figura 12: Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de *B. subtilis* DCH4. (a) Corresponde a la temperatura óptima y (b) al pH óptimo. Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas \pm DS.

Respecto a la estabilidad térmica, la Figura 15 muestra que el extracto de DCH4 después de 1 hora de incubación a 60, 70 y 80°C, mantiene el 37, 25 y 25% de actividad, respectivamente. Esta ligera estabilidad térmica podría estar relacionada con los resultados de temperatura óptima y espectro amplio de actividad que muestra este extracto. Así mismo, Rawat y Tewari (2012) describen una CMCase de 185kDa purificada de *B. subtilis* LFS3 que presenta temperatura óptima de 60°C y además mantiene su actividad en el ensayo de estabilidad térmica hasta en 61% a 60°C de incubación por 1h, decreciendo a 10% a 70°C y 80°C. Estos resultados no se pueden comparar completamente porque la temperatura de incubación durante la hidrólisis enzimática en la cepa LFS3 fue medida a 40°C; mientras que en el presente trabajo las evaluaciones enzimáticas fueron desarrolladas a 50°C. Por otro lado, la actividad endoglucanasa de *B. subtilis* DO6 no presenta estabilidad térmica a las condiciones evaluadas.

Respecto a la actividad endoglucanasa de *B. licheniformis* EPO2, se ha determinado 60°C como temperatura óptima, manteniéndose hasta el 79% de actividad a 70°C (Fig. 13a). En este caso el extracto de *B. licheniformis* EPO2 muestra características termofílicas para endoglucanasa. Este resultado concuerda con la endoglucanasa de *B. licheniformis* ATCC 14580, cuya temperatura óptima fue de 60°C (Aftab et al., 2011) y con la endoglucanasa de *B. licheniformis* B-41361 cuya actividad máxima fue a 55°C (Bischoff et al. 2006). Adicionalmente, Aygan et al. (2011) reportan una endoglucanasa alcalina, termoestable y halófila de *B. licheniformis* C108, con temperatura óptima de 30°C, pero mantiene un espectro de actividad de hasta el 85% entre 20-80°C. Otros valores de temperaturas óptimas han sido descritas para endoglucanasas de *B. licheniformis* tal como para la cepa MVS1, aislada de una fuente termal que muestra una endoglucanasa con actividad máxima de 50°C (Achayra y Chaudhary, 2012)

El pH óptimo de *B. licheniformis* EPO2, se muestra ligeramente ácido, manteniendo 70% de su actividad a pH de 7,8 (Fig. 13b). Similares resultados han sido reportados para las endoglucanasas de *B. licheniformis* ATCC 14580 (Aftab et al., 2011), de *B. licheniformis* B-41361 (Bischoff et al., 2006) y de MVS1 (Achayra y Chaudhary, 2012). Sin embargo existen varios estudios de celulasas alcalinas provenientes de *B. licheniformis* (Aygan et al., 2011).

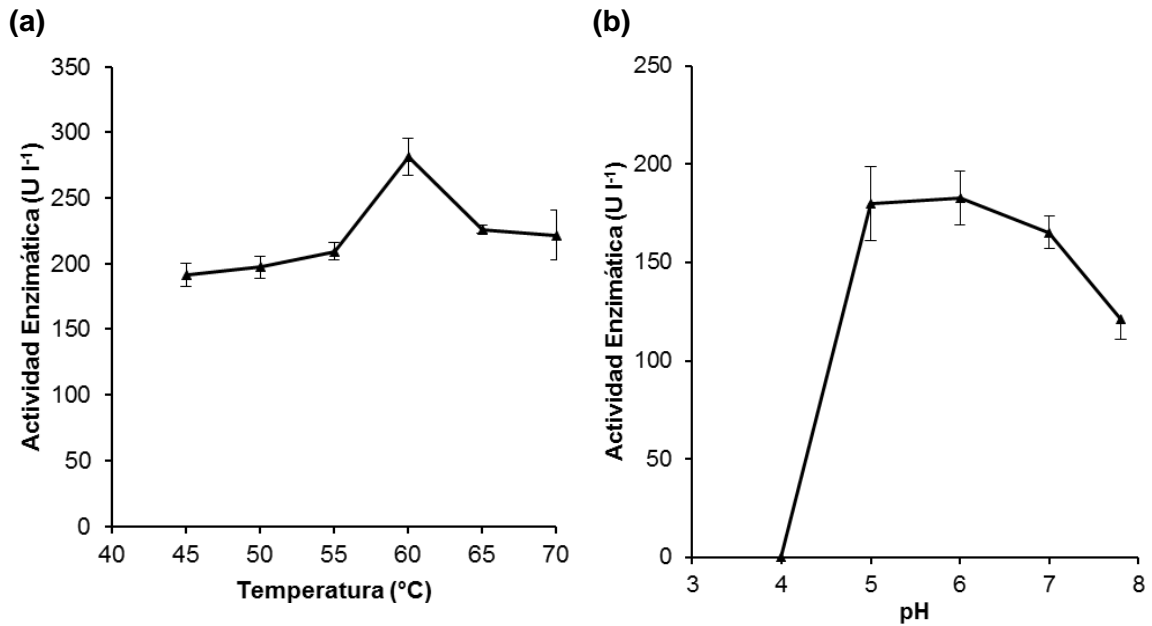


Figura 13: Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de *B. licheniformis* EOP2. (a) Temperatura óptima y (b) al pH óptimo.

Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas \pm DS.

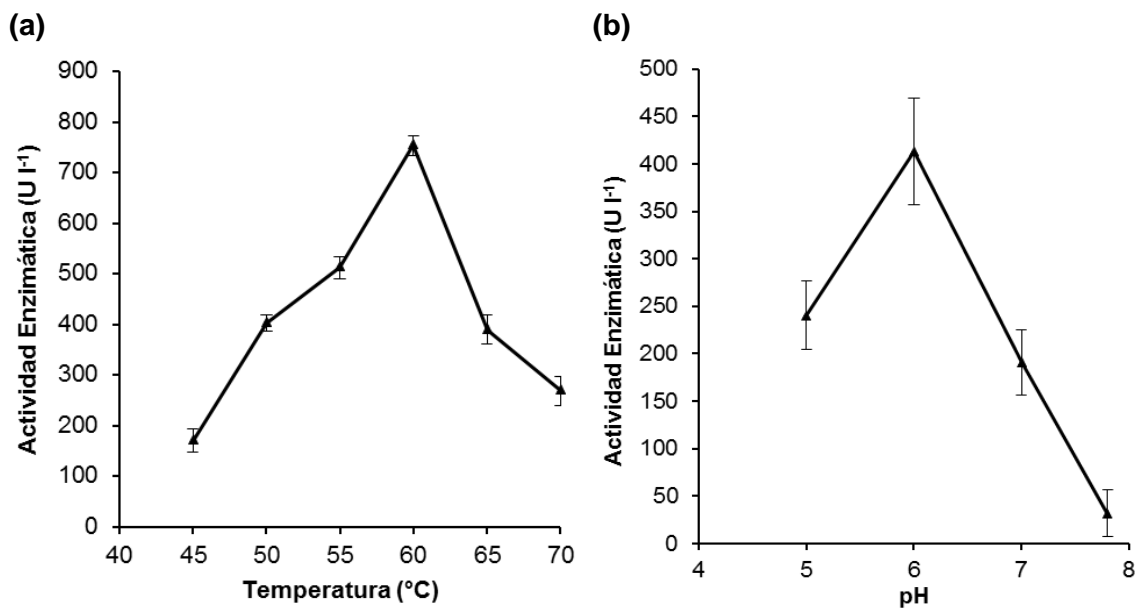


Figura 14: Temperatura y pH óptimos de la actividad endoglucanasa de *C. laeviribosi* EHB4. (a) Temperatura óptima y (b) al pH óptimo.

Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas \pm DS.

De acuerdo a la Figura 15, se puede observar que la actividad endoglucanasa de EPO2 no se mantuvo después de ser incubado a 60°C por 1 hora, resultados contrarios se han encontrado en *B. licheniformis* B-41361 que mantuvo hasta 90% de su actividad luego de ser incubado a 60°C por 1 hora (Bischoff et al., 2006).

La temperatura óptima obtenida para la actividad endoglucanasa del extracto de *C. laeviribosi* EHB4 fue de 60°C (Fig. 14a). Por otro lado, la actividad es ligeramente acidófila con un pH óptimo de 6 (Fig. 14b). También se puede observar amplio espectro de actividad endoglucanasa con respecto a la temperatura.

Una característica importante de las enzimas es la estabilidad térmica, y en este caso la actividad endoglucanasa de *C. laeviribosi* EHB4 mostró resultados interesantes porque mantiene hasta un 50% de su actividad luego de la incubación a 90°C por 1 hora, lo cual da indicios de la presencia de por lo menos una enzima con actividad endoglucanasa termofílica (Fig. 15). En ese sentido, muchas especies de *Paenibacillus* un género cercano a *Cohnella* muestran actividad celulolítica con varios grados de estabilidad térmica y corresponden a unidades simples, bi-funcionales o multicomplejos enzimáticos (Pason et al., 2006; Ogawa et al., 2007; Wang et al., 2008; Shi et al., 2010).

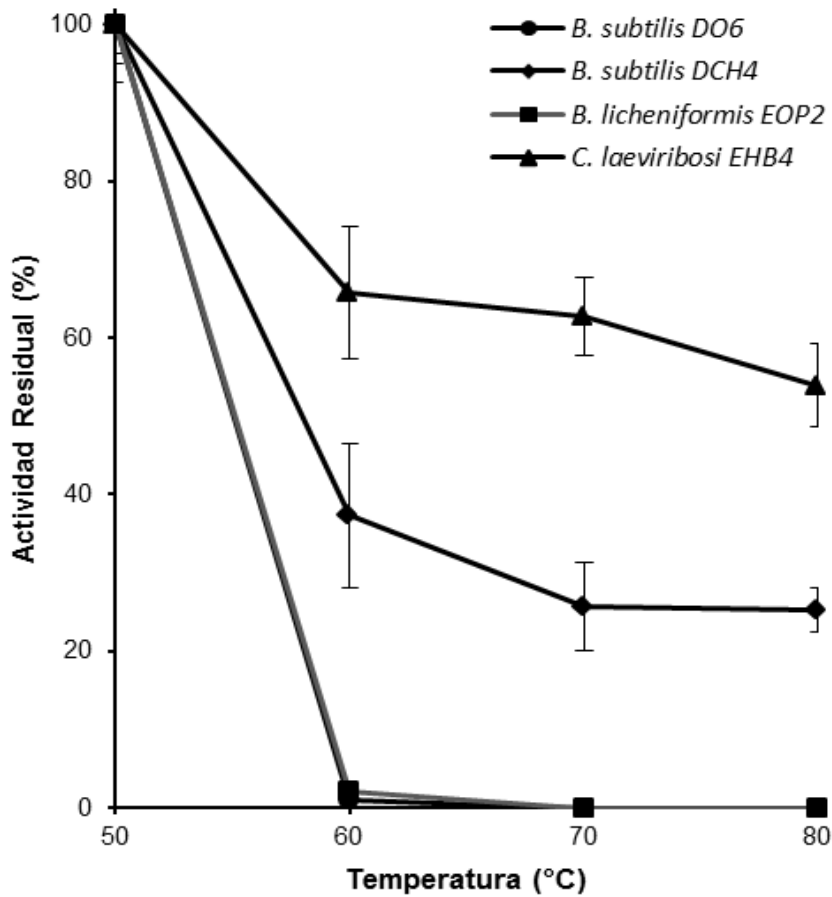


Figura 15: Actividad endoglucanasa de residual luego de la incubación sin sustrato del extracto enzimático a 60, 70 y 80°C por 1 hora. El porcentaje es calculado en relación a la actividad a 50°C con un extracto sin tratamiento incubación. Los valores son los promedios de seis replicas \pm DS.

Actividad xilanasa

La actividad xilanasa de las cepas *B. subtilis* DCH4 y DO6, mostró temperaturas óptimas de 55°C. Ambas cepas mantienen una actividad mayor a 74% a 60°C y sólo DO6 mantiene la actividad xilanasa hasta en un 64% a 65 °C (Fig.16a y 17a). La temperatura óptima encontrada en ambas cepas fue 5°C menor a la que se encontró en una xilanasa purificada de *B. subtilis* (GenBank GQ301542) proveniente de una fuente termal (Saleem, et. al. 2012). Sin embargo, se ha encontrado actividad xilanasa libre de celulasa con temperatura óptima de 80°C en el extracto crudo de *B. subtilis* CO1 (Ayyachamy y Vatsala, 2007).

Sá-Pereira et al. (2002), han encontrado pH óptimo de 6 para *Xyl II* de *B. subtilis* CCM1966 aislada de una fuente termal. De acuerdo a las Figuras 16b y 17b se observa que las cepas de *B. subtilis* DO6 y DCH4 muestran actividades máximas entre 6-7 de pH, lo cual concuerda con la mayoría de xilanasas cuyo pH óptimos están cercanos a la neutralidad (Wang et al., 2010). Sin embargo, el extracto crudo de *B. subtilis* CO1 presenta pH óptimo de 8 (Ayyachamy y Vatsala, 2007).

Con respecto a la estabilidad térmica xilanasa los extractos de DO6 y DCH4 pierden un alto porcentaje de su actividad, luego de haber sido incubados por una hora a 60°C (Fig. 20). A las mismas condiciones, resultados contrarios fueron obtenidos en el extracto de *B. subtilis* CO1, que mantiene su actividad en un 85,7 y 74,8% a 60°C y 80°C, respectivamente (Ayyachamy y Vatsala, 2007). De igual manera, Saleem et al. (2012) reportan que la xilanasa de *B. subtilis* GQ 301542 retiene completamente su actividad cuando es incubado por 1 hora a 65°C y a 90°C mantiene el 30%.

A pesar de que la actividad xilanasa en el extracto crudo no muestra alta estabilidad térmica, es importante destacar que el extracto de la DO6 mantiene una actividad residual baja (15%) sin llegar completamente a cero (Fig. 20), lo cual podría deberse a la presencia de al menos dos enzimas con actividad xilanasa, tal como se describe para *B. subtilis* CCM1966 (Sá-Pereira et al., 2002). Por otro lado, *Xyl II* (xilanasa II) a las mismas condiciones de ensayo mantuvieron 35% aproximadamente de actividad a 60°C, perdiéndose por completo a 80°C (Sá-Pereira et al., 2002).

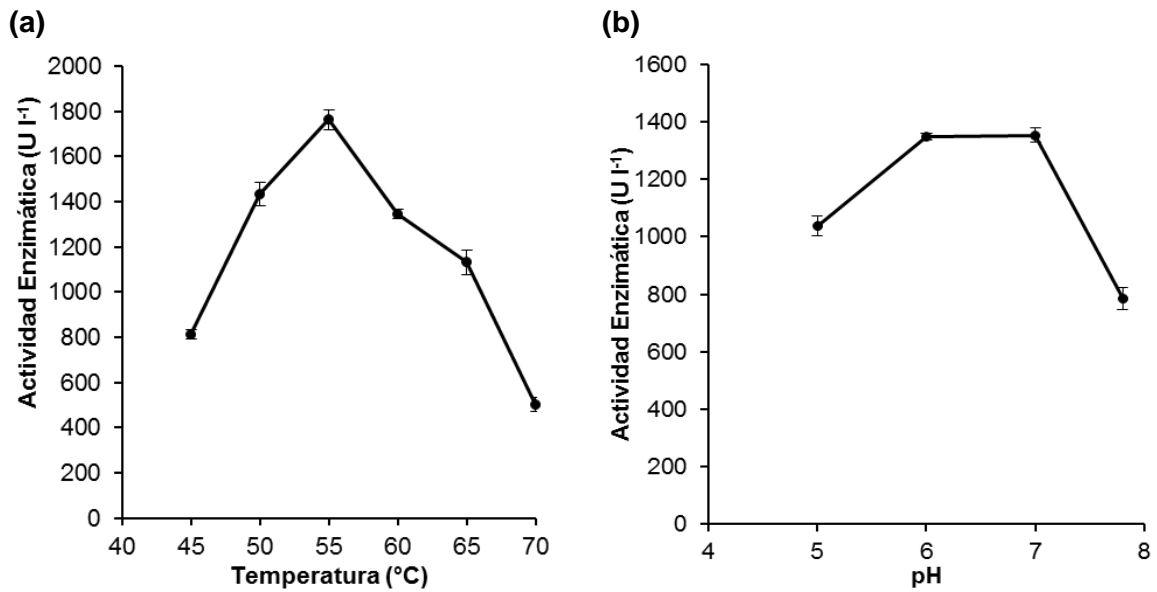


Figura 16: Temperatura y pH óptimos de la actividad xilanasa de *B. subtilis* DO6. (a) Temperatura óptima y (b) pH óptimo.

Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas \pm DS.

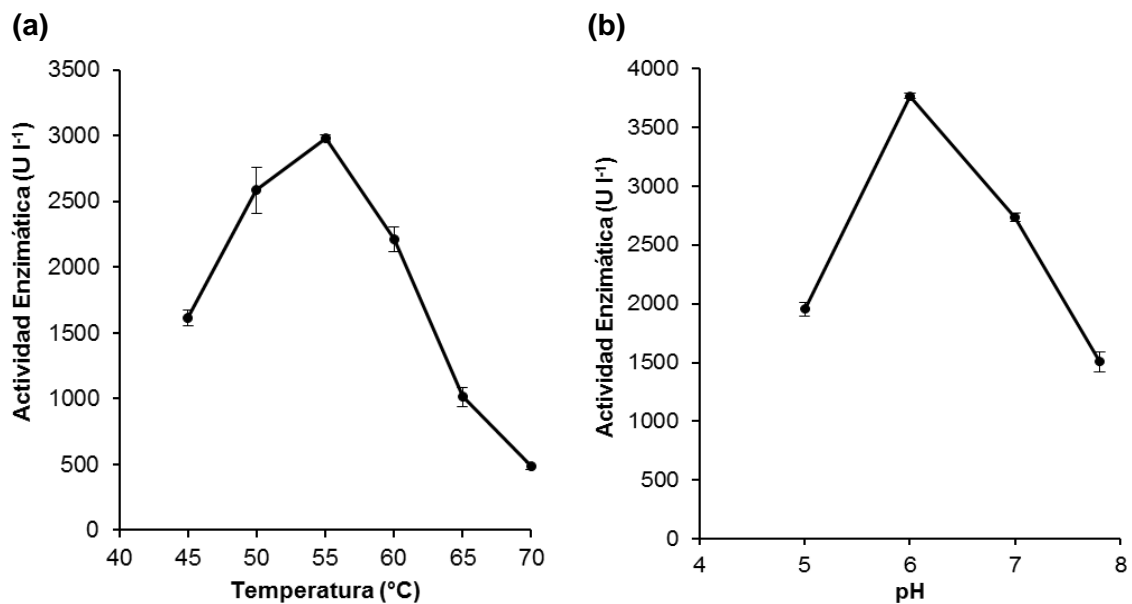


Figura 17: Temperatura y pH óptimos de la actividad xilanasa de *B. subtilis* DCH4. (a) Corresponde a la temperatura óptima y (b) al pH óptimo.

Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas \pm DS.

La presencia de xilanasas termófilas de *B. licheniformis* 77-2 han sido reportadas por Damiano et al. (2006) quienes han purificado y establecido temperaturas óptimas de 70 y 75°C para las xilanasas X-I y X-II, respectivamente. A pesar que el extracto de *B. licheniformis* EOP2 muestra una temperatura óptima menor de 65°C, esta actividad se mantiene hasta 83% entre 45-70°C, demostrando un amplio espectro de actividad con respecto a la temperatura (Fig. 18a). Resultados similares se ha obtenido en el extracto crudo de *B. licheniformis* P11(C) cuya temperatura óptima fue de 60°C y la actividad se mantuvo sobre el 88% a 70°C (Bajaj y Manhas, 2012). Sin embargo, menores temperaturas óptimas para la actividad xilanasa se han reportado, por ejemplo en el caso del complejo enzimático (MEC) de *B. licheniformis* DVS1 (van Dick et al., 2010) y la xilanasa *Xyn-11* aislada de *B. licheniformis* MS5-14 proveniente de una fuente termal de 57°C (Lee et al. 2008).

El pH óptimo para la actividad xilanasa del extracto crudo de EOP2 es ligeramente acidófila (Tabla 11), manteniendo actividad sobre 93 y 70% a pH 5 y 7,8 respectivamente (Fig. 18b). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para *Xyn-11-MS5-14*, cuyo pH óptimo también fue de 6 (Lee et al. 2008), pero difieren con el pH óptimo de 8-9 para la cepa P11(C) y que además muestra amplio espectro de actividad (entre 5-12 de pH), lo cual es una característica de importancia para las diversas aplicaciones industriales (Bajaj y Manhas, 2012).

Respecto a la estabilidad térmica, EOP2 mostró actividad residual después de 1h de incubación a 60, 70 y 80°C de 58, 51 y 50%, respectivamente (Fig. 20). Este resultado fue menor al obtenido en el extracto de *B. licheniformis* P11(C) que fue completamente estable a 60°C (pH 9) hasta por 3 h de incubación, a 70°C por 1 h mantuvo aprox. 65% de la actividad; además a 80, 90 y 100°C por 1 hora de incubación mantuvo aprox. 60% (Bajaj y Manhas, 2012). Del mismo modo las xilanasas X-I y X-II de la cepa 77-2, muestran alta estabilidad térmica manteniendo su actividad a más de 90% después de 1h de incubación a 60°C y 50°C respectivamente (Damiano et al., 2006).

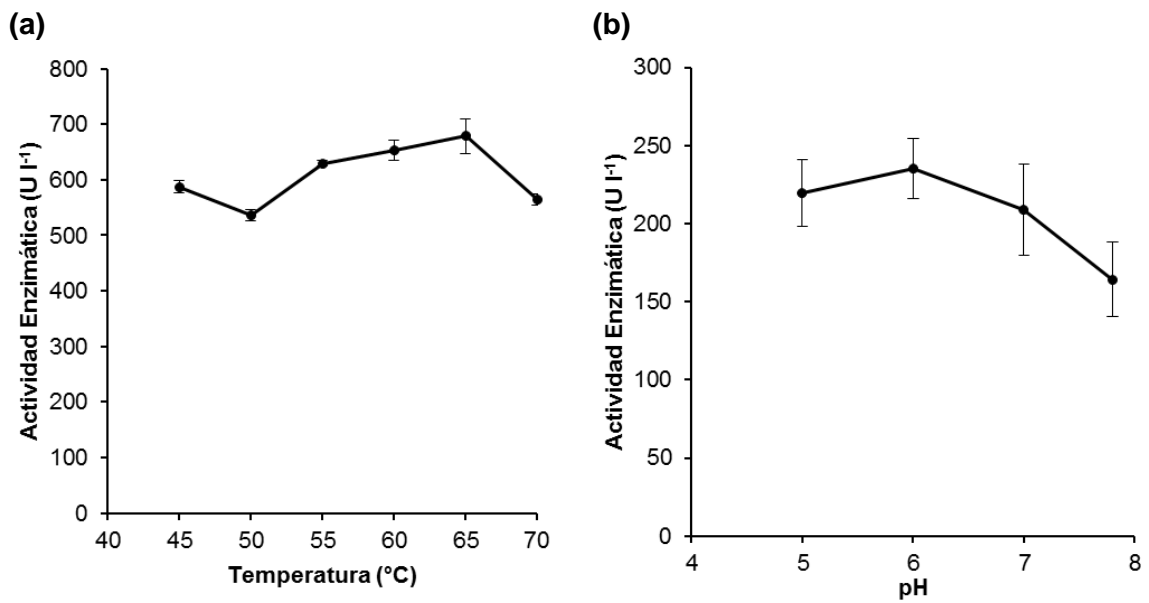


Figura 18: Temperatura y pH óptimos de la actividad xilanasa de *B. licheniformis* EOP2. (a) Temperatura óptima y (b) al pH óptimo. Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas ± DS.

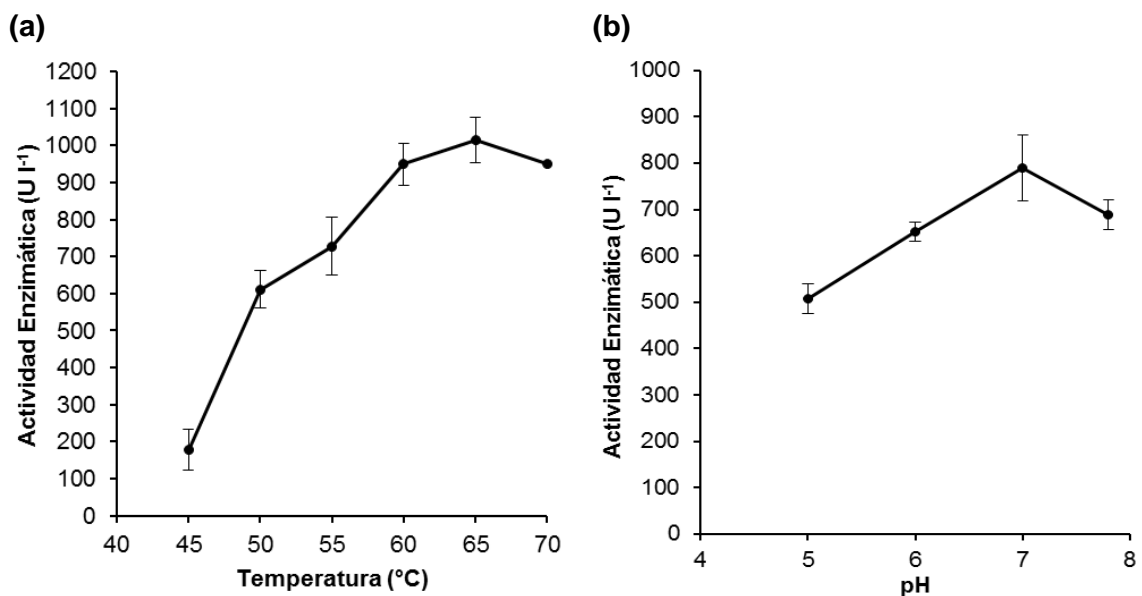


Figura 19: Temperatura y pH óptimos de la actividad xilanasa de *C. laeviribosi* EHB4. (a) Corresponde a la temperatura óptima y (b) al pH óptimo. Los valores de la actividad enzimática (U.l⁻¹) son medias de seis replicas ± DS.

A pesar que los valores de estabilidad son menores a lo descrito para otras cepas de *B. licheniformis*, la actividad xilanasa residual de 50% del extracto crudo de EPO2 perdura hasta 80°C, lo cual podría estar en relación con la presencia de dos xilanasas tal como se describe para la cepa P11(C) (Bajaj y Manhas, 2012). Este resultado muestra una característica de importancia para la actividad xilanasa de EPO2, porque no todas las enzimas de *B. licheniformis* muestran estabilidad térmica a 60°C (Lee et al, 2008).

Estudios en *C. laeviribosi* HY-21 muestran la presencia de dos enzimas xilanasas, una extracelular *eXyl* y otra periplasmática *iXyl* (Kim et al., 2010). En ese sentido, la temperatura óptima de la actividad xilanasa de la cepa EHB4 fue 65°C (Fig. 19a), esta actividad se mantiene sobre el 93% en el intervalo de 60-70°C. Estos resultados son similares con el obtenido para la *eXyl* de la cepa HY-21, cuya temperatura óptima fue de 65°C; mientras que difiere de *iXyl*, que presenta máxima actividad a 50°C (Kim et al., 2010).

Por otro lado, el extracto crudo de *C. laeviribosi* EHB4 mostró una máxima actividad a pH 6, lo cual difiere del pH óptimo de 7,5 de *iXyl* (Kim et al., 2010), mientras que el pH óptimo para *eXyl* aún no ha sido reportado.

Respecto a la estabilidad térmica, *iXyl* ha sido catalogada como una enzima mesófila, su actividad se pierde casi en su totalidad cuando es incubada a 55°C por 15 min (Kim et al. 2010). Sin embargo, el extracto crudo de *C. laeviribosi* EHB4 muestra un descenso de 70% en su capacidad xilanólítica cuando es incubado 60°C, manteniendo el 30% restante a 70°C y 80°C, lo cual podría deberse a la estabilidad térmica de *eXyl* (Fig. 20).

Finalmente, se puede considerar que la determinación de los parámetros óptimos de temperatura y pH de los extractos de las cepas DO6, DCH4, EPO2 y EHB4, nos muestran que la mayoría de los extractos tienen una actividad hidrolítica endoglucanasa y xilanasa termofílicas, con pH entre ácido y neutro. Este trabajo constituye una fase inicial y nos brinda un panorama general de las cualidades hidrolíticas de las cepas seleccionadas y que podrían ser objeto de posteriores estudios para establecer mejor criterio en definir su utilidad en procesos industriales y de bioconversión, ya sea con tecnologías convencionales o de tecnologías moleculares de punta.

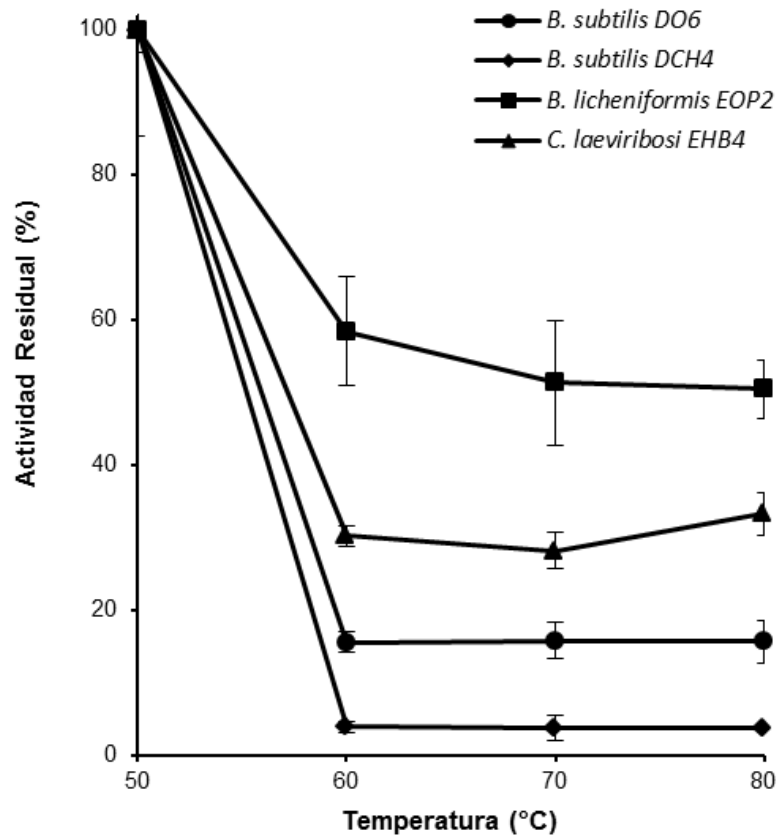


Figura 20: Actividad xilanasa residual, luego de la incubación sin sustrato del extracto enzimático a 60, 70 y 80°C por 1 hora. El porcentaje es calculado en relación a la actividad a 50°C con un extracto sin tratamiento. *Los valores son los promedios de seis replicas ± SD*

CONCLUSIONES

- Se han aislado 62 cepas de bacterias termotolerantes de las fuentes termales Chancos, Olleros y Huancarhuaz
- Se demostró que 29 cepas presentan actividad hidrolítica sobre CMC y/o xilano de beechwood, que corresponde a la actividad endoglucanasa y xilanasas, respectivamente.
- El mayor número de cepas aisladas y seleccionadas se obtuvieron usando bagacillo como sustrato de enriquecimiento.
- La composición bacteriana celulolítica y xilanolítica termotolerante está representada por cepas de *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* y *Cohnella laeviribosi*.
- En la cuantificación de actividad enzimática de celulasas y xilanasas, se encontró que todas las cepas presentan actividad endoglucanasa y xilanasas.
- Los extractos crudos de las cepas *B. subtilis* DCH4, *B. subtilis* DO2, *C. laeviribosi* EHB4, y *B. licheniformis* EPO2 poseen las mejores actividades endoglucanasas y xilanasas en condiciones de cultivo no optimizadas.
- La máxima actividad endoglucanasa y xilanasas de los extractos crudos de *B. subtilis* DCH4, *B. subtilis* DO2, *C. laeviribosi* EHB4, y *B. licheniformis* EPO2 se da a pH de 5-7 y temperaturas de 45-65°C.
- La máxima estabilidad térmica xilanasas se encontró en el extracto crudo de *B. licheniformis* EPO2 con 60% y 50% de actividad enzimática residual después de una incubación a 60°C y 80°C, respectivamente.
- La máxima estabilidad térmica endoglucanasa se encontró en *C. laeviribosi* EHB4 con 50% de actividad enzimática residual después de una incubación a 90°C.
- Es el primer reporte de actividad endoglucanasa para *Cohnella laeviribosi*.

V. RECOMENDACIONES

- Continuar con los estudios de las celulasas y xilanasas producidas por las cepas de bacterias que tuvieron la mayor actividad enzimática, optimizando las condiciones de cultivo para maximizar la producción y de esta manera definir su grado de utilidad en los procesos de bioconversión que generen productos de utilidad para el ser humano.
- Profundizar el estudio en la endoglucanasa de *C. laeviribosi* mediante técnicas de biología molecular que permitan conocer el gen y su posibilidad de aplicación en procesos de bioconversión.

VI. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Acharya A.; Joshi D.R.; Shrestha K.; Bhatta D.R. (2012). Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. *Scientific World* 10(10): 43-45
2. Acharya S.; Chaudhary A. (2012). Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot springs. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55, 497-503.
3. Adsul M.G.; Ghule J.E.; Singh R.; Shaikh H.; Bastawde K.B.; Gokhale D.V.; Varma A.J. (2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers* 57: 67-72
4. Aftab S.; Aftab M. N., Ikram-UI-Haq; Javed M. M., Zafar A.; Iqbal I. (2012). Cloning and expression of endo-1,4- β -glucanase gene from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 into *Escherichia coli* BL21 (DE 3). *African Journal of Biotechnology* 11(12):2846-2854
5. Ajijolakewu K. A.; Sani A.; Oyeyiola G. P.; Risikat N. (2013). Cellulase production potentials of the microbial profile of some sugarcane bagasse dumping sites in Ilorin, Nigeria. *Not. Sci. Biol.* , 5(4):445-449
6. Anwar Z.; Gulfranz M.; Irshad M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2): 163-173
7. Asgher M.; Bashir F.; Nasir I. H. M. (2013). A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bio-ethanol. *Chemical Engineering Research and Design* -1369, pgs.8
8. Asoodeh A.; Lagzian M. (2012). Purification and characterization of a new glucoamylpullulanase from thermotolerant alkaliphilic *Bacillus subtilis* DR8806 of a hot mineral spring. *Process Biochemistry* 47: 806–815
9. Assareh R.; Zahiri H. S.; Noghabi K. A., Aminzadeh S., Khaniki G. B. (2012). Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient

cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology* 120: 99–105.

10. Aygan A.; Karcioğlu L.; Arikan B. (2011). Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology* 10(5):789-796
11. Ayyachamy M.; Vatsala T.M. (2007). Production and partial characterization of cellulase free xylanase by *Bacillus subtilis* C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. *Letters in Applied Microbiology* 45:467–472
12. Bajaj B. K.; Manhas K. (2012). Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1: 330–337
13. Bano S.; Qader S. A.; Aman A.; Syed M. N.; Durrani K. (2013). High production of cellulose degrading endo-1,4- β -d-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Carbohydrate Polymers* 91: 300– 304
14. Bayer E.; Lamed R.; Himmel M. (2007). The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology* 18:237-245.
15. Baysal Z.; Uyar F.; Aytekin C. (2003). Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry* 38:1665-1668
16. Bhalla A.; Bansal N.; Kumar S.; Bischoff K. M.; Sani R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology* 128: 751–759
17. Bhat M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18:355-383

18. Binder J.B.; Raines R.T. (2010). Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *Proc Nat Acad Sci USA* 107, 4516-4521.
19. Bischoff K.; Rooney A.; Li X.; Liu S.; Hughes S. (2006). Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett* 28:1761–1765
20. Blumer-Schuetz S.; Kataeva I.; Westpheling J.; Adams M.; Kelly R. (2008). Extremely thermophilic microorganism from biomass conversion: status and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 19:210-217.
21. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
22. Butt M.; Tahir-Nadeem M.; Ahmad Z.; Sultan M. (2008). Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technol. Biotechnol.* 46(1):22–31
23. Camassola M.; Dillon A. J. P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J. Appl. Microbiol* 103, 2196-2204.
24. Cho E.-A.; Lee D.-W.; Cha Y.-H.; Lee S.-J.; Jung H.-C.; Pan J.-G.; Pyun Y.-R. (2007a). Characterization of a novel D-Lyxose isomerase from *Cohnella laevoribosii* RI-39 sp. nov. *J. Bacteriol* 189, 1655–1663.
25. Cho E.-A.; Lee J.-S.; Lee K.-C.; Jung H.-C.; Pan J.-G.; Pyun Y.-R. (2007b). *Cohnella laeviribosi* sp. nov., isolated from a volcanic pond. *Int.J. Syst.t Evol. Microbiol.* 57, 2902–2907.
26. Collins T.; Gerday Ch.; Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology Reviews.* 29:3-23
27. Damiano V. B.; Ward R.; Gomes E.; Alves-Prado H. F.; Da Silva R. (2006). Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and

- thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129:289-302.
28. Dashtban M.; Maki M.; Leung K. T.; Mao C.; Qin W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Crit. Rev. in Biotechnology* 30(4):302-9.
 29. Dereková A.; Mandeva R.; Kambourova M. (2008). Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1697-1702.
 30. Dhiman S. S.; Sharma J.; Battan B. (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanase: A review. *BioResources* 3(4): 1377-1402.
 31. Emtenani S.; Asoodeha A.; Emtenani S. (2013). Molecular cloning of a thermo-alkaliphilic lipase from *Bacillus subtilis* DR8806: Expression and biochemical characterization *Process Biochemistry* 48:1679–1685
 32. Helianti I. (2007) Direct Cloning of a Xylanase Gene from Pawan-Riau Hot Spring. *HAYATI Journal of Biosciences* 14(2): 54-58
 33. Hongpattarakere T. (2002). Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 24(3):481-491.
 34. Huamaní A. (2000). Riesgos volcánicos e hidrotermalismo en el Perú: Aguas termales y minerales en el norte del Perú. Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico. Boletín N° 22, Serie D: Estudios Regionales. Lima – Perú.
 35. Huang X.; Madan A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.
 36. Ibrahim D.; Li Zhu H.; Nuraqilah Y.; Isnaeni; Hong L.S. (2013). *Bacillus licheniformis* BT5.9 Isolated from Changar Hot Spring, Malang, Indonesia, as a Potential Producer of Thermostable α -amylase. *Tropical Life Sciences Research*, 24(1):71–84

37. Janda J. M.; Abbott S. L. (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. of Clinical Microbiology*, 45(9): 2761–2764
38. Jiang Z.; Deng W.; Li L.; Ding Ch.; Kusakabe I.; Tan S. (2004) A novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis*. *Biotechnology Letters* 26: 431–436.
39. Juturu V.; Wu J. Ch. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33:188–203
40. Kamble R. D.; Jadhav A. R. (2011). Xylanase Production by an Alkalothermophilic *Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 in Submerged Fermentation. *Int. J Biotech. & Biosci.* 1(1): 132-134
41. Kato S.; Shin H.; Cui Z.; Ishii M.; Igarashi Y. (2004). Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Ecology Reviews* 51:133-142
42. Khianggam S.; Tanasupawat S.; Akaracharanya A.; Kim K.K.; Lee K.C.; Lee J.-S. (2012). *Cohnella cellulositytica* sp. nov., isolated from buffalo faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1921-1925.
43. Kim S.; Dale B. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26 : 361-375
44. Kim D.Y.; Han M.K.; Oh H.-W.; Bae K.S.; Jeong T.-S.; Kim S.U.; Shin D.-H.; Kim I.-H.; Rhee Y.H.; Son K.-H.; Park H.-Y. (2010). Novel intracellular GH10 xylanase from *Cohnella laeviribosi* HY-21: Biocatalytic properties and alterations of substrate specificities by site-directed mutagenesis of Trp residues. *Bioresour Technol* 101, 8814–8821.
45. King B. C.; Donnelly M. K.; Bergstrom G. C.; Walker L. P.; Gibson D. M. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnol Bioeng* 102: 1033-1044.

46. Kublanov I. V.; Perevalova A. A.; Slobodkina G. B.; Lebedinsky A. V.; Bidzhieva S. K.; Kolganova T. V.; Kaliberda E. N.; Rumsh L.D.; Haertlé T.; Bonch-Osmolovskaya E. A. (2009). Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Appl Environ Microbiol* 75: 286–291.
47. Kulkarni N.; Shendye A.; Rao M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23:411-456
48. Kumar B. B.; Manhas K. (2012). Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1: 330–337
49. Kumar R.; Singh S.; Singh O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 35:377-391
50. Larkin M. A; Blackshields G.; Brown N. P; Chenna R.; McGettigan P.A.; McWilliam H.; Valentin F.; Wallace I. M.; Wilm A.; Lopez R.; Thompson J.D.; Gibson T. J.; Higgins D. G. (2007). Clustal W and CLUSTALX version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
51. Lee B-H; Kima B-K; Lee Y-J; Chung Ch-H; Lee J-W. (2010). Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology* 46:38–42
52. Lee C. C.; Kibblewhite-Accinelli R. E.; Smith M. R.; Wagschal K.; Orts, W.J.; Wong, D. W. S. (2008). Cloning of *Bacillus licheniformis* xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Curr Microbiol* 57: 301–305.
53. Lin Y.; Tanaka S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 627–642.
54. Lynd L.; Weimer P.; Zyl W.; Pretorius I. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3): 506- 577

55. Madigan M. T.; Martinka J. M.; Parker J. (1998). Brock: Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Ed. Prentice Hall. pp. 149-177.
56. Margeot A.; Hahn-Hagerdal B.; Edlund M.; Slade R.; Monot F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotechnol* 20, 372-380.
57. Mehta D.; Satyanarayana T. (2013) Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. In: *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles* ed. Satyanarayana, T., Littlechild, J. and Kawarabayasi, Y. pp. 3-60. Dordrecht: Springer.
58. Menon V.; Rao M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog Energy Combust Sci* 38, 522-550.
59. Nogi Y.; Takami H.; Horikoshi K. (2005). Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2309–2315.
60. Ogawa A.; Suzumatsu A.; Takizawa S.; Kubota H.; Sawada K.; Hakamada Y.; Kawai S.; Kobayashi T.; Ito S. (2007). Endoglucanases from *Paenibacillus* spp. form a new clan in glycoside hydrolase family 5. *J. Biotechnol.* 129(3): 406-14.
61. Paës G.; Berrin J-G.; Beaugrand J. (2012). GH11 xylanases: Structure, function, properties relationships and applications. *Biotechnology Advances* 30: 564–592
62. Pakpitcharoen A.; Potivejkul K.; Kanjanavas P.; Areekit S.; Chansiri K. (2008). Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. *Science Asia* 34: 424–431.
63. Pason P.; Kyu K.L.; Ratanakhanokchai K. (2006). *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* 72: 2483-2490.

64. Pathania S.; Sharma N.; Verma S. K. (2012). Optimization of cellulase-free xylanase produced by a potential thermoalkalophilic paenibacillus sp. isolated from hot springs of Northern Himalayas in India. *J. of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2 (1): 1-24.
65. Peng F.; Peng P.; Xu F.; Sun R-C. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances* 30: 879–903
66. Percival Z. Y.-H.; Himmel M. E.; Mielenz J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24: 452–481
67. Pillai P.; Archana G. (2012). A novel process for biodegradation and effective utilization of chrome shavings, a solid waste generated in tanneries, using chromium resistant *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry* 47: 2116–2122
68. Pradhan B.; Dash S. K.; Sahoo S. (2013). Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(12): 936-941
69. Rastogi G.; Bhalla A.; Adhikari A.; Bischoff K.M.; Hughes S.R.; Christopher L.P.; Sani R.K.. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour Technol* 101, 8798–8806.
70. Rathnan R. K.; Divya J.; Balasaravanan T. (2013). Isolation, screening, identification and optimized production of extracellular cellulase from *Bacillus subtilis* using cellulosic waste as carbon source *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2 (6):2383-2386
71. Rawat R.; Tewari L. (2012). Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles* 16:637–644

72. Reinsenbach A.-L.; Longnecker K.; Kirshtein J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* 66, 3798–3806.
73. Robb F. T; Antranikian G.; Grogan D. W.; Driessen A. J. M. (2008). Introduction. En *Thermophiles: biology and technology at high temperatures* ed. Robb F. T; Antranikian G.; Grogan D. W.; Driessen A. J. M. pp. 3-6 CRC Press.
74. Sa´-Pereira P.; Costa-Ferreira M.; Aires-Barros M. (2002). Enzymatic properties of a neutral *endo*-1,3(4)-xylanase Xyl II from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology* 94: 265–275
75. Sakuraba H.; Ohshima T. (2013). Heterologous production of thermostable protein and enzymes. En *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles* ed. Satyanarayana, T., Littlechild, J. and Kawarabayasi, Y. pp. 395-412 Dordrecht: Springer
76. Saleem M.; Aslam F.; Saleem A. M.; Tariq M.; Ibrahim R. M. (2012). Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus sp.* and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World J Microbiol Biotechnol* 28:513–522.
77. Satyanarayana T.; Raghu Kumar C.; Shivaji S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science* 89(1):78-90
78. Saxena R.C.; Adhikari D.K.; Goyal, H.B. (2009). Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev* 13, 167–178.
79. Sepahy A. A.; Ghazi S.; Sepahy M. (2011). Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste. *Enzyme Research* ID 593624, 9 pages
80. Sharma M.; Kumar A. (2013). Xylanases: An overview. *Br. Biotechnol. J.* 3: 1-28.

81. Shi P.; Tian J., Yuan T., Liu X., Huang H., Bai Y., Yang P.; Chen X.; Wu N.; Yao B. (2010). *Paenibacillus* sp. strain E18 bifunctional xylanase-glucanase with a single catalytic domain. *Appl. Environ Microbiol* 76(11):3620-4.
82. Shiratori H.; Tagami Y.; Beppu T.; Ueda K. (2010). *Cohnella fontinalis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1344–1348.
83. Singhanian R. R.; Sukumaran R. K.; Patel A. K.; Larroche C.; Pandey A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases *Enzyme and Microbial Technology* 46: 541–549.
84. Sirisena D.M.; Manamendra T.P (1995). Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from decomposing rice straw. *J Natn Sci Coun Sri Lanka* 23: 25-30.
85. Song J-M; Wei, D-Z. (2010). Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomass and Bioenergy* 34(12): 1930–1934
86. Steinmüller K.; Huamaní A. (1999). Riesgos volcánicos e hidrotermalismo en el Perú: Aguas termales y minerales en el centro del Perú. Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico. Boletín N° 21, Serie D: Estudios Regionales. Lima – Perú.
87. Suthar H.; Krushi H.; Anjana D.; Anuradha N. (2009). Selective plugging strategy based microbial enhanced oil recovery using *Bacillus licheniformis* TT33J. *Microbiol. Biotechnol.* 19(10), 1230–1237
88. Tamura K.; Peterson D.; Peterson N.; Stecher G.; Nei M.; Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.

89. van Dyk J. S.; Sakka M.; Sakka K.; Pletschke B.I. (2009). The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. *Enzyme Microb Technol* 45, 372-378.
90. van Dyk J. S.; Sakka M.; Sakka K.; Pletschke B. (2010). Characterization of the multi-enzyme complex xylanase activity from *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme and Microbial Technology* 47: 174–17.
91. van Dyk J.S.; Pletschke B.I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion. *Biotechnology Advances* 30:1458–1480
92. Voutilainen S.; Puranen T.; Siika-aho M.; Lappalainen A.; Alapuranen M.; Kallio J.; Hooman S.; Viikari L.; Vehmaanperä J.; Koivula A. (2008). Cloning, expression and characterization of novel thermostable family 7 cellobiohydrolases. *Biotechnology and Bioengineering* 101 (3): 515-528.
93. Wang W.; Yan L.; Cui Z.; Gao Y.; Wanga Y.; Jing R. (2011). Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresource Technology* 102: 9321–9324
94. Wang C.-M.; Shyu C.-L.; Ho, S.-P.; Chiou S.-H. (2008). Characterization of a novel thermophilic, cellulose-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. strain B39. *Lett Appl Microbiol* 47, 46-53.
95. Weber C.; Farwick A.; Benisch F.; Brat D.; Dietz H.; Subtil T.; Boles E. (2010). Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1303–1315.
96. Wilson D. (2008). Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125:289-297.
97. Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51:221-7.
98. Yan Sh.; Wu G. (2013). Secretory pathway of cellulase: a mini-review. *Biotechnology for Biofuels* 6: 177.

99. Zhang Y.-H. P.; Himmel M. E.; Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24, 452-481.
100. Lv Z.; Yang J.; Wang E; Yuan H. (2008). Characterization of extracellular and substrate-bound cellulases from a mesophilic sugarcane bagasse-degrading microbial community. *Process Biochemistry* 43: 1467–1472.

VII. ANEXOS

ANEXO 01: DESCRIPCIÓN Y MAPA DE UBICACIÓN DE LAS FUENTES TERMALES DE CHANCOS, OLLEROS Y HUANCARHUAZ

Fuente Termal de Chancos

Esta fuente termal se ubica en la comunidad campesina de Vicos, prov. de Carhuaz, a 3,5 Km del distrito de Marcará. Presenta cuevas naturales, piscina y cuartos individuales; sus aguas presentan alto contenido de Mn y AS por lo que no son aptas para beber, además su contenido en Li y Ba las hacen no aptas para baños. La temperatura en la fuente



Figura 21: Pozo exterior de la Fuente termal de Chancos.

principal es de aproximadamente 70°C y un pH de 6,6, siendo calificada como agua termo-mineral (Steinmüller & Huamaní. 1999).

Debido a que la fuente principal se encuentra encementada y es un atractivo para el que visita el complejo, los muestreos se realizaron en una afloración externa al complejo, la cual se encuentra empedrada y sus aguas son menores a la afloración principal.

Fuente Termal de Olleros

Se ubica en las afueras del pueblo de Olleros y en ambas márgenes del río del mismo nombre, sólo el margen derecho es utilizado como baño termal con pozas de concreto. Sus aguas pertenecen al grupo de las cloradas y contienen de 4474 a 6787 mg/L de Cl y sus temperaturas varían de 18°C a 37°C; su pH es levemente ácido a neutro (5,5 – 6,7); presenta contenidos muy altos de Fe, Ba,

As, y Li, no siendo recomendables para beber o para baños siendo calificada como agua termo-mineral (Steinmüller & Huamaní. 1999).

El muestreo se realizó en la afloración del margen derecho del río, cuyo caudal de agua es muy bajo, observándose alta liberación de gas.

Fuente Termal de Huancarhuaz

Es un complejo termal abandonado que se encuentra en el margen derecho de la Quebrada Yuracmayo en la Cordillera Blanca, al lado de la carretera Huancarhuaz-Caraz. Sus aguas surgen a través de manantiales en un intrusivo terciario, pertenecen a la familia de las cloradas con contenidos de 1434 – 1836 mg/L de Cl,



Figura 22: Pozo rústico de la Fuente termal de Huancarhuaz.

temperaturas de 56° - 73°C (de reservorio 120° - 117°C) y pH ligeramente ácido a neutro (6,4 – 7,1). En sus alrededores se observa sínter de carbonato. Sus aguas presentan alto contenido de Cl, Fe, Mn y As por lo que no es apta para beber y la presencia de As y Li las hacen no recomendables para baños, siendo calificada como agua termal (Huamaní, 2000).

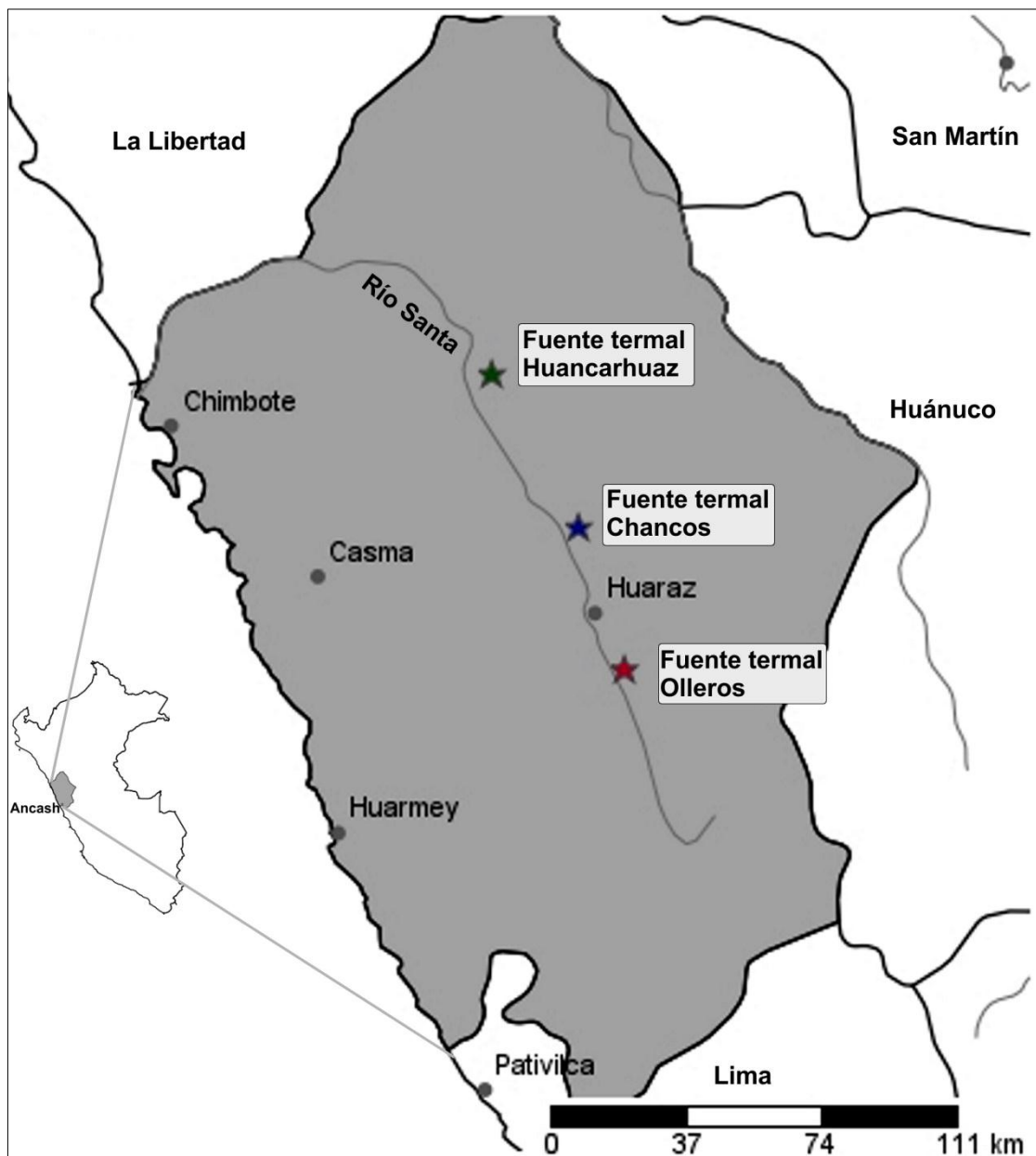


Fig. 23: Mapa de Ubicación de las Fuentes Termales de Chancos, Olleros y Huancahuaz

ANEXO 02: DIÁMETROS DE LOS HALOS DE HIDROLISIS SOBRE CMC Y XILANO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

	Cepa	Endoglucanasa (mm)	Xilanasa (mm)
Olleros	<i>B. subtilis</i> DO1	30,00 ± 1,41	2,00 ± 0,00
	<i>B. licheniformis</i> DO2	9,00 ± 1,41	1,75 ± 0,35
	<i>B. subtilis</i> DO6	39,00 ± 1,41	2,00 ± 0,00
	<i>B. licheniformis</i> EOC1	1,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> EOP2	6,00 ± 1,41	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> EOP3	2,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> IOPC2	1,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
Huancarhuaz	<i>B. licheniformis</i> EHB1	14,00 ± 1,41	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> EHB2	14,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> EHB3	19,5 ± 0,71	2,00 ± 0,00
	<i>B. licheniformis</i> EHC2	8,00 ± 1,41	2,00 ± 0,00
	<i>B. licheniformis</i> EHC3	8,50 ± 0,71	2,00 ± 0,00
	<i>B. licheniformis</i> IHB1	6,00 ± 1,41	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> IHB2	6,50 ± 0,71	2,00 ± 0,00
	<i>C. laeviribosi</i> EHB4	2,00 ± 0,00	2,25 ± 0,35
Chancos	<i>B. licheniformis</i> DCH1 (4)	1,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> DCH2(42)	10,00 ± 0,00	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> DCH3(18)	30,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
	<i>B. subtilis</i> DCH4 (52)	10,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> DCH5(28)	9,00 ± 1,41	2,00 ± 0,00
	<i>B. licheniformis</i> ECHC4 (25)	10,00 ± 1,41	1,75 ± 0,35
	<i>B. subtilis</i> ICHB1 (35)	19,00 ± 1,41	2,25 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> ICHB3 (45)	17,50 ± 2,12	2,00 ± 0,00
	<i>B. licheniformis</i> ICHB4 (32)	6,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> ICHB5 (63)	12,00 ± 1,41	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> ICHB6 (3)	9,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> ICHB7 (9)	4,00 ± 1,41	1,75 ± 0,35
	<i>B. licheniformis</i> ICHP1 (27)	1,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35

ANEXO 03: FOTOGRAFIAS DE ALGUNOS HALOS DE HIDROLISIS SOBRE CMC

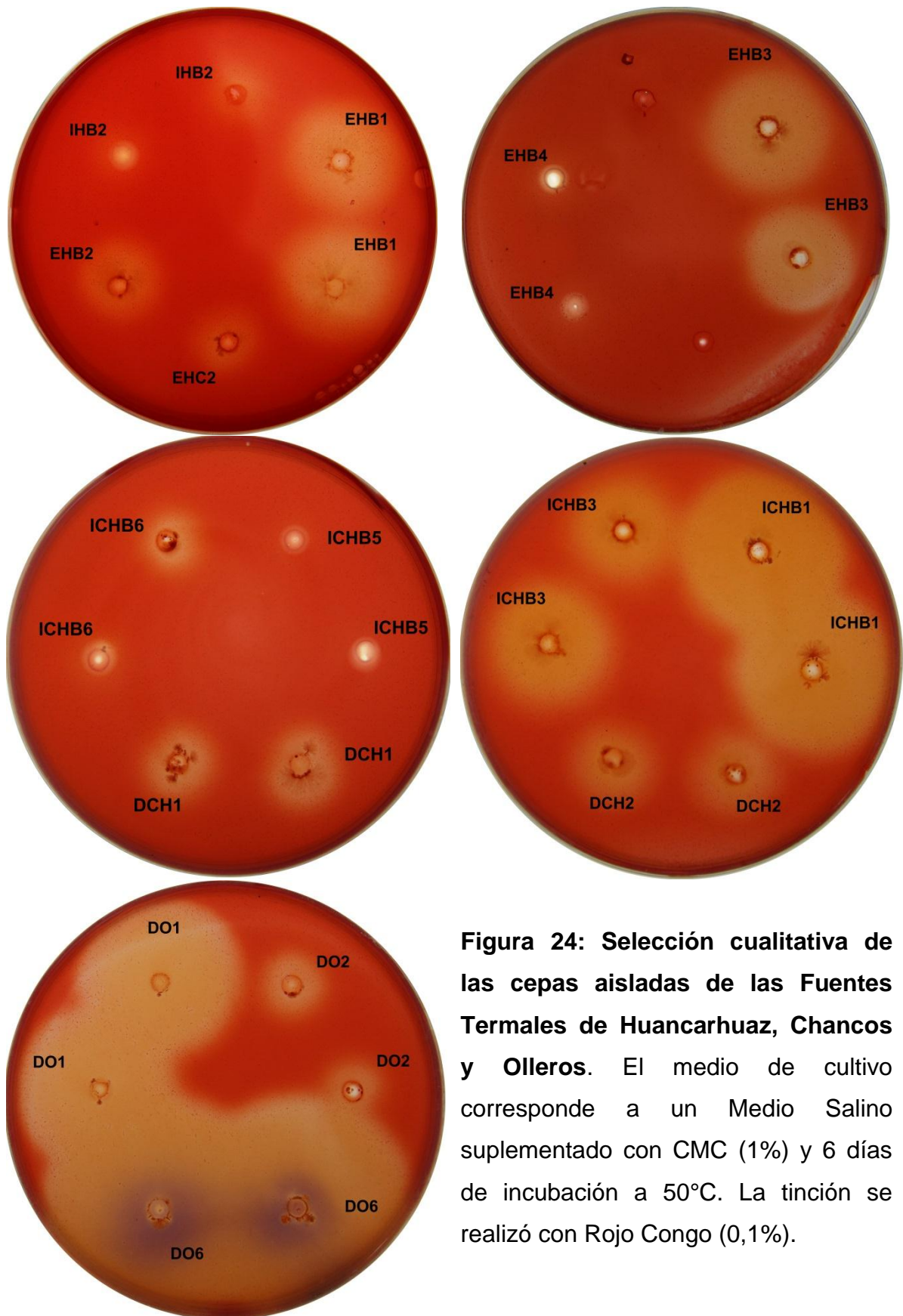


Figura 24: Selección cualitativa de las cepas aisladas de las Fuentes Termales de Huancarhuaz, Chancos y Olleros. El medio de cultivo corresponde a un Medio Salino suplementado con CMC (1%) y 6 días de incubación a 50°C. La tinción se realizó con Rojo Congo (0,1%).

ANEXO 04: MICROFOTOGRAFÍAS DE ALGUNAS CEPAS SELECCIONADAS

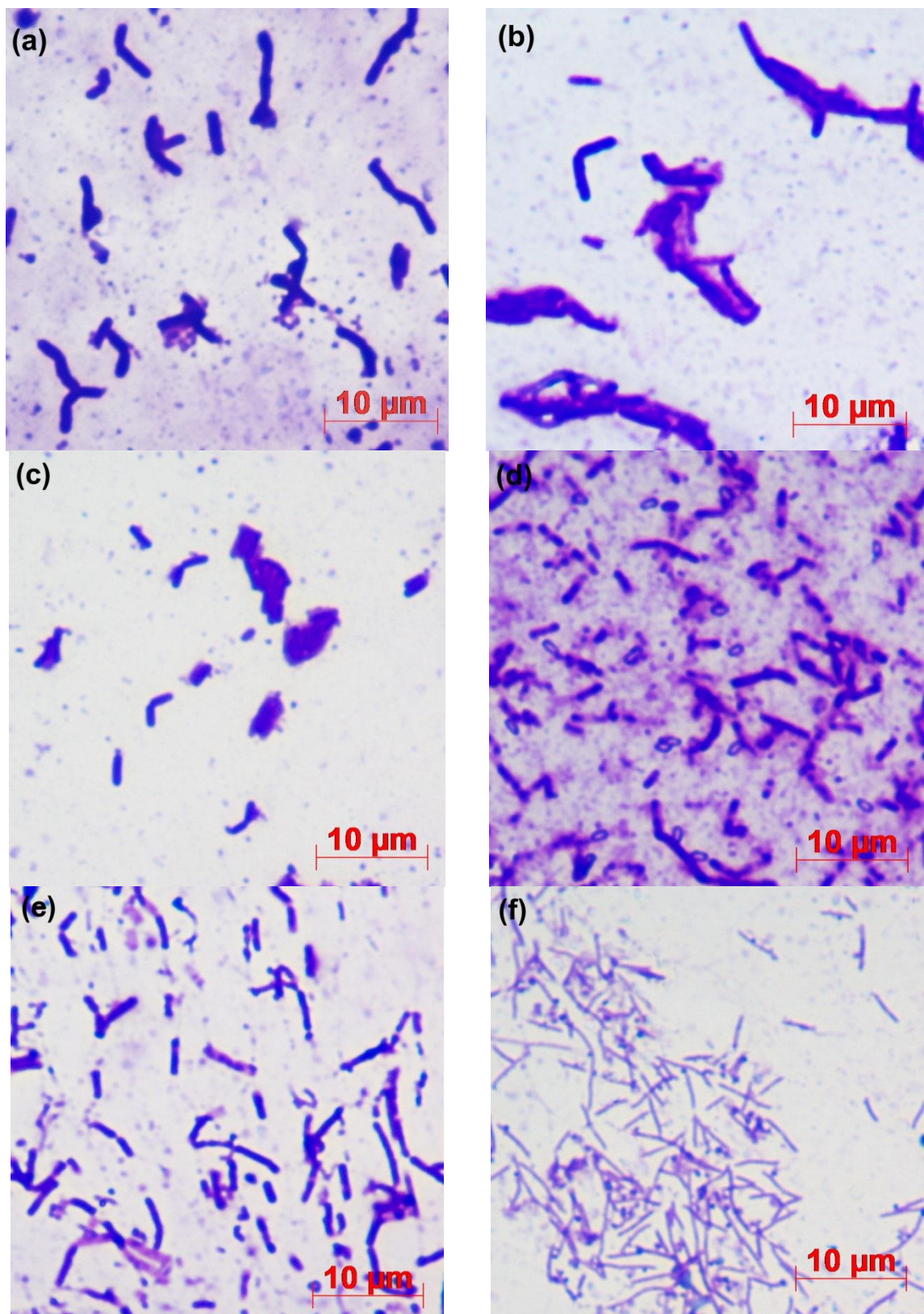


Fig. 25: Microfotografía en luz blanca a 1000X, y coloración Gram de las cepas: (a) *B. licheniformis* DCH3, (b) *B. subtilis* ICHB1, (c) *B. licheniformis* DCH2, (d) *B. licheniformis* EHB1, (e) *B. subtilis* DO6 y (f) *C. laeviribosi* EHB4

ANEXO 05: FOTOGRAFÍAS DE LOS GELES DE ELECTROFORESIS DE DNA

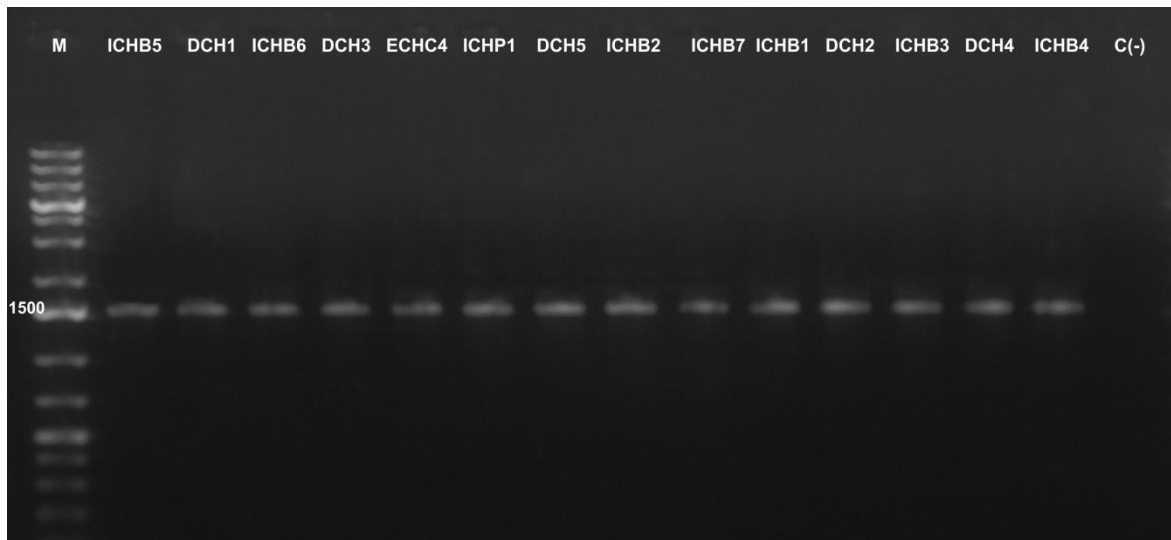


Fig. 26: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la fuente termal de Chancos. M, corresponde al marcador de peso molecular y C(-) al control negativo

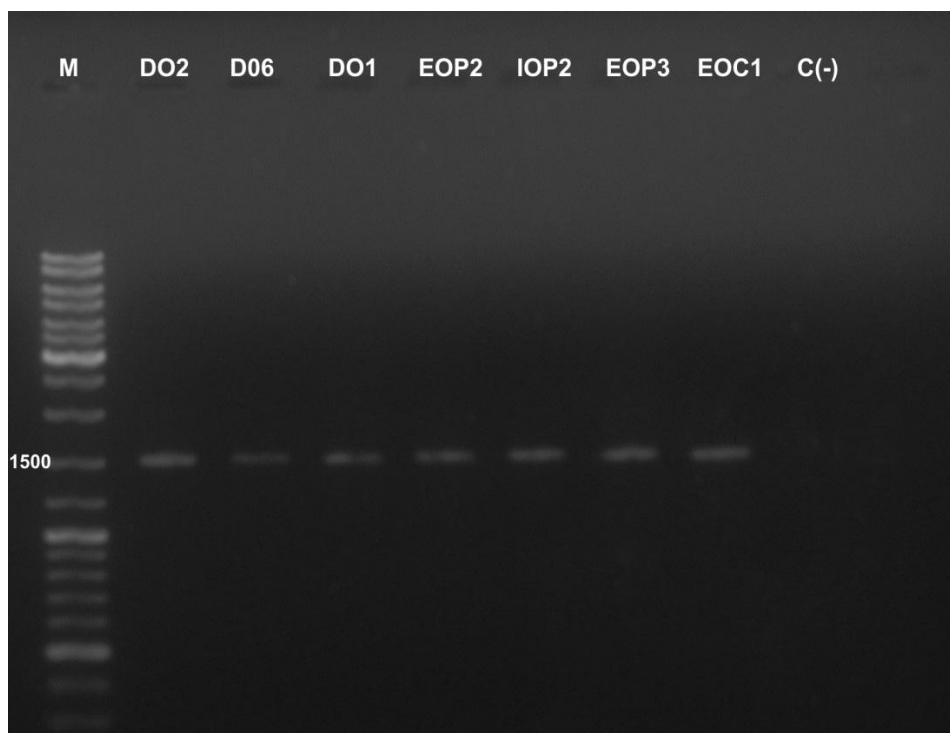


Fig. 27: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la fuente termal de Olleros. M, corresponde al marcador de peso molecular y C(-) al control negativo

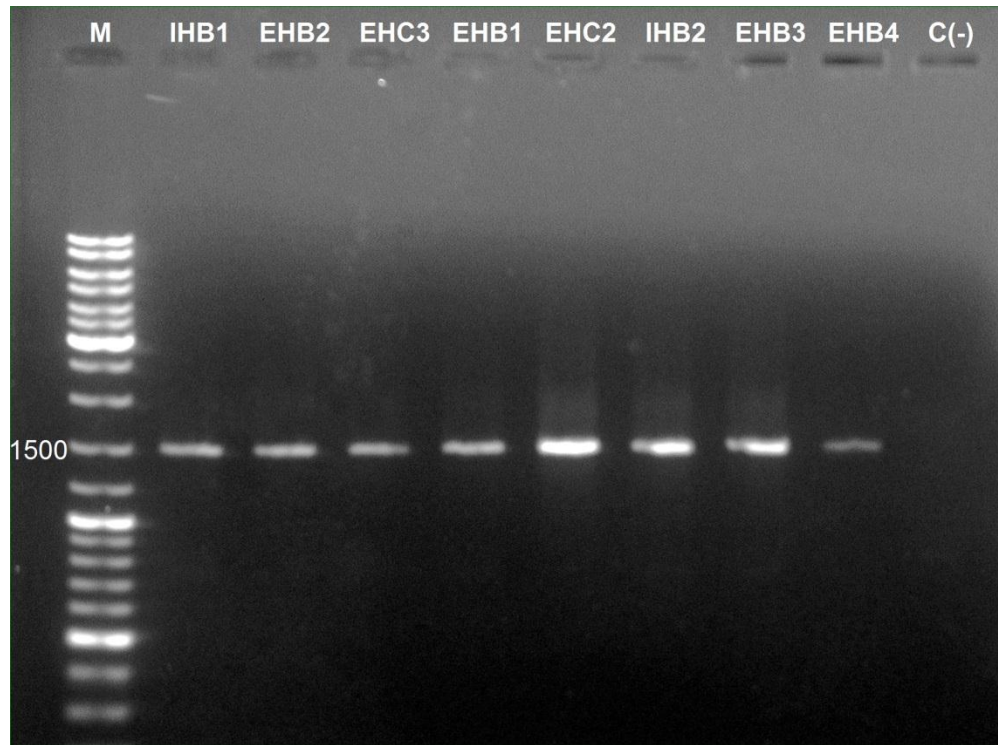


Fig. 28: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la fuente termal de Huancarhuaz. M, corresponde al marcador de peso molecular y C(-) al control negativo

ANEXO 06: CURVA ESTANDAR DE AZÚCARES REDUCTORES

Se elaboraron las curvas estándares para glucosa y xilosa, las cuales se utilizaron para calcular la concentración de los azúcares reductores provenientes de la hidrólisis de CMC - Papel filtro y xilano, respectivamente.

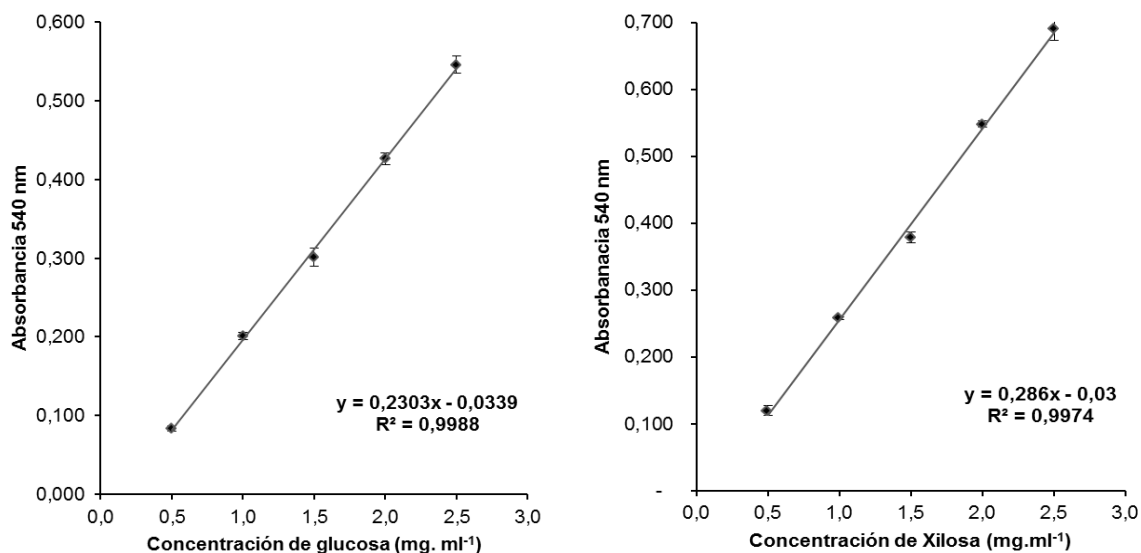


Figura 29: Curvas estándar de glucosa a la izquierda y de xilosa a la derecha, elaborada con el método de DNS para microplaca (King et al., 2009). Los valores corresponden al promedio de 8 repeticiones \pm DS.

Preparación de soluciones de glucosa o xilano de varias concentraciones para la curva estándar, para microplaca de titulación

Reactivos	Batería de tubos, volumen en μ l					
	BR	1	2	3	4	5
Estándar de azúcar a 3mg/ml	0	15	30	45	60	75
Buffer Fosfato 50mM pH 6*	180	165	150	135	120	105
Concentración mg/ml	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5

Retirar 60 μ l de cada concentración y colocarlo en una microplaca de PCR de 96 pozos

Agregar 120 μ l de DNS en cada hoyo, tapar y colocar en un baño María a 92°C x 10 min.

Retirar y colocar sobre agua helada, retirar y colocar 36 μ l a una placa de microtitulación de 96 hoyos, transparente y de fondo plano que contiene 160 μ l de agua por hoyo. Mezclar bien y leer por duplicado a 540nm.

ANEXO 07: PROTOCOLO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MINIATURIZADO PARA 96 POZOS

El siguiente protocolo se hizo de acuerdo a King et al. (2009) con algunas modificaciones:

	Blanco DNS (μ l)	Blanco Sustrato (μ l)	Blanco de muestra (μ l)	Muestra (μ l)
Buffer*	180	90	90	-
Sustrato	-	90	-	90
Extracto	-	-	90	90
(t), Incubar a 50°C ** por 2h (CMC y Xilano), ó 20 h (Papel Filtro)				
Reacción de coloración DNS				
Prod. Incubación	60	60	90	60
DNS	120	120	120	120
(t), Incubar a 92°C por 10 minutos				
Para la lectura a 540nm ***				
Reacción de DNS	36	36	36	36
Agua	160	160	160	160
Leer a 540nm de longitud de onda				
Resultados	Abs. 0,000	ABS	ABM	AMT

*, el pH y la composición del buffer dependerá de las condiciones a las que se desee evaluar la actividad enzimática

** , la temperatura puede variar de acuerdo a las condiciones a las que se desee evaluar la actividad enzimática

***, usa microplaca de titulación transparente de fondo plano

(t), indica que los microtubos o placas de PCR que contienen la reacción deben ser tapados herméticamente.

ANEXO 08: CÁLCULOS PARA LA CONVERSIÓN A UNIDADES ENZIMÁTICAS

Para calcular la concentración de los azúcares reductores producidos, se debe calcular la absorbancia neta de la muestra (AMN):

$$AMN = AMB - (ABM+ABS)..... (1)$$

De acuerdo a las curvas del Anexo 02:

$$[Glucosa]= (y + 0.0339) /0.2303)mg/ml..... (2)$$

$$[Xilosa]= (y+ 0.03 /0.286) mg/ml..... (3)$$

Para una muestra desconocida X, se reemplaza (1) en (2) y (3) y expresándolo en $\mu\text{g/ml}$:

$$[X \text{ glu}] = (AMN + 0.0339) /0.2303) \times 1000 \mu\text{g/ml} (4)$$

$$[X \text{ xil}] = (AMN+ 0.03 /0.286) \times 1000 \mu\text{g/ml} (5)$$

Cálculo de las Unidades Enzimáticas

Las unidades enzimáticas se definen como el número de micromoles (μM) de glucosa o xilosa que produce 1ml de enzima (en este caso extracto) por minuto a las condiciones de ensayo determinadas (pH y T°).

Cálculo de Unidades Enzimáticas

$$U = \# \mu\text{M} / t \text{ min}(6)$$

$$\mu\text{M} = X \mu\text{g} / \text{PM (glucosa o xilano)}..... (7)$$

Reemplazando (7) en (6)

$$U = X \mu\text{g} / (\text{PM} \times t \text{ min})(8)$$

Cálculo de Unidades Enzimáticas/ml

Como el volumen de muestra en la reacción es 90µl, para expresarlo por 1ml se realiza una regla de tres simple para obtener:

$$U/ml = U \times 1/0,09 \text{ ml} \dots\dots\dots(9)$$

Reemplazando (8) en (9)

$$U/ml = X\mu\text{g} \times 11,1 / (\text{PM} \times t \text{ min}) \dots\dots(10)$$

De acuerdo a la fórmula (10), el tiempo para endoglucanasa (CMSasa) y Xilanasasa es de 120 min., mientras que para Celulasa total (PFasa) es de 1200min., además reemplazando los Pesos moleculares (PM) de los respectivos azúcares se tiene las siguientes fórmulas:

$$\text{Endoglucanasa (U/ml)} = X\mu\text{g} \times 0.001\dots\dots (11)$$

$$\text{Xilanasasa (U/ml)} = X\mu\text{g} \times 0.00062\dots\dots\dots (12)$$

$$\text{PFasa} = X\mu\text{g} \times 0.000051\dots\dots\dots(13)$$

ANEXO 09: CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA

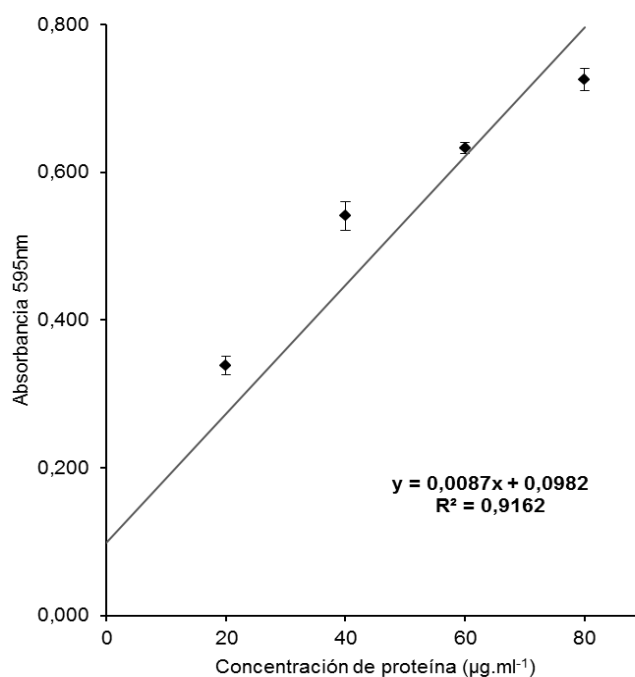


Figura 30: Curva estándar para proteínas totales de acuerdo a la metodología de Bradford y usando BSA. Los valores representan el promedio de 8 repeticiones \pm la D.S.

Preparación de varias concentraciones de proteína estándar (BSA) para la elaboración de la curva estándar, usando microplaca microtitulación.

Reactivos	Batería de tubos, volumen en μ l					
	BR	1	2	3	4	M
Estándar de BSA 200 μ g/ml	0	15	30	45	60	150*
Solución salina 0,8%	150	135	120	105	90	0
Concentración	0	20	40	60	80	¿?

Agregar 150 μ l de reactivo de Bradford

Agitar suavemente y dejar en oscuridad por 10min. y leer a 595nm por duplicado

Para la absorbancia neta se resta la Abs (1-M) menos la Abs. BR

M, Muestra con concentración desconocido

*, corresponde al volumen de la muestra y no del estándar

ANEXO 10: PROTEÍNA EXTRACELULAR

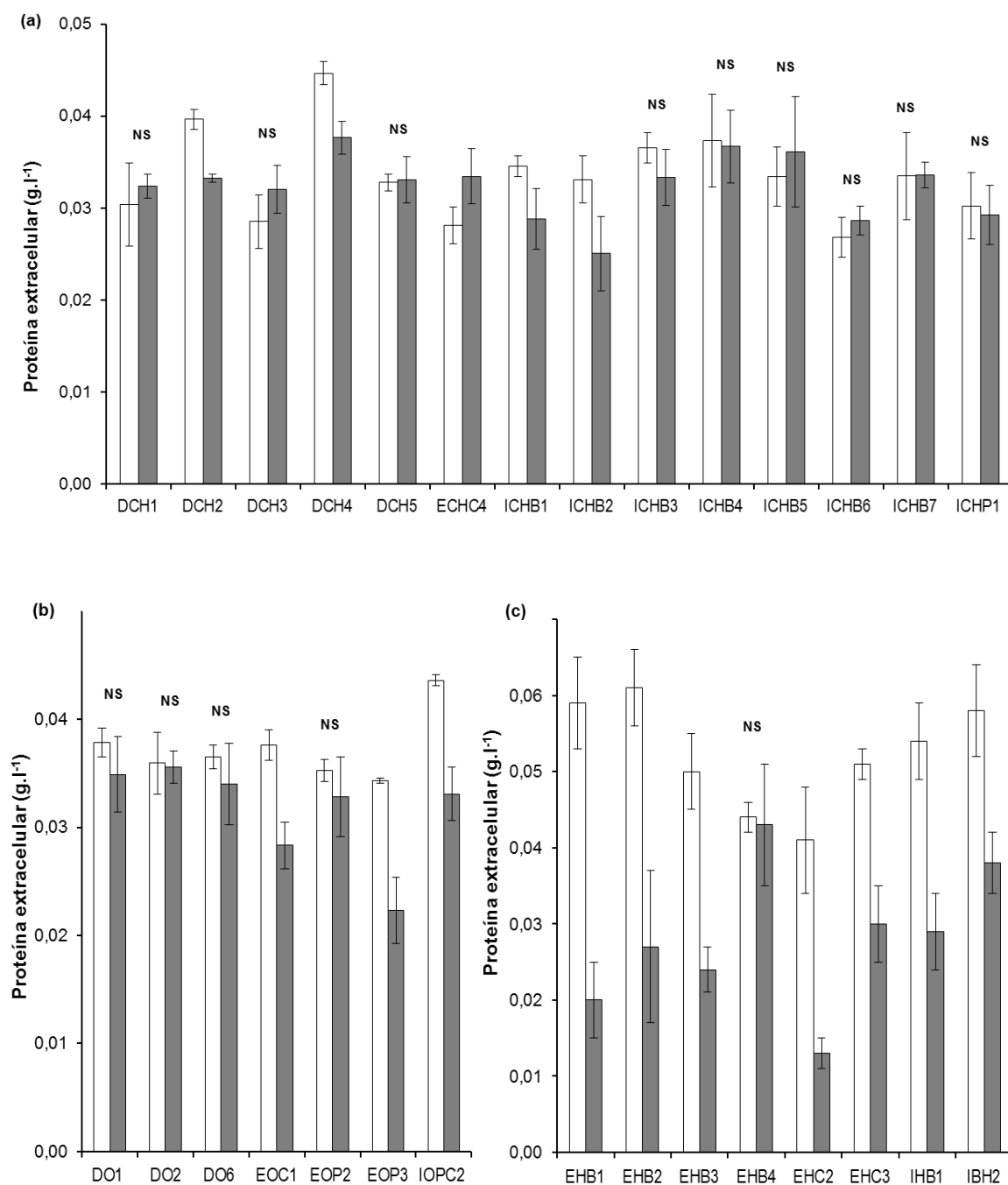


Figura 31: Proteína extracelular total obtenido en cultivos en LB-Xilano en barras blancas y LB-CMC en barras negras, cuantificadas de acuerdo a Bradford (1976). (a) 14 cepas seleccionadas de Chancos, (b) siete cepas de Olleros y (c) ocho cepas de Huancarhuaz, Perú. Los valores son las medias de seis replicas \pm SD. NS, no hay diferencias significativas mediante la prueba T-student a un nivel de confianza de 99%

ANEXO 11: EVALUACIÓN DE VELOCIDAD DE CRECIMIENTO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

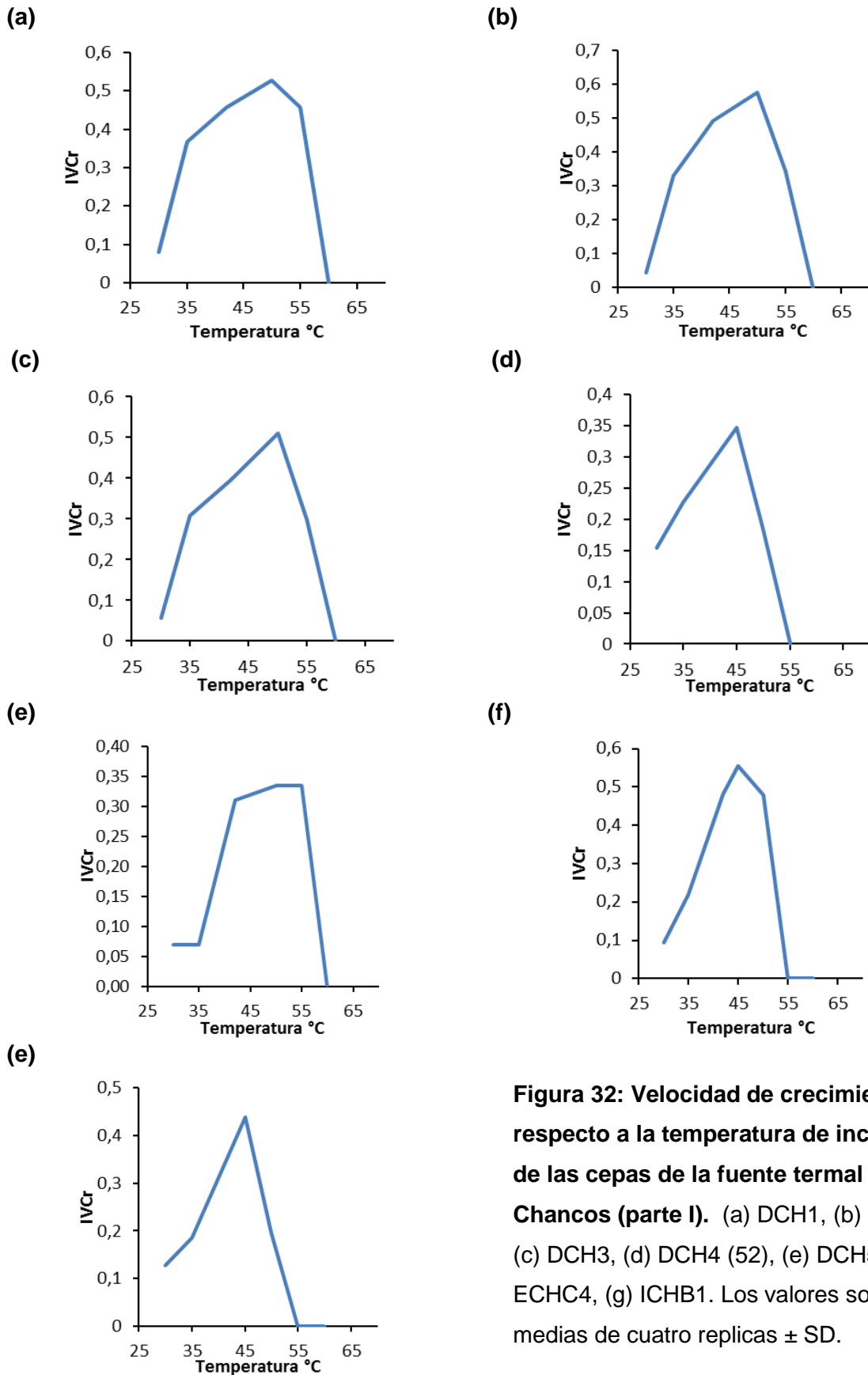
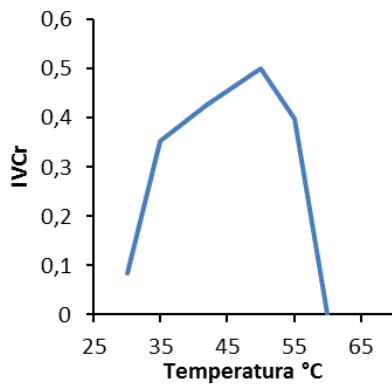
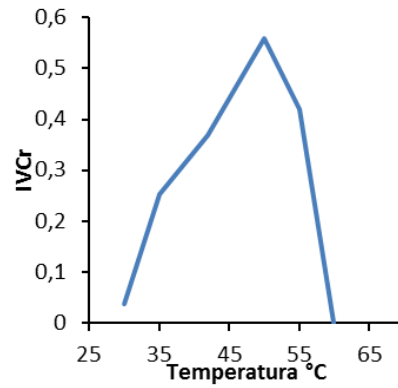


Figura 32: Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal de Chancos (parte I). (a) DCH1, (b) DCH2, (c) DCH3, (d) DCH4 (52), (e) DCH5, (f) ECHC4, (g) ICHB1. Los valores son las medias de cuatro replicas \pm SD.

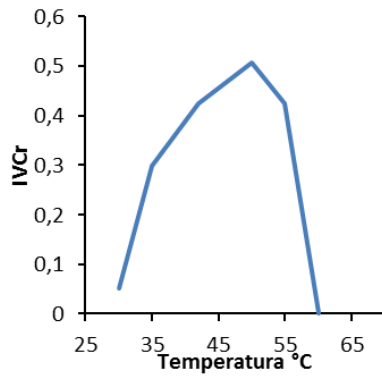
(h)



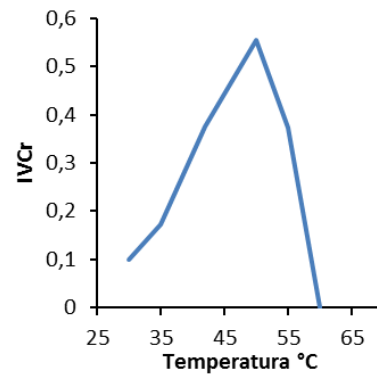
(i)



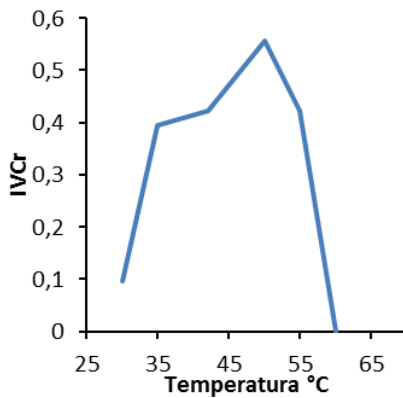
(j)



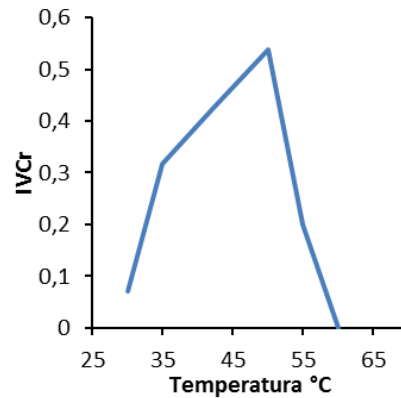
(k)



(l)



(m)



(n)

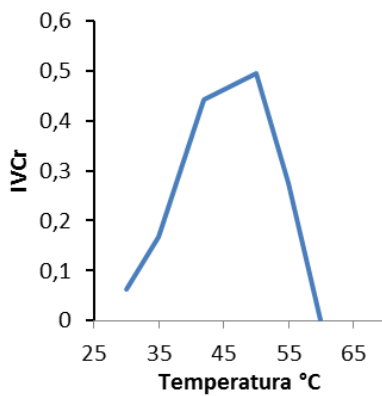
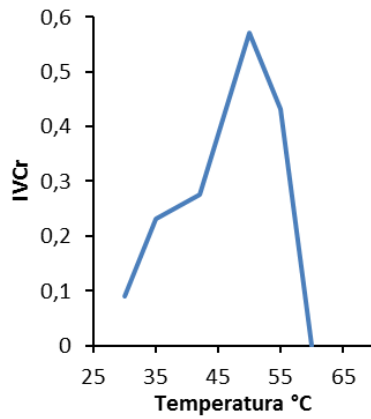
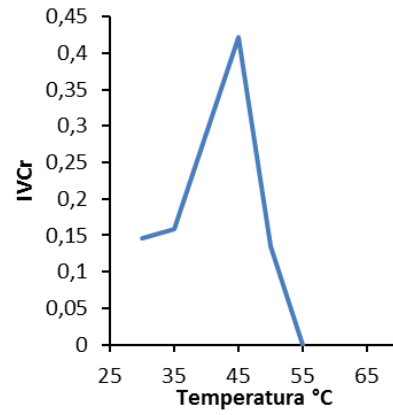


Figura 33: Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal de Chancos (parte II): (h) ICHB2, (i) ICHB3, (j) ICHB7, (k) ICHB4, (l) ICHB5, (m) ICHB6, (n) ICHP1. Los valores son las medias de cuatro replicas \pm SD

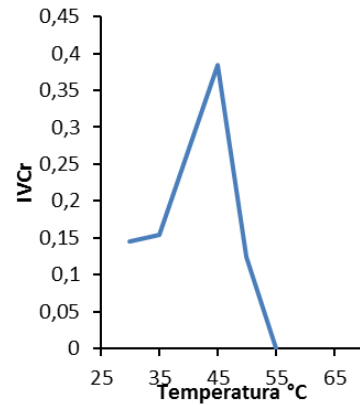
(a)



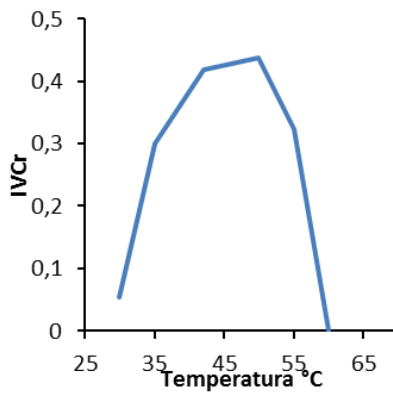
(b)



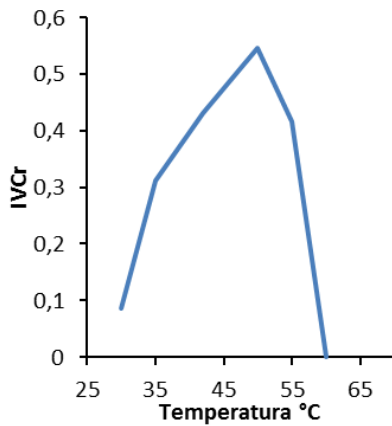
(c)



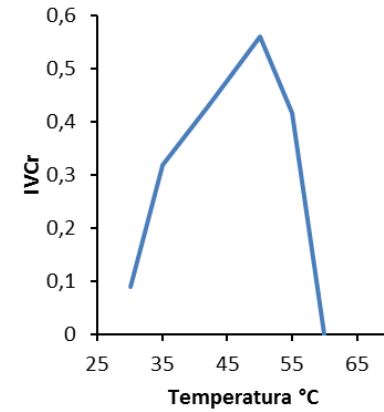
(d)



(e)



(f)



(g)

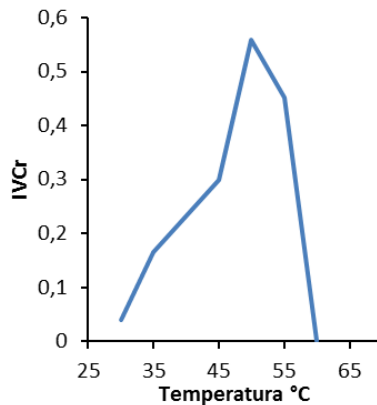


Figura 34: Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal de Olleros: (a) DO2, (b) DO1, (c) DO6, (d) EOC1, (e) EOP2, (f) EOP3, (g) IOPC2. Los valores son las medias de cuatro replicas \pm SD

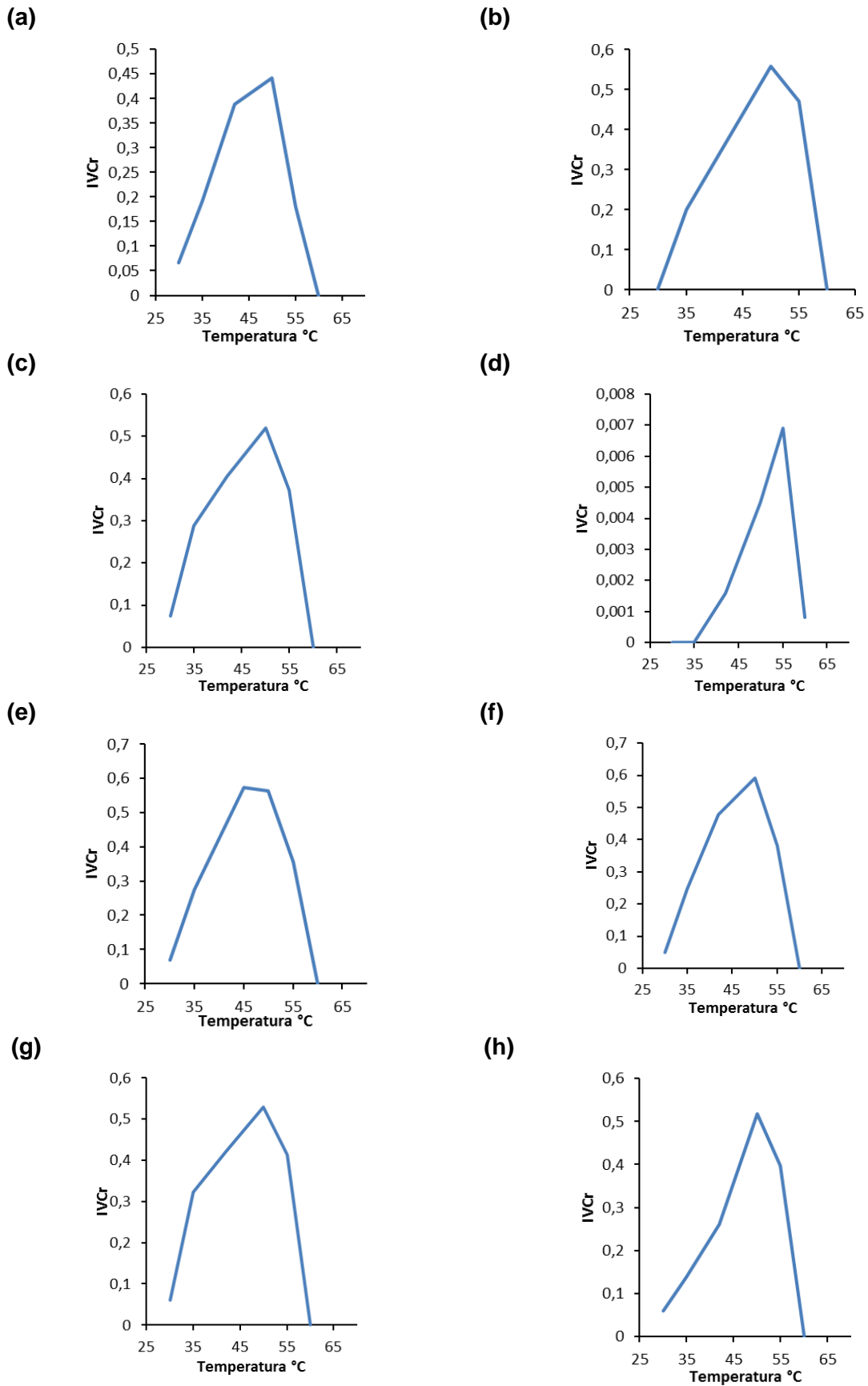


Figura 35: Velocidad de crecimiento con respecto a la temperatura de incubación de las cepas de la fuente termal de Huancarhuaz. (a) EHB1, (b) EHB2, (c) EHB3, (d) EHB4, (e) EHC2, (f) EHC3, (g) IHB2. Los valores son las medias de cuatro replicas \pm SD.

**ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA,
ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y PRODUCTIVIDAD**

**12.1. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DE LAS
CEPAS DE LA FUENTE TERMAL OLLEROS – MEDIO DE CULTIVO LB-
CMC**

(a)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
DO2	6	0,00		
DO1	6	0,00		
IOPC2	6	0,00		
EOP3	6	0,00		
EOC1	6	0,00		
EOP2	6		203,50	
DO6	6			411,20
Sig.		1,000	1,000	1,000

(b)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
DO2	6	0,000		
DO1	6	0,000		
IOPC2	6	0,000		
EOP3	6	0,000		
EOC1	6	0,000		
EOP2	6		10,175	
DO6	6			20,560
Sig.		1,000	1,000	1,000

(c)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
DO2	6	0		
DO1	6	0		
IOPC2	6	0		
EOP3	6	0		
EOC1	6	0		
EOP2	6		6190	
DO6	6			12084
Sig.		1,00	1,00	1,00

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica.

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.2. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DE LAS CEPAS DE LA FUENTE TERMAL OLLEROS – MEDIO DE CULTIVO LB-XIL

(a)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
IOPC2	6	0				
EOP3	6	0				
EOC1	6	0				
DO2	6		154			
EOP2	6			180		
DO1	6				206	
DO6	6					676
Sig.		1	1	1	1	1

(b)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
IOPC2	6	0,00				
EOP3	6	0,00				
EOC1	6	0,00				
DO2	6		7,68			
EOP2	6			9,02		
DO1	6				10,32	
DO6	6					33,80
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

(c)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1(d)	2(c)	3 (b)	4 (a)
IOPC2	6	0			
EOP3	6	0			
EOC1	6	0			
DO2	6		4271		
EOP2	6			5116	
DO1	6			5449	
DO6	6				18502
Sig.		1,000	1,000	0,074	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.3. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD XILANASA DE LAS CEPAS DE LA FUENTE TERMAL OLLEROS – MEDIO DE CULTIVO LB-CMC

(a)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
EOP3	6	535,67		
EOC1	6	537,84		
DO2	6	542,17		
EOP2	6	558,80		
IOPC2	6	594,20	594,20	
DO1	6		645,87	
DO6	6			1677,40
Sig.		,011	,014	1,000

(b)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
EOP3	6	26,783		
EOC1	6	26,892		
DO2	6	27,109		
EOP2	6	27,940		
IOPC2	6	29,710	29,710	
DO1	6		32,293	
DO6	6			83,870
Sig.		,011	,014	1,000

(c)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
EOC1	6	15011				
DO2	6	15229	15229			
EOP2	6		16996	16996		
IOPC2	6			17945		
DO1	6			18496		
EOP3	6				23980	
DO6	6					49294
Sig.		,741	,011	,036	1,000	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.4. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD XILANASA DE LAS CEPAS DE LA FUENTE TERMAL OLLEROS – MEDIO DE CULTIVO LB-XIL

(a)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
EOP2	6	495,93		
EOC1	6	521,58	521,58	
DO2	6	538,20	538,20	
EOP3	6	547,23	547,23	
IOPC2	6		590,23	
DO1	6		601,79	
DO6	6			883,25
Sig.		0,12	0,02	1,00

(b)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
EOP2	6	24,796		
EOC1	6	26,079	26,079	
DO2	6	26,910	26,910	
EOP3	6	27,362	27,362	
IOPC2	6		29,511	
DO1	6		30,090	
DO6	6			44,162
Sig.		0,116	0,017	1,000

(c)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
IOPC2	6	13528		
EOC1	6	13847	13847	
EOP2	6	14069	14069	
DO2	6	14970	14970	
DO1	6		15888	
EOP3	6		15939	
DO6	6			24172
Sig.		0,087	0,016	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.5. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DE LAS CEPAS DE LA FUENTE TERMAL CHANCOS– MEDIO DE CULTIVO LB-CMC

(a)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
ICHB5	6	0,000		
DCH1	6	0,000		
ICHB6	6	0,000		
DCH3	6	0,000		
ECHC4	6	0,000		
ICHP1	6	0,000		
DCH5	6	0,000		
ICHB2	6	0,000		
ICHB7	6	0,000		
DCH2	6	0,000		
ICHB3	6	0,000		
ICHB4	6	0,000		
ICHB1	6		362,715	
DCH4	6			1093,646
Sig.		1,000	1,000	1,000

(b)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
ICHB5	6	0,000		
DCH1	6	0,000		
ICHB6	6	0,000		
DCH3	6	0,000		
ECHC4	6	0,000		
ICHP1	6	0,000		
DCH5	6	0,000		
ICHB2	6	0,000		
ICHB7	6	0,000		
DCH2	6	0,000		
ICHB3	6	0,000		
ICHB4	6	0,000		
ICHB1	6		18,136	
DCH4	6			54,682
Sig.		1,000	1,000	1,000

(c)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
ICHB5	6	0		
DCH1	6	0		
ICHB6	6	0		
DCH3	6	0		
ECHC4	6	0		
ICHP1	6	0		
DCH5	6	0		
ICHB2	6	0		
ICHB7	6	0		
DCH2	6	0		
ICHB3	6	0		
ICHB4	6	0		
ICHB1	6		12577	
DCH4	6			29053
Sig.		1,000	1,000	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.6. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DE LAS CEPAS DE LA UENTE TERMAL CHANCOS – MEDIO DE CULTIVO LBXIL

(a)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1(d)	2(c)	3 (b)	4 (a)
ICHB5	6	0,00			
DCH1	6	0,00			
ICHB6	6	0,00			
DCH3	6	0,00			
ICHP1	6	0,00			
DCH5	6	0,00			
ICHB7	6	0,00			
ICHB4	6	0,00			
ICHB2	6		157,19		
DCH2	6		160,08		
ECHC4	6		160,80		
ICHB3	6		173,83		
ICHB1	6			571,86	
DCH4	6				1252,13
Sig.		1,000	,571	1,000	1,000

(b)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1(d)	2(c)	3 (b)	4 (a)
ICHB5	6	0,000			
DCH1	6	0,000			
ICHB6	6	0,000			
DCH3	6	0,000			
ICHP1	6	0,000			
DCH5	6	0,000			
ICHB7	6	0,000			
ICHB4	6	0,000			
ICHB2	6		7,859		
DCH2	6		8,004		
ECHC4	6		8,040		
ICHB3	6		8,692		
ICHB1	6			28,593	
DCH4	6				62,607
Sig.		1,000	,571	1,000	1,000

(c)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1(d)	2(c)	3 (b)	4 (a)
ICHB5	6	0			
DCH1	6	0			
ICHB6	6	0			
DCH3	6	0			
ICHP1	6	0			
DCH5	6	0			
ICHB7	6	0			
ICHB4	6	0			
DCH2	6		4038		
ICHB2	6		4747		
ICHB3	6		4757		
ECHC4	6		5720		
ICHB1	6			16566	
DCH4	6				28051
Sig.		1,000	,018	1,000	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.7. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD XILANASA DE LAS CEPAS DE LA FUENTE TERMAL CHANCOS – MEDIO DE CULTIVO LB-CMC

(a)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
DCH5	6	536,7552				
ECHC4	6	538,5618				
ICHB2	6	551,9301	551,9301			
ICHB4	6	559,5175	559,5175	559,5175		
ICHB5	6	559,8788	559,8788	559,8788		
ICHP1	6	562,4079	562,4079	562,4079		
DCH3	6	579,0280	579,0280	579,0280		
DCH1	6	584,0862	584,0862	584,0862		
ICHB6	6	601,7902	601,7902	601,7902		
ICHB7	6	607,9324	607,9324	607,9324		
ICHB3	6		621,6620	621,6620		
DCH2	6			640,4499		
ICHB1	6				957,6760	
DCH4	6					2396,0326
Sig.		,027	,029	,011	1,000	1,000

(b)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
DCH5	6	26,8378				
ECHC4	6	26,9282				
ICHB2	6	27,5963	27,5963			
ICHB4	6	27,9760	27,9760	27,9760		
ICHB5	6	27,9940	27,9940	27,9940		
ICHP1	6	28,1203	28,1203	28,1203		
DCH3	6	28,9513	28,9513	28,9513		
DCH1	6	29,2043	29,2043	29,2043		
ICHB6	6	30,0897	30,0897	30,0897		
ICHB7	6	30,3967	30,3967	30,3967		
ICHB3	6		31,0832	31,0832		
DCH2	6			32,0225		
ICHB1	6				47,8838	
DCH4	6					119,8017
Sig.		,027	,029	,011	1,000	1,000

(c)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01						
		1 (g)	2 (f)	3 (e)	4 (d)	5 (c)	6 (b)	7 (a)
ICHB4	6	15481,3333						
ECHC4	6	16093,3333	16093,3333					
DCH5	6	16233,1667	16233,1667					
ICHB7	6	16563,0000	16563,0000	16563,0000				
ICHB6	6		17920,1667	17920,1667	17920,1667			
DCH1	6		18035,6667	18035,6667	18035,6667			
DCH3	6		18089,3333	18089,3333	18089,3333			
ICHB3	6			18668,0000	18668,0000			
ICHP1	6				19219,1667			
DCH2	6				19273,5000			
ICHB5	6				19524,1667			
ICHB2	6					22023,5000		
ICHB1	6						33206,0000	
DCH4	6							63651,1667
Sig.		,202	,022	,014	,072	1,000	1,000	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. MSe muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.8. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD XILANASA LAS CEPAS FUENTE TERMAL CHANCOS – MEDIO DE CULTIVO LB-XIL

(a)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
ICHB2	6	482,921		
DCH3	6	487,979		
DCH1	6	489,424		
ICHB4	6	491,231		
DCH5	6	493,760		
ICHP1	6	497,373		
ICHB5	6	497,734		
ECHC4	6	500,625		
DCH2	6	507,851		
ICHB3	6	517,606		
ICHB6	6	518,329		
ICHB7	6	529,529		
ICHB1	6		1381,126	
DCH4	6			2168,049
Sig.		,198	1,000	1,000

(b)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
ICHB2	6	24,1460		
DCH3	6	24,3987		
DCH1	6	24,4715		
ICHB4	6	24,5615		
DCH5	6	24,6880		
ICHP1	6	24,8688		
ICHB5	6	24,8868		
ECHC4	6	25,0313		
DCH2	6	25,3923		
ICHB3	6	25,8802		
ICHB6	6	25,9163		
ICHB7	6	26,4763		
ICHB1	6		69,0562	
DCH4	6			108,4023
Sig.		,198	1,000	1,000

(c)

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0.01						
		1 (g)	2 (f)	3 (e)	4 (d)	5 (c)	6 (b)	7 (a)
DCH2	6	12812,0000						
ICHB3	6	14165,5000	14165,5000					
ICHB7	6	14182,0000	14182,0000					
ICHB2	6	14584,3333	14584,3333					
ICHB4	6	14689,5000	14689,5000					
DCH5	6	15061,0000	15061,0000	15061,0000				
ICHB6	6		15478,0000	15478,0000				
DCH1	6		16130,0000	16130,0000	16130,0000			
ICHP1	6		16442,6667	16442,6667	16442,6667	16442,6667		
DCH3	6			17101,0000	17101,0000	17101,0000		
ECHC4	6				17807,8333	17807,8333		
ICHB5	6					18557,1667		
ICHB1	6						40008,0000	
DCH4	6							48569,0000
Sig.		,014	,015	,024	,058	,017	1,000	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.9. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DE LAS CEPAS HUANCARHUAZ– MEDIO DE CULTIVO LB-CMC

(a)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
IHB1	6	0		
EHB2	6	0		
EHC3	6	0		
EHB1	6	0		
EHC2	6	0		
EHB4	6		167	
EHB3	6		170	
IHB2	6			194
Sig.		1,000	,315	1,000

(b)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
IHB1	6	0,00		
EHB2	6	0,00		
EHC3	6	0,00		
EHB1	6	0,00		
EHC2	6	0,00		
EHB4	6		8,37	
EHB3	6		8,52	
IHB2	6			9,71
Sig.		1,000	,321	1,000

(c)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1(d)	2(c)	3 (b)	4 (a)
IHB1	6	0			
EHB2	6	0			
EHC3	6	0			
EHB1	6	0			
EHC2	6	0			
EHB4	6		3894		
EHB3	6			5112	
IHB2	6				7098
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.10. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DE LAS CEPAS DE LA F. T. HUANCARHUAZ – MEDIO DE CULTIVO LBXIL

(a)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
IHB2	6	0				
EHB3	6	0				
EHC2	6		167			
EHC3	6		172	172		
EHB2	6			185		
IHB1	6				225	
EHB1	6				238	
EHB4	6					393
Sig.		1,000	,426	,045	,035	1,000

(b)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
IHB2	6	0,00				
EHB3	6	0,00				
EHC2	6		8,34			
EHC3	6		8,59	8,59		
EHB2	6			9,24		
IHB1	6				11,23	
EHB1	6				11,92	
EHB4	6					19,63
Sig.		1,000	,432	,045	,035	1,000

(c)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1(d)	2(c)	3 (b)	4 (a)
IHB2	6	0			
EHB3	6	0			
EHB2	6		3030		
EHC3	6		3369		
EHB1	6			4040	
EHC2	6			4067	
IHB1	6			4160	
EHB4	6				8921
Sig.		1,000	,012	,388	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica.

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.11. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD XILANASA DE LAS CEPAS DE LA FUENTE TERMAL HUANCARHUAZ – MEDIO DE CULTIVO LBCMC

(a)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
EHC3	6	549		
EHB2	6	557		
IHB1	6	562	562	
EHB1	6	573	573	573
EHC2	6	575	575	575
EHB3	6		599	599
EHB4	6		600	600
IHB2	6			608
Sig.		,098	,015	,027

(b)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1 (c)	2 (b)	3 (a)
EHC3	6	27,462		
EHB2	6	27,873		
IHB1	6	28,110	28,110	
EHB1	6	28,672	28,672	28,672
EHC2	6	28,743	28,743	28,743
EHB3	6		29,935	29,935
EHB4	6		30,005	30,005
IHB2	6			30,387
Sig.		,098	,015	,027

(c)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01						
		1 (g)	2(f)	3(e)	4(d)	5(c)	6(b)	7(a)
EHB4	6	13956						
IHB2	6		15993					
EHC3	6			18306				
IHB1	6			19386	19386			
EHB2	6				20648			
EHB3	6					24945		
EHB1	6						28670	
EHC2	6							44218
Sig.		1,000	1,000	,036	,015	1,000	1,000	1,000

(a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica. Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.12. ANÁLISIS DUNCAN PARA ACTIVIDAD XILANASA FUENTE TERMAL HUANCARHUAZ – MEDIO DE CULTIVO LB-XIL

(a)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
EHC2	6	443				
EHB1	6		476			
EHC3	6		479	479		
EHB3	6		489	489	489	
IHB1	6		501	501	501	
EHB2	6			507	507	
IHB2	6				517	
EHB4	6					651,7950
Sig.		1,000	,024	,012	,015	1,000

(b)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
EHC2	6	22,17				
EHB1	6		23,79			
EHC3	6		23,96	23,96		
EHB3	6		24,46	24,46	24,46	
IHB1	6		25,06	25,06	25,06	
EHB2	6			25,37	25,37	
IHB2	6				25,83	
EHB4	6					32,59
Sig.		1,000	,024	,012	,015	1,000

(c)

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
EHB1	6	8065				
EHB2	6	8316				
IHB2	6		8908			
IHB1	6		9280	9280		
EHC3	6		9394	9394		
EHB3	6			9784		
EHC2	6				10813	
EHB4	6					14814
Sig.		,221	,027	,022	1,000	1,000

a) Actividad enzimática, (b) Productividad enzimática y (c) Actividad Enzimática específica.

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

12.13. COMPARACIÓN LAS ACTIVIDADES ENDOGLUNASAS Y XILANASAS DE CEPAS DCH4, DO1, DO6, EHB5, EOP2, EN MEDIOS LB-X Y LB-CMC

(a)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
eg	Inter-grupos	8106497	7	1158071	270,953	,000
	Intra-grupos	170963	40	4274		
	Total	8277459	47			
xylase	Inter-grupos	23859003	7	3408429	447,114	,000
	Intra-grupos	304927	40	7623		
	Total	24163930	47			

(b)

cepa	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
EOP2-LBCMC	6	203,667				
DO1-LBX	6	206,500				
DO6-LBCMC	6		411,167			
ICHB1-LBX	6			571,667		
EHB4-LBX	6			600,167		
DCH4-LBCMC	6				1093,667	
DCH4-LBX	6					1252,333
Sig.		,941	1,000	,455	1,000	1,000

(c)

cepa	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		1 (e)	2 (d)	3 (c)	4 (b)	5 (a)
EOP2-LBCMC	6	558,667				
DO1-LBX	6	601,667				
DO1-LBCMC	6	646,000				
EHB4-LBX	6	651,833				
ICHB1-LBX	6		1381,333			
DO6-LBCMC	6			1677,500		
DCH4-LBX	6				2168,000	
DCH4-LBCMC	6					2396,167
Sig.		,098	1,000	1,000	1,000	1,000

(a) ANOVA de un factor, (b) Duncan de actividad Endoglucanasa, (c) Duncan de actividad Xilanasas.

12.14. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACUERDO A LOS MEDIOS LB-CMC Y LB-XIL

Prueba T-student para muestras independientes de las actividades enzimáticas de las cepas de la Fuente Termal de Olleros

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	para la diferencia		
									Inferior	Superior	
Actividad enzimática xilanasa	DO2	Se han asumido varianzas iguales	3,418	,094	-.593	10	,566	-3,974	6,703	-25,218	17,270
		No se han asumido varianzas iguales			-.593	6,187	,574	-3,974	6,703	-28,520	20,571
	DO6	Se han asumido varianzas iguales	1,983	,189	-17,835	10	,000	-794,149	44,527	-935,268	-653,031
		No se han asumido varianzas iguales			-17,835	9,174	,000	-794,149	44,527	-938,163	-650,135
	DO1	Se han asumido varianzas iguales	4,545	,059	-1,742	10	,112	-44,079	25,307	-124,283	36,125
		No se han asumido varianzas iguales			-1,742	6,545	,128	-44,079	25,307	-134,779	46,621
	EOP2	Se han asumido varianzas iguales	3,925	,076	-4,877	10	,001	-62,867	12,890	-103,719	-22,015
		No se han asumido varianzas iguales			-4,877	6,906	,002	-62,867	12,890	-108,186	-17,548
	IOPC2	Se han asumido varianzas iguales	2,740	,129	-.114	10	,911	-3,974	34,737	-114,065	106,116
		No se han asumido varianzas iguales			-.114	7,150	,912	-3,974	34,737	-124,669	116,721
	EOP3	Se han asumido varianzas iguales	2,626	,136	1,042	10	,322	11,562	11,091	-23,590	46,713
		No se han asumido varianzas iguales			1,042	8,805	,325	11,562	11,091	-24,687	47,810
	EOC1	Se han asumido varianzas iguales	5,174	,046	-1,132	10	,284	-16,259	14,366	-61,789	29,271
		No se han asumido varianzas iguales			-1,132	6,241	,299	-16,259	14,366	-68,686	36,168
Actividad enzimática endoglucanasa	DO2	Se han asumido varianzas iguales	6,250	,031	212,208	10	,000	153,568	0,724	151,274	155,861
		No se han asumido varianzas iguales			212,208	5,000	,000	153,568	0,724	150,650	156,486
	DO6	Se han asumido varianzas iguales	9,097	,013	24,834	10	,000	264,872	10,666	231,070	298,674
		No se han asumido varianzas iguales			24,834	5,432	,000	264,872	10,666	223,572	306,171
	DO1	Se han asumido varianzas iguales	11,220	,007	19,890	10	,000	206,397	10,377	173,510	239,284
		No se han asumido varianzas iguales			19,890	5,000	,000	206,397	10,377	164,556	248,238
	EOP2	Se han asumido varianzas iguales	18,702	,002	-3,475	10	,006	-23,158	6,664	-44,279	-2,037
		No se han asumido varianzas iguales			-3,475	5,192	,017	-23,158	6,664	-49,524	3,208

Prueba T-student para muestras independientes de las actividades enzimáticas de las cepas de la Fuente Termal de Chancos

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error t _p . de la diferencia	para la diferencia		
									Inferior	Superior	
Actividad enzimática xilanasa	ICHB5	Se han asumido varianzas iguales	19,455	,001	-3,740	10	,004	-62,14500	16,61672	-114,80792	-9,48208
		No se han asumido varianzas iguales			-3,740	5,159	,013	-62,14500	16,61672	-128,09836	3,80836
	DCH1	Se han asumido varianzas iguales	1,032	,334	-25,120	10	,000	-94,66000	3,76829	-106,60274	-82,71726
		No se han asumido varianzas iguales			-25,120	8,371	,000	-94,66000	3,76829	-107,14283	-82,17717
	ICHB6	Se han asumido varianzas iguales	,005	,946	-3,853	10	,003	-83,46333	21,66225	-152,11692	-14,80975
		No se han asumido varianzas iguales			-3,853	10,000	,003	-83,46333	21,66225	-152,11714	-14,80953
	DCH3	Se han asumido varianzas iguales	,769	,401	-11,279	10	,000	-91,04667	8,07232	-116,63004	-65,46330
		No se han asumido varianzas iguales			-11,279	9,571	,000	-91,04667	8,07232	-116,88895	-65,20439
	EHC4	Se han asumido varianzas iguales	7,793	,019	-4,816	10	,001	-37,93833	7,87786	-62,90543	-12,97124
		No se han asumido varianzas iguales			-4,816	6,256	,003	-37,93833	7,87786	-66,66011	-9,21656
	ICHP1	Se han asumido varianzas iguales	21,209	,001	-8,129	10	,000	-65,03667	8,00100	-90,39402	-39,67931
		No se han asumido varianzas iguales			-8,129	5,285	,000	-65,03667	8,00100	-96,42087	-33,65247
	DCH5	Se han asumido varianzas iguales	4,851	,052	-2,349	10	,041	-42,99333	18,30466	-101,00579	15,01912
		No se han asumido varianzas iguales			-2,349	6,905	,052	-42,99333	18,30466	-107,35242	21,36575
	ICHB2	Se han asumido varianzas iguales	12,795	,005	-11,097	10	,000	-69,00500	6,21856	-88,71332	-49,29668
		No se han asumido varianzas iguales			-11,097	5,751	,000	-69,00500	6,21856	-92,47635	-45,53365
	ICHB7	Se han asumido varianzas iguales	7,919	,018	-7,518	10	,000	-78,40167	10,42852	-111,45250	-45,35083
		No se han asumido varianzas iguales			-7,518	7,130	,000	-78,40167	10,42852	-114,67134	-42,13200
	ICHB1	Se han asumido varianzas iguales	31,289	,000	7,011	10	,000	423,45167	60,40188	232,02163	614,88170
		No se han asumido varianzas iguales			7,011	5,091	,001	423,45167	60,40188	182,12018	664,78316
DCH2	Se han asumido varianzas iguales	9,476	,012	-9,811	10	,000	-132,60000	13,51576	-175,43512	-89,76488	
	No se han asumido varianzas iguales			-9,811	5,059	,000	-132,60000	13,51576	-186,77151	-78,42849	
ICHB3	Se han asumido varianzas iguales	23,389	,001	-4,519	10	,001	-104,05500	23,02594	-177,03047	-31,07953	
	No se han asumido varianzas iguales			-4,519	5,441	,005	-104,05500	23,02594	-193,14197	-14,96803	
DCH4	Se han asumido varianzas iguales	,660	,436	-3,224	10	,009	-227,98500	70,72166	-452,12122	-3,84878	
	No se han asumido varianzas iguales			-3,224	9,687	,009	-227,98500	70,72166	-453,75452	-2,21548	
ICHB4	Se han asumido varianzas iguales	9,418	,012	-3,427	10	,006	-68,28667	19,92898	-131,44704	-5,12629	
	No se han asumido varianzas iguales			-3,427	6,837	,011	-68,28667	19,92898	-138,59764	2,02431	
Actividad enzimática endoglucanasa	EHC4	Se han asumido varianzas iguales	31,250	,000	92,311	10	,000	160,80667	1,74202	155,28574	166,32759
		No se han asumido varianzas iguales			92,311	5,000	,000	160,80667	1,74202	153,78260	167,83073
	ICHB2	Se han asumido varianzas iguales	10,023	,010	99,073	10	,000	157,18667	1,58657	152,15839	162,21494
		No se han asumido varianzas iguales			99,073	5,000	,000	157,18667	1,58657	150,78939	163,58394
	ICHB1	Se han asumido varianzas iguales	20,629	,001	5,373	10	,000	209,14833	38,92626	85,78039	332,51628
		No se han asumido varianzas iguales			5,373	5,474	,002	209,14833	38,92626	58,95987	359,33679
	DCH2	Se han asumido varianzas iguales	14,894	,003	40,119	10	,000	160,08000	3,99012	147,43422	172,72578
		No se han asumido varianzas iguales			40,119	5,000	,000	160,08000	3,99012	143,99127	176,16873
	ICHB3	Se han asumido varianzas iguales	21,111	,001	37,155	10	,000	173,83000	4,67852	159,00249	188,65751
		No se han asumido varianzas iguales			37,155	5,000	,000	173,83000	4,67852	154,96554	192,69446
	DCH4	Se han asumido varianzas iguales	13,609	,004	2,605	10	,026	158,49167	60,84186	-34,33277	351,31610
		No se han asumido varianzas iguales			2,605	6,042	,040	158,49167	60,84186	-66,43421	383,41754

Prueba T-student para muestras independientes de las actividades enzimáticas de las cepas de la Fuente Termal de Huancarhuaz

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	para la diferencia		
									Inferior	Superior	
Actividad enzimática xilanasa	IHB1	Se han asumido varianzas iguales	4,849	,052	-7,099	10	,000	-61,05833	8,60054	-88,31578	-33,80089
		No se han asumido varianzas iguales			-7,099	7,199	,000	-61,05833	8,60054	-90,87383	-31,24284
	EHB2	Se han asumido varianzas iguales	2,300	,160	-7,041	10	,000	-50,22333	7,13339	-72,83099	-27,61568
		No se han asumido varianzas iguales			-7,041	8,671	,000	-50,22333	7,13339	-73,63000	-26,81667
	EHC3	Se han asumido varianzas iguales	,705	,421	-5,223	10	,000	-70,09167	13,41925	-112,62094	-27,56239
		No se han asumido varianzas iguales			-5,223	9,667	,000	-70,09167	13,41925	-112,95113	-27,23221
	EHB1	Se han asumido varianzas iguales	6,197	,032	-15,683	10	,000	-97,55167	6,22034	-117,26561	-77,83772
		No se han asumido varianzas iguales			-15,683	7,360	,000	-97,55167	6,22034	-118,96190	-76,14144
	EHC2	Se han asumido varianzas iguales	,458	,514	-13,963	10	,000	-131,51667	9,41900	-161,36806	-101,66527
		No se han asumido varianzas iguales			-13,963	9,197	,000	-131,51667	9,41900	-161,96162	-101,07171
	IHB2	Se han asumido varianzas iguales	1,203	,298	-8,266	10	,000	-91,05000	11,01447	-125,95786	-56,14214
		No se han asumido varianzas iguales			-8,266	9,422	,000	-91,05000	11,01447	-126,44365	-55,65635
EHB3	Se han asumido varianzas iguales	,454	,516	-7,625	10	,000	-109,47667	14,35799	-154,98104	-63,97229	
	No se han asumido varianzas iguales			-7,625	9,460	,000	-109,47667	14,35799	-155,56923	-63,38410	
EHB4	Se han asumido varianzas iguales	6,636	,028	2,654	10	,024	51,66333	19,46308	-10,02048	113,34715	
	No se han asumido varianzas iguales			2,654	7,052	,033	51,66333	19,46308	-16,27780	119,60447	
Actividad enzimática endoglucanasa	IHB1	Se han asumido varianzas iguales	10,917	,008	29,732	10	,000	224,63167	7,55517	200,68726	248,57607
		No se han asumido varianzas iguales			29,732	5,000	,000	224,63167	7,55517	194,16812	255,09521
	EHB2	Se han asumido varianzas iguales	40,000	,000	50,474	10	,000	184,83000	3,66192	173,22438	196,43562
		No se han asumido varianzas iguales			50,474	5,000	,000	184,83000	3,66192	170,06462	199,59538
	EHC3	Se han asumido varianzas iguales	11,317	,007	41,461	10	,000	171,80500	4,14379	158,67221	184,93779
		No se han asumido varianzas iguales			41,461	5,000	,000	171,80500	4,14379	155,09666	188,51334
	EHB1	Se han asumido varianzas iguales	10,012	,010	75,169	10	,000	238,38333	3,17131	228,33258	248,43409
		No se han asumido varianzas iguales			75,169	5,000	,000	238,38333	3,17131	225,59614	251,17052
	EHC2	Se han asumido varianzas iguales	15,073	,003	31,884	10	,000	166,74000	5,22965	150,16581	183,31419
		No se han asumido varianzas iguales			31,884	5,000	,000	166,74000	5,22965	145,65330	187,82670
	IHB2	Se han asumido varianzas iguales	7,802	,019	-93,707	10	,000	-194,23833	2,07282	-200,80768	-187,66899
		No se han asumido varianzas iguales			-93,707	5,000	,000	-194,23833	2,07282	-202,59626	-185,88041
EHB3	Se han asumido varianzas iguales	18,046	,002	-41,102	10	,000	-170,35667	4,14472	-183,49241	-157,22092	
	No se han asumido varianzas iguales			-41,102	5,000	,000	-170,35667	4,14472	-187,06876	-153,64457	
EHB4	Se han asumido varianzas iguales	2,718	,130	33,737	10	,000	225,06833	6,67130	203,92517	246,21150	
	No se han asumido varianzas iguales			33,737	7,930	,000	225,06833	6,67130	202,62579	247,51087	

10.15. COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EXTRACELULAR ACUERDO A LOS MEDIOS LB-CMC Y LB-XIL

(a) Fuente Termal de Olleros

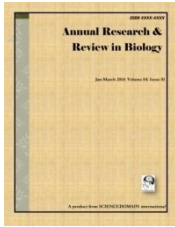
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	para la diferencia	
									Inferior	Superior
DO2	Se han asumido varianzas iguales	6,876	,026	1,938	10	,081	,0029500	,0015225	-0,018753	,0077753
	No se han asumido varianzas iguales			1,938	6,340	,098	,0029500	,0015225	-0,025723	,0084723
DO6	Se han asumido varianzas iguales	1,167	,305	,276	10	,788	,0003667	,0013282	-0,038428	,0045761
	No se han asumido varianzas iguales			,276	7,452	,790	,0003667	,0013282	-0,041869	,0049202
DO1	Se han asumido varianzas iguales	5,856	,036	1,552	10	,152	,0025000	,0016113	-0,026066	,0076066
	No se han asumido varianzas iguales			1,552	5,807	,173	,0025000	,0016113	-0,035560	,0085560
EOP2	Se han asumido varianzas iguales	1,141	,311	8,893	10	,000	,0093167	,0010477	,0059963	,0126370
	No se han asumido varianzas iguales			8,893	8,627	,000	,0093167	,0010477	,0058743	,0127591
IOPC2	Se han asumido varianzas iguales	19,705	,001	1,511	10	,162	,0023667	,0015661	-0,025968	,0073302
	No se han asumido varianzas iguales			1,511	5,715	,184	,0023667	,0015661	-0,035604	,0082937
EOP3	Se han asumido varianzas iguales	33,461	,000	9,568	10	,000	,0120000	,0012542	,0080251	,0159749
	No se han asumido varianzas iguales			9,568	5,067	,000	,0120000	,0012542	,0069773	,0170227
EOC1	Se han asumido varianzas iguales	17,777	,002	10,082	10	,000	,0105167	,0010431	,0072108	,0138225
	No se han asumido varianzas iguales			10,082	5,399	,000	,0105167	,0010431	,0064661	,0145672

(b) Fuente Termal Huancarhuaz

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	para la diferencia	
									Inferior	Superior
IHB1	Se han asumido varianzas iguales	,479	,505	8,581	10	,000	,02500	,00291	,01577	,03423
	No se han asumido varianzas iguales			8,581	9,881	,000	,02500	,00291	,01574	,03426
EHB2	Se han asumido varianzas iguales	2,368	,155	7,485	10	,000	,03400	,00454	,01960	,04840
	No se han asumido varianzas iguales			7,485	7,054	,000	,03400	,00454	,01815	,04985
EHC3	Se han asumido varianzas iguales	8,432	,016	9,590	10	,000	,02067	,00216	,01384	,02750
	No se han asumido varianzas iguales			9,590	6,811	,000	,02067	,00216	,01305	,02828
EHB1	Se han asumido varianzas iguales	,729	,413	11,463	10	,000	,03867	,00337	,02798	,04936
	No se han asumido varianzas iguales			11,463	9,412	,000	,03867	,00337	,02782	,04951
EHC2	Se han asumido varianzas iguales	5,294	,044	10,163	10	,000	,02867	,00282	,01973	,03761
	No se han asumido varianzas iguales			10,163	6,171	,000	,02867	,00282	,01833	,03901
IBH2	Se han asumido varianzas iguales	,264	,619	6,943	10	,000	,02033	,00293	,01105	,02962
	No se han asumido varianzas iguales			6,943	9,065	,000	,02033	,00293	,01083	,02983
EHB3	Se han asumido varianzas iguales	1,561	,240	10,485	10	,000	,02517	,00240	,01756	,03277
	No se han asumido varianzas iguales			10,485	9,106	,000	,02517	,00240	,01739	,03294
EHB4	Se han asumido varianzas iguales	15,250	,003	,050	10	,961	,00017	,00333	-0,01039	,01072
	No se han asumido varianzas iguales			,050	5,482	,962	,00017	,00333	-0,01268	,01301

(c) Fuente Termal de Chancos

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tıp. de la diferencia	para la diferencia	
									Inferior	Superior
ICHB5	Se han asumido varianzas iguales	12,759	,005	-1,048	10	,319	-,0020167	,0019243	-,0081153	,0040820
	No se han asumido varianzas iguales			-1,048	5,795	,336	-,0020167	,0019243	-,0092555	,0052222
DCH1	Se han asumido varianzas iguales	4,373	,063	13,257	10	,000	,0064167	,0004840	,0048827	,0079507
	No se han asumido varianzas iguales			13,257	6,603	,000	,0064167	,0004840	,0046875	,0081458
ICHB6	Se han asumido varianzas iguales	,000	,989	-2,163	10	,056	-,0034667	,0016024	-,0085452	,0016119
	No se han asumido varianzas iguales			-2,163	9,877	,056	-,0034667	,0016024	-,0085594	,0016261
DCH3	Se han asumido varianzas iguales	1,207	,298	7,846	10	,000	,0069833	,0008901	,0041624	,0098043
	No se han asumido varianzas iguales			7,846	9,138	,000	,0069833	,0008901	,0041016	,0098650
ECHC4	Se han asumido varianzas iguales	12,908	,005	-2,271	10	,792	-,0003000	,0011087	-,0038138	,0032138
	No se han asumido varianzas iguales			-2,271	6,327	,795	-,0003000	,0011087	-,0043247	,0037247
ICHP1	Se han asumido varianzas iguales	1,296	,281	-3,599	10	,005	-,0053167	,0014773	-,0099985	-,0006348
	No se han asumido varianzas iguales			-3,599	8,699	,006	-,0053167	,0014773	-,0101599	-,0004734
DCH5	Se han asumido varianzas iguales	9,316	,012	3,988	10	,003	,0056667	,0014211	,0011629	,0101704
	No se han asumido varianzas iguales			3,988	6,159	,007	,0056667	,0014211	,0004534	,0108799
ICHB2	Se han asumido varianzas iguales	1,097	,320	4,150	10	,002	,0080500	,0019399	,0019018	,0141982
	No se han asumido varianzas iguales			4,150	8,478	,003	,0080500	,0019399	,0016459	,0144541
ICHB7	Se han asumido varianzas iguales	5,113	,047	2,282	10	,046	,0032167	,0014093	-,0012497	,0076830
	No se han asumido varianzas iguales			2,282	7,566	,054	,0032167	,0014093	-,0015919	,0080252
ICHB1	Se han asumido varianzas iguales	1,225	,294	,243	10	,813	,0006333	,0026080	-,0076320	,0088987
	No se han asumido varianzas iguales			,243	9,425	,813	,0006333	,0026080	-,0077462	,0090129
DCH2	Se han asumido varianzas iguales	4,119	,070	-,988	10	,346	-,0027333	,0027655	-,0114980	,0060314
	No se han asumido varianzas iguales			-,988	7,668	,353	-,0027333	,0027655	-,0121308	,0066642
ICHB3	Se han asumido varianzas iguales	,587	,461	-1,722	10	,116	-,0018500	,0010743	-,0052547	,0015547
	No se han asumido varianzas iguales			-1,722	9,130	,119	-,0018500	,0010743	-,0053286	,0016286
DCH4	Se han asumido varianzas iguales	15,870	,003	-,058	10	,955	-,0001167	,0020218	-,0065243	,0062909
	No se han asumido varianzas iguales			-,058	5,894	,956	-,0001167	,0020218	-,0076679	,0074345
ICHB4	Se han asumido varianzas iguales	,208	,658	,491	10	,634	,0009667	,0019693	-,0052746	,0072079
	No se han asumido varianzas iguales			,491	9,911	,634	,0009667	,0019693	-,0052871	,0072204



Isolation and Identification of Cellulolytic and Xylanolytic Bacteria from Huancarhuaz Hot Spring, Peru

Carmen Tamariz-Angeles¹, Percy Olivera-Gonzales¹, Gretty K. Villena²
and Marcel Gutiérrez-Correa^{2*}

¹Laboratory of Biology, Faculty of Science, Santiago Antúnez de Mayolo National University, Huaraz, Peru.

²Laboratory of Mycology and Biotechnology, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av La Molina s/n, Lima 12, Peru.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors CTA, GKV and MGC conceived and designed the study. Authors CTA and GKV designed the experiments. Author CTA performed the experiments and wrote the first draft of the manuscript. Author POG performed the samplings and the statistical analysis. Authors GKV and MGC reviewed the first draft of the manuscript and made the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Original Research Article

Received 6th April 2014
Accepted 28th April 2014
Published 15th May 2014

ABSTRACT

Aims: To isolate and characterize lignocellulase producing thermophilic bacteria from a Peruvian hot spring.

Study Design: Combined sediment and water samples from the hot spring were subjected to direct plating, *in situ* baiting and *ex situ* enrichment. Endoglucanase and xylanase producing bacterial colonies were isolated and characterized.

Place and Duration of Study: Samples were taken from the Huancarhuaz hot spring, Peru (8°56'31.86"S, 77°47'00.53"W) in August 2010 and processed during 2011-2013.

Methodology: Samples were subjected to three isolation methods and bacterial colonies with different color, size and appearance, were isolated, purified by streaking several times and conserved in Tryptic Soy Agar slants at 4°C. The agar staining method was used to isolate enzyme-producing strains which were then identified by 16S rRNA sequencing and further studied for endoglucanase and xylanase production.

*Corresponding author: Email: mgclmb@lamolina.edu.pe;

Results: From 19 bacterial isolates only eight were selected for further study as they showed clearing activities on both carboxymethyl cellulose and xylan agar plates. By using 16S rRNA gene phylogenetic analysis, seven isolates were identified as *Bacillus licheniformis* and one as *Cohnella laeviribosi* which was the best xylanase and endoglucanase producer. Maximum endoglucanase activity produced by *C. laeviribosi* EHB4 was obtained at pH 6.0 and at 60°C and only 50% of its activity was lost at 90°C for 1h indicating that this enzyme is particularly thermostable.

Conclusion: This is the first report on the production of endoglucanase by *C. laeviribosi*. These findings indicate that Peruvian hot springs are good sources of thermophilic cellulase-producing bacteria and that *C. laeviribosi* EHB4 may contribute to the development of biomass bioconversion processes.

Keywords: Bacillus; cohnella; endoglucanase; peruvian hot springs; thermophiles; xylanase.

1. INTRODUCTION

The high demand for energy is a matter of concern today and this will increase in the coming decades as population grows. Therefore, searching for additional and renewable energy sources will continue since there are expectations that renewable resources will be able to play a significant role satisfying this future energy demand [1]. Also, this has fueled research worldwide for the development of technologies for an efficient use of them. Among renewable resources for energy, biomass which amounts to about 200×10^9 tons per year is one of the most abundant and inexpensive feedstock that can be converted into liquid biofuels and other valuable industrial compounds [2,3]. It is considered that 250 to 500 EJ of biomass energy could be produced by agriculture while still feeding a growing world population [4]. However, the bioconversion of biomass to liquid fuel like ethanol is difficult due to the complex structure and composition of this substrate [5].

The major component of lignocellulosic biomass is cellulose, followed by hemicellulose and lignin. Cellulose and hemicellulose are macromolecules constructed from different sugars; whereas lignin is an aromatic polymer synthesized from phenylpropanoid precursors. Lignin is linked to both hemicellulose and cellulose, forming a physical seal that is an impenetrable barrier in the plant cell wall [6]. The rigid and complex molecular polymeric structure of cellulosic biomass makes lignocellulose highly resistant to chemical attack, solubilization and bioconversion. For the conversion of the biomass into biofuels, it is required to overcome this recalcitrance by using either physical or chemical pretreatment procedures which break down the lignocellulosic structures and thereby enhance either the enzymatic or chemical accessibility [7,8,9]. Accessible cellulosic carbohydrates are hydrolyzed to fermentable sugars and then converted to ethanol by either bacteria or yeasts. The widely accepted mechanism for enzymatic cellulose hydrolysis involves the synergistic activity of endoglucanase, exoglucanase or cellobiohydrolase, and β -glucosidase [10,11]. Additionally, xylanases and other enzymes are also required for hemicellulose hydrolysis [12]. Despite the efforts of many laboratories, the high cost of enzyme production is still the bottleneck in the production of cellulosic ethanol. Therefore, the search for new both cellulase-producing microorganisms and cellulase-encoding genes from several environments will continue for longer time.

Thermotolerant enzymes are of high interest for many enzyme-catalyzed industrial processes which has driven microbial surveys in high-temperature environments like hot springs [13]. Although there are many reports on microbial diversity of hot springs in several

parts of the world, studies on Peruvian hot springs are lacking. In this sense, the objective of this research was to isolate xylanase and cellulase producing bacteria present in the Huancarhuaz hot spring which is located in the central Andean mountains of Peru. As far as we know this is the first report describing bacterial diversity of Peruvian hot springs.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample Collection

Combined sediment and water samples were collected from the Huancarhuaz hot spring in sterile wide-mouthed glass bottles and transported cooled to the laboratory for analysis in the same day. Huancarhuaz hot spring is located in the province of Huaylas, Ancash, Peru (8°56'31.86"S, 77°47'00.53"W). Temperature of 70°C and pH of 6.5 were registered at the moment of sampling.

2.2 Isolation Procedures

Three isolation methods were used in this study: direct plating, *in situ* baiting and *ex situ* enrichment. In all cases, the agar dilution method was used on a basal salt medium (BSM) containing per liter: 11.7g (NH₄)₂SO₄, 3.7g KH₂PO₄, 0.6g MgSO₄·7H₂O, 0.8g CaCl₂·2H₂O, 0.5g yeast extract, 0.5g peptone, 0.5g FeSO₄·7H₂O, 0.16g MnSO₄·H₂O, 0.14g ZnSO₄·7H₂O, 0.37g CoCl₂·6H₂O. When required, BSM was supplemented with either 10g glucose (agar dilution method) or other carbon sources (qualitative selection) and 15 g agar for plating. The pH was adjusted to 6.5.

For *in situ* baiting, the method of Kublanov et al. [14] was followed by using either 50mg NaOH-pretreated sugar cane bagasse, a 2x2cm piece of Whatman N°1 filter paper or 50mg beechwood xylan. Baits were kept submerged in the hot spring for 14 days and they were transported cooled to the laboratory for immediate analysis by the agar dilution method.

For the *ex situ* enrichment, 250ml flasks containing 25ml hot spring water and sediment were amended with 25ml basal salt medium and either 0.5g NaOH-pretreated sugar cane bagasse, Whatman N°1 filter paper or beechwood xylan. They were incubated at 50°C for 14 days in static state before the isolation by the agar dilution method.

The colonies with different color, size and appearance, were isolated, purified by streaking several times and conserved in Tryptic Soy Agar (TSA, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) slants at 4°C.

2.3 Qualitative Selection of Cellulolytic and Xylanolytic Bacteria

Bacterial isolates were selected for their hydrolytic capacity by the plate staining method [15]. The isolated strains were grown in Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) at 50°C for 20h, then 5µl were inoculated on plates of BSM supplemented with 15g/l agar and either 10g/l medium viscosity carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or 10g/l beechwood xylan (Sigma-Aldrich). Plates were incubated at 50°C for 5 days. They were stained with 0.1% Congo red (Sigma-Aldrich) for 10 min and washed three times with 1M NaCl. Bacterial isolates showing a clear zone around the colony were selected and maintained on TSA slants at 4°C.

2.4 DNA Extraction and 16S PCR

The genomic DNA of selected strains was extracted using AxyPrep Bacterial Genomic Miniprep Kit (Axygen Scientific Inc., Union City, CA) following the manufacturer's protocol. For amplification of the 16S rRNA gene universal primers set 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') according Reinsenbach et al. [16] were used. The PCR reaction mixture was heated at 94°C for 5min, followed by 20 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 60 s, and extension at 72°C for 60s with a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products were sequenced by a commercial company (Macrogen Inc., Seoul, Korea) using universal primers: 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') and 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). The sequences were analyzed and edited using Chromas Lite version 2.01 software (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia) and CAP3 Sequence Assemble Program [17]. Nucleotide sequences were compared to database of NCBI GenBank (The National Center for Biotechnology Information U. S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using BLASTN. Nucleotide sequences were aligned using the multiple alignment program CLUSTAL X version 2.0 [18] and the phylogenetic analysis was carried out with MEGA5 Program [19] using Neighbor-Joining method with 1000 bootstraps and Kimura 2-parameters method. The nucleotide sequences obtained have been deposited in the GenBank database (accession numbers KF911390 to KF911397).

2.5 Enzyme Determinations

For enzyme determinations selected strains were grown in shaken flasks containing 50ml Luria broth supplemented with either 1% CMC or 1% beechwood xylan for 20h at 50°C and 180rpm. Each flask was inoculated with a 5% of a 0.1 O.D. 8h liquid culture of the selected strain. Three replicates were used in each case. After incubation, liquid cultures were centrifuged at 10,595g and the supernatants were filtered through 0.22µm membranes for enzyme determinations.

Endoglucanase and xylanase were determined in duplicate according to the 96-µl microplate-based method described by King et al. [20] by using either 1% CMC or 1% beechwood xylan in 0.05M phosphate buffer at pH 6.0 as substrate, respectively. One enzyme unit (U) is defined as the amount of enzyme that releases 1µmol product per minute of either glucose or xylose equivalents.

Protein concentration was determined according to the method of Bradford [21], using bovine serum albumin as standard.

2.6 Statistical Analysis

Data were analyzed by SPSS (Version 20.1) software (IBM, New York, NY). Analysis of variance (ANOVA) by the General Linear Models procedure and Duncan's multiple range tests were used to find significant differences between treatments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Hot springs are interesting environments from which bacteria having thermotolerant enzymes can be isolated. A hot spring in the central Andean mountains of Peru was screened for cellulolytic bacteria by using direct plating, *in situ* baiting and *ex situ* enrichment

being the latter the most yielding (Table 1). In both *in situ* baiting and *ex situ* enrichment methods sugar cane bagasse was a better substrate as higher number of bacterial isolates were recovered from it though other substrates have been used elsewhere [14]. It is possible that the complex composition of sugar cane bagasse favored the growth of more bacterial strains as this substrate has been found to be good for cellulase production [22]. From 19 bacterial isolates only eight were selected for further study as they showed clearing activities on both carboxymethyl cellulose and xylan agar plates (Table 2).

All bacterial isolates were gram-positive spore-forming bacilli growing well at temperatures between 35°C to 50°C, except strain EHB4 that had poor growth. The identification of these strains was performed by 16S gene analysis. The products of PCR amplified 16S rDNA from all bacterial strains were about 1500bp which corresponds to the size of 16S rDNA gene. For sequence analysis, gene sequence identity was performed by considering a size of 1534bp. BLASTN analysis gave 99% or more identity in all cases. Multiple alignment and phylogenetic analysis showed that seven strains can be assigned to *Bacillus licheniformis* (EHB1, EHB2, EHB3, EHC2, EHC3, IHB1 and IHB2) and one to *Cohnella laeviribosi* (EHB4) both with 100% of bootstraps (Fig. 1). Several *Bacillus* species have been isolated from hot springs and other unusual environments all over the World and they may be important for industrial purposes [13,23]. *Bacillus licheniformis* is present in many hot spring samples having interesting capabilities like the production of hydrolytic enzymes, biosurfactants and other industrial useful products [24,25,26,27]. On the other hand, *Cohnella laeviribosi* was isolated from a hot spring of a volcanic area in Indonesia as an endospore-forming rod bacterium that can use L-ribose as the sole carbon source and with an interesting D-Lysose (L-ribose) isomerase activity [28,29]. Although the production of hydrolytic enzymes has been reported for some *Cohnella* species, there are only few reports for *C. laeviribosi* [30,31].

Table 1. Bacterial isolates from Huancarhuaz hot spring, Peru

Method	Enrichment Substrate	Number of isolates	Hydrolytic strains
Direct plating	None	2	-
<i>Ex situ</i> enrichment	Sugar cane bagasse	6	EHB1, EHB2, EHB3, EHB4
	Filter paper	0	-
	Microgranular cellulose	3	EHC2, EHC3
	Beechwood xylan	3	-
<i>In situ</i> baiting	Sugar cane bagasse	4	IHB1, IHB2
	Filter paper	1	-
	FP + microgranular cellulose	0	-
	Beechwood xylan	0	-

In order to determine the hydrolase production capacity of the 8 selected strains, shaken liquid cultures were carried out with either carboxymethyl cellulose or xylan as carbon sources for 20h at 50°C. All 7 *B. licheniformis* strains grew well on both carbon sources but *C. laeviribosi* EHB4 showed slow growth on the same media. All strains had xylanase activity on both media being higher for *B. licheniformis* strains on carboxymethyl cellulose while for *C. laeviribosi* EHB4 slightly higher xylanase activity was observed on xylan medium. On the other hand, endoglucanase activity was better produced on xylan medium but it was always lesser than xylanase activity (Fig. 3). Total cellulase activity as measured by the filter paper method was very low in all cases as it was also found in other *Bacillus* species [32,33]. Interestingly, the strain *C. laeviribosi* EHB4 produced not only higher xylanase activity but also higher endoglucanase activity having the highest both volumetric

productivity and specific activity of all the strain tested (Table 3). Although *C. laeviribosi* produces xylanases, endoglucanase activity had not been reported yet [30,31]. This endoglucanase activity may be due to neither an unspecific xylanase nor a bi-functional enzyme because its activity level depends on the carbon source as shown in Fig. 2. Therefore, this the first report on the production of endoglucanase for *C. laeviribosi*.

Table 2. Qualitative enzyme screening of selected bacterial isolates from Huancarhuaz hot spring, Peru

Strain	Endoglucanase (mm)	Xylanase (mm)
<i>Bacillus licheniformis</i> EHB1	14.00±1.41	1.75±0.35
<i>Bacillus licheniformis</i> EHB2	14.50±0.71	1.75±0.35
<i>Bacillus licheniformis</i> EHB3	19.5±0.71	2.00±0.00
<i>Bacillus licheniformis</i> EHC2	8.00±1.41	2.00±0.00
<i>Bacillus licheniformis</i> EHC3	8.50±0.71	2.00±0.00
<i>Bacillus licheniformis</i> IHB1	6.00±1.41	1.75±0.35
<i>Bacillus licheniformis</i> IHB2	6.50±0.71	2.00±0.00
<i>Cohnella laeviribosi</i> EHB4	2.00±0.00	2.25±0.35

Values represent mean of four replicates ± SD of the clear zones around colonies

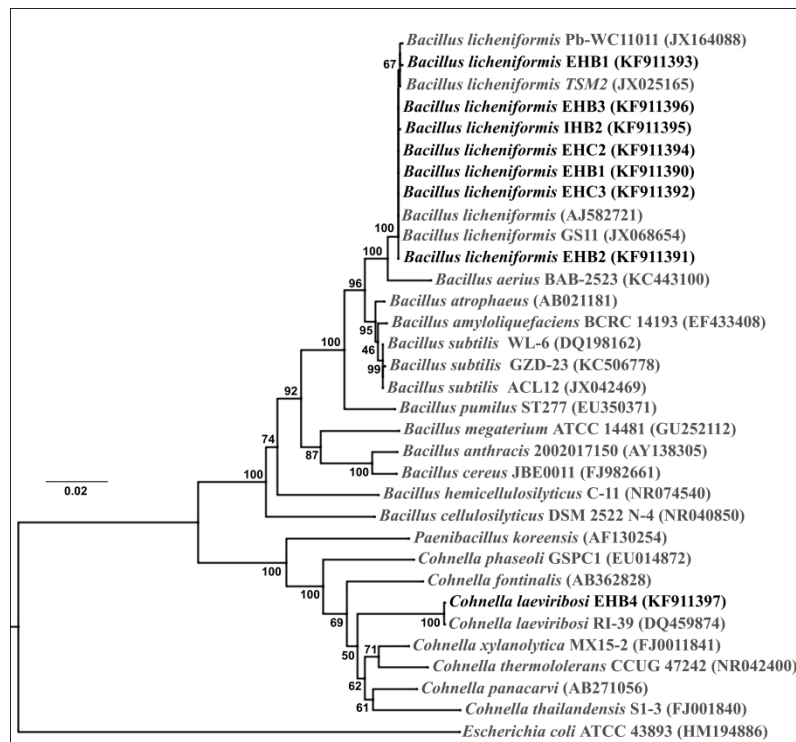


Fig. 1. Comparative sequence analysis of 16S rRNA genes of strains selected for hydrolytic activity on CMC and/or Xylan (EHB1, EHB2, EHB3, EHB4, EHC2, EHC3, IHB1, and IHB2) and related representative species from NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the Neighbor-joining method. *Escherichia coli* ATCC43893 was used as outgroup to root the tree. GeneBank numbers are indicated in brackets. The Bar represents 2 substitutions per 100 nucleotide positions

Shaken liquid cultures of *C. laeviribosi* EHB4 on xylan were further conducted to study some characteristics of its hydrolase activity. Maximum xylanase activity of cell-free extracts was found at pH 7.0 (Fig. 3a). Xylanase activity was slightly better at 65°C although there was not a significant difference in activity between 60° to 70°C (Fig. 3b). However, 70% of its xylanase activity was lost at 60°C for 1h but it remained with this activity up to 80°C (Fig 3c). These results are consistent with the characteristics of the extracellular xylanase *eXylC* of *C. laeviribosi* HY-21 but, as expected, different from the intracellular xylanase *iXylC* of the same strain [30]. Although cellulase activity has been reported for other *Cohnella* species like *C. cellulositytica* [34], *C. laeviribosi* has not been reported as a cellulase-producing species. Interestingly, *C. laeviribosi* EHB4 produced higher levels of endoglucanase in xylan liquid cultures than the other *B. licheniformis* strains isolated from the same hot spring (Fig. 2). Maximum endoglucanase activity produced by *C. laeviribosi* EHB4 was obtained at pH 6.0 and at 60°C (Fig. 3d, e). Moreover, only 50% of the endoglucanase activity was lost when cell-free extracts were incubated without substrate at 90°C for 1h indicating that this enzyme is particularly thermostable (Fig. 3f). Several endoglucanases have been found in *Paenibacillus* species [35,36,37,38], the closest relative of *Cohnella*, with different degrees of thermal stability either as single units, bi-functional units or multi-enzyme complexes. As stated above it does not seem that both xylanase and endoglucanase activities are due to a bi-functional enzyme and further studies are needed.

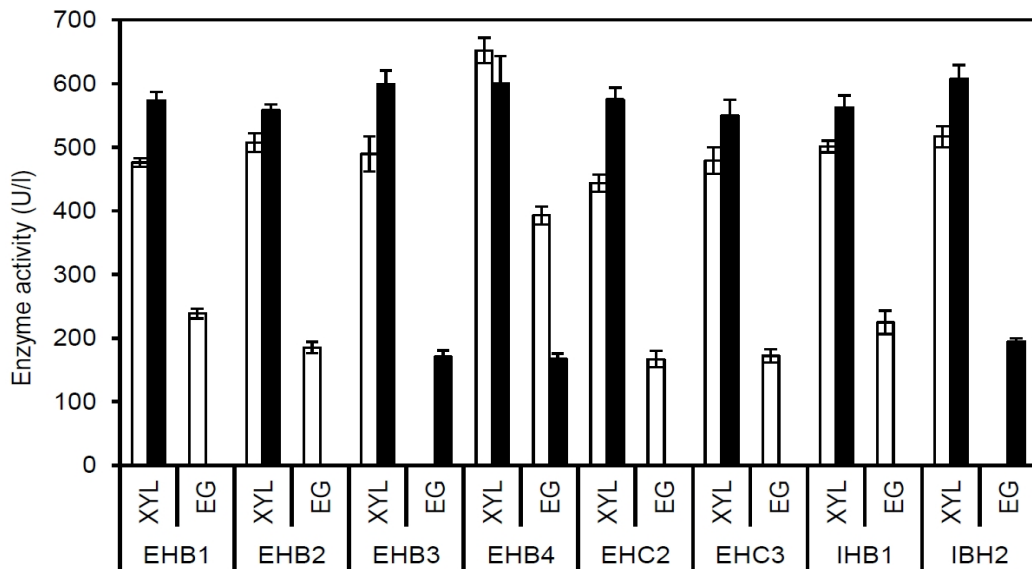


Fig. 2. Endoglucanase (EG) and xylanase (XYL) activities on xylan (white bars) and CMC (black bars) by eight bacterial strains (EHB1, EHB2, EHB3, EHB4, EHC2, EHC3, IHB1, and IHB2) isolated from Huancarhuaz hot spring, Peru. Values represent mean of six replicates ± SD

Table 3. Comparison of some technical parameters for xylanase and endoglucanase production on xylan liquid cultures by eight bacterial strains isolated from Huancarhuaz hot spring, Peru

Strain	XYL	Γ_{XYL}	$Y_{XYL/Pr}$	EG	Γ_{EG}	$Y_{EG/Pr}$
<i>B. licheniformis</i> EHB1	476±7 ^d	23.8±0.3 ^d	8065±116 ^e	238±8 ^b	11.9±0.4 ^b	4040±132 ^b
<i>B. licheniformis</i> EHB2	507±15 ^{b,c}	25.4±0.7 ^c	8316±239 ^e	185±9 ^c	9.2±0.4 ^c	3030±147 ^c
<i>B. licheniformis</i> EHB3	489±28 ^{b,c,d}	24.5±1.4 ^{c,d}	9784 ± 554 ^c	0±0 ^e	0±0 ^e	0±0 ^d
<i>B. licheniformis</i> EHC2	443±14 ^e	22.2±0.7 ^d	10813±334 ^b	167±13 ^d	8.3±0.6 ^d	4067±312 ^b
<i>B. licheniformis</i> EHC3	479± 21 ^{c,d}	24.0±1.1 ^{c,d}	9394±411 ^{c,d}	172±10 ^{c,d}	8.6±0.5 ^{c,d}	3369±199 ^c
<i>B. licheniformis</i> IHB1	501±9 ^{b,c,d}	25.1±0.5 ^{c,d}	9280±169 ^{c,d}	225±19 ^b	11.2±0.9 ^b	4160±343 ^b
<i>B. licheniformis</i> IHB2	517±17 ^b	25.8±0.8 ^b	8908±285 ^d	0±0 ^e	0±0 ^e	0±0 ^d
<i>C. laeviribosi</i> EHB4	652±14 ^a	32.6±1.0 ^a	14814±455 ^a	393±14 ^a	19.6±0.7 ^a	8921±323 ^a

XYL = xylanase activity (U/l); Γ_{XYL} = Xylanase volumetric productivity (U/l.h); $Y_{XYL/Pr}$ = Xylanase specific activity(U/g protein) EG = endoglucanase activity (U/l); Γ_{EG} = Endoglucanase volumetric productivity (U/l.h); $Y_{EG/Pr}$ = Endoglucanase specific activity (U/g protein). Values represent mean of six repetitions ± SD. Means with the same letter within a column are no significantly different (P<.01)

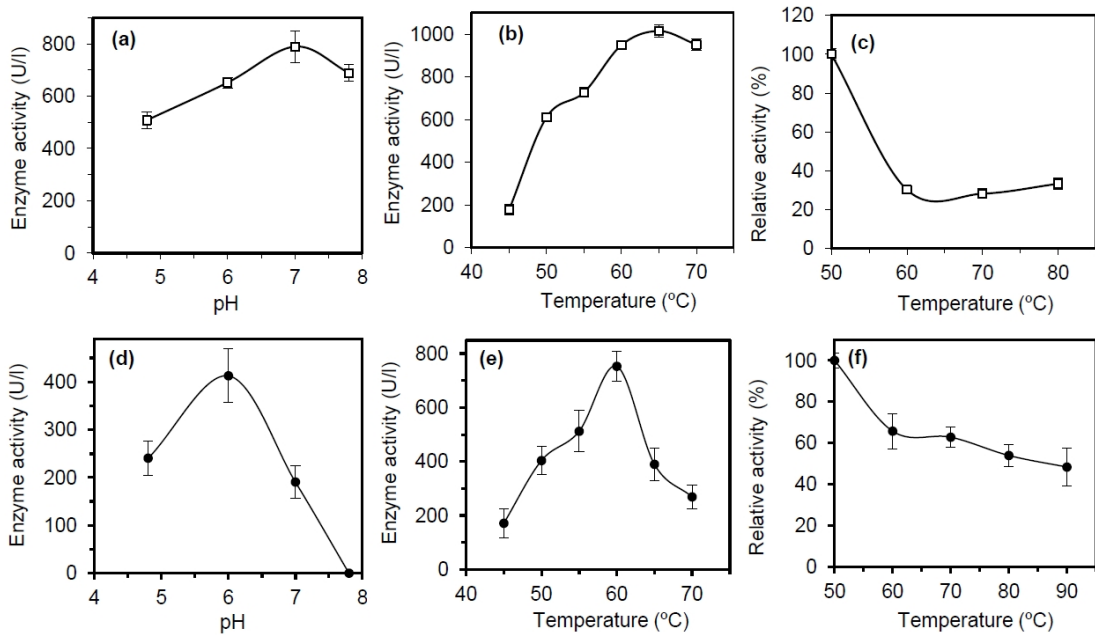


Fig. 3. Characteristics of xylanase (upper panel) and endoglucanase (bottom panel) of *Cohnella laeviribosi* as referred to optimum pH (a, d) and temperature (b, e) on enzyme activity, and thermal stability (c, f). Values represent mean of six replicates ± SD

4. CONCLUSION

In conclusion, we have isolated seven *Bacillus licheniformis* strains and one *Cohnella laeviribosi* strain producing xylanase and endoglucanase from a Peruvian hot spring. Among all the strains isolated in this study, *C. laeviribosi* EHB4 was the best enzyme producer and its endoglucanase activity is the first finding for this species. Endoglucanase activity of

C. laeviribosi EHB4 is maximal at 60°C and is particularly stable up to 90°C which is important for various industrial processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a doctoral scholarship to CT-A from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC, Peru) and by grant N°068-FINCYT-PIBAP-2008 from the National Program of Science and Technology (Peru).

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Saxena RC, Adhikari DK, Goyal HB. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renew Sust Energ Rev*. 2009;13(1):167–78.
2. Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;69(6):627–42.
3. Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Prog Energy Combust Sci*. 2012;38(4):522-50.
4. National Petroleum Council. *Hard Truths: Facing the Hard Truths about Energy*. Washington, D.C. National Petroleum Council; 2007.
5. Weber C, Farwick A, Benisch F, Brat D, Dietz H, Subtil T, Boles E. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87(4):1303–15.
6. Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv*. 2009;27(2):185-94.
7. Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008;35(5):377-91.
8. Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(3):372-80.
9. Baidner JB, Raines RT. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2010;107(10):4516-21.
10. Zhang Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*. 2006;24(5):452-81.
11. Wilson DB. Cellulases and biofuels. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(3):295-9.
12. Sharma M, Kumar A. Xylanases: An overview. *Br Biotechnol J*. 2013;3(1):1-28.
13. Mehta D, Satyanarayana T. Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y, editors. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*. Dordrecht: Springer; 2013.
14. Kublanov IV, Perevalova AA, Slobodkina GB, Lebedinsky AV, Bidzhieva SK, Kolganova TV, et al. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(1):286–91.
15. Sirisena DM, Maamendra TP. Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from decomposing rice straw. *J Natn Sci Coun Sri Lanka*. 1995;23(1):25-30.

16. Reinsenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(9):3798–806.
17. Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999;9(8):868-77.
18. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and CLUSTAL X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-8.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-9.
20. King BC, Donnelly MK, Bergstrom GC, Walker LP, Gibson DM. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(4):1033-44.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248–54.
22. Camassola M, Dillon AJP. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2196-204.
23. Nogi Y, Takami H, Horikoshi K. Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: Proposal of five novel species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(6):2309–15.
24. Dereková A, Mandeva R, Kambourova M. Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24(9):1697-702.
25. Lee CC, Kibblewhite-Accinelli RE, Smith MR, Wagschal K, Orts WJ, Wong DWS. Cloning of *Bacillus licheniformis* xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Curr Microbiol.* 2008;57(4):301–5.
26. Pakpitcharoen A, Potivejkul K, Kanjanavas P, Areekit S, Chansiri K. Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. *ScienceAsia.* 2008;34(4):424–31.
27. Acharya S, Chaudhary A. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot springs. *Braz Arch Biol Technol.* 2012;55(4):497-503.
28. Cho E-A, Lee J-S, Lee K-C, Jung H-C, Pan J-G, Pyun Y-R. *Cohnella laeviribosi* sp. nov., isolated from a volcanic pond. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57(12):2902–7.
29. Cho E-A, Lee D-W, Cha Y-H, Lee S-J, Jung H-C, Pan J-G, Pyun Y-R. Characterization of a novel D-Lyxose isomerase from *Cohnella laeviribosii* RI-39 sp. nov. *J Bacteriol.* 2007;189(5):1655–63.
30. Kim DY, Han MK, Oh H-W, Bae KS, Jeong T-S, Kim SU, et al. Novel intracellular GH10 xylanase from *Cohnella laeviribosi* HY-21: Biocatalytic properties and alterations of substrate specificities by site-directed mutagenesis of Trp residues. *Bioresour Technol.* 2010;101(22):8814–21.
31. Shiratori H, Tagami Y, Beppu T, Ueda K. *Cohnella fontinalis* sp. nov., A xylanolytic bacterium isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60(6):1344–8.
32. Van Dyk JS, Sakka M, Sakka K, Pletschke BI. The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. *Enzyme Microb Technol.* 2009;45(3):372-8.
33. Rastogi G, Bhalla A, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR, Christopher LP, Sani RK. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour Technol.* 2010;101(22):8798–806.

34. Khianggam S, Tanasupawat S, Akaracharanya A, Kim KK, Lee KC, Lee JS. *Cohnella cellulositytica* sp. nov., isolated from buffalo faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(8):1921-5.
35. Pason P, Kyu KL, Ratanakhanokchai K. *Paenibacillus curdianolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2483-90.
36. Ogawa A, Suzumatsu A, Takizawa S, Kubota H, Sawada K, Hakamada Y, et al. Endoglucanases from *Paenibacillus* spp. form a new clan in glycoside hydrolase family 5. *J Biotechnol.* 2007;129(3):406-14.
37. Wang C-M, Shyu C-L, Ho S-P, Chiou S-H. Characterization of a novel thermophilic, cellulose-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. strain B39. *Lett Appl Microbiol.* 2008;47(1):46-53.
38. Shi P, Tian J, Yuan T, Liu X, Huang H, Bai Y, et al. *Paenibacillus* sp. strain E18 bifunctional xylanase-glucanase with a single catalytic domain. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(11):3620-4.

© 2014 Tamariz-Angeles et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=529&id=32&aid=4579>