



## Evaluación *in vitro* de celulasas producidas por cepas nativas de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez<sup>1</sup>, Juan Alejandro Pérez Bran<sup>2</sup>, Mario Alberto Uribe<sup>3</sup>.

### ■ Resumen

**Introducción:** La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, los organismos capaces de degradarlo son principalmente hongos y bacterias, ellos son reconocidos por la habilidad de producir enzimas no sólo celulasas sino también amilasas, proteasas y peptidasas entre otras; que les permite el reciclado de material orgánico de nuevo al suelo. La hidrólisis de ésta se realiza mediante un complejo enzimático llamado celulasas, constituido básicamente por tres enzimas: Endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasas. **Objetivo:** Debido a la importancia de éstas a nivel industrial, se propuso en este estudio caracterizar cepas nativas de hongos aislados de diferentes sustratos, los cuales fueron determinados como *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* y *Trichoderma reesei*, mostrando todos actividad celulolítica. **Materiales y métodos:** Esta actividad se determinó midiendo la producción de  $\beta$ -exoglucanasa,  $\beta$ -endoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. **Resultados:** *Cladosporium herbarum* presentó el nivel más alto de  $\beta$ -exoglucanasa 0.0554 UI/ml, *Aspergillus niger* mostró una alta producción de  $\beta$ -endoglucanasa 0.02463UI/ml y *Trichoderma reesei* presento la mejor actividad de  $\beta$ -glucosidasa con 0.000138UI/ml. Siendo este último el hongo de mejor actividad celulolítica. **Palabras clave:** Actividad celulolítica, endoglucanasa, exoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, celulosa.

1 MSc. Biotecnología. Profesora Corporación Universitaria Lasallista. Caldas - Antioquia

2 MSc. Biotecnología. Profesor Corporación Universitaria Lasallista. Caldas - Antioquia

3 Estudiante de Industrias Pecuarias, Corporación Universitaria Lasallista

Correspondencia: lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co

Artículo recibido: 11/10/2011; Artículo aprobado: 14/03/2012.

## Cellulases production by the use of *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger* isolations

### ■ Abstract

**Introduction:** Cellulose is the most common polysaccharide in nature. The organisms able to degrade it are mainly fungi and bacteria, known for their ability to produce not only cellulose enzymes, but also amylases, proteases and peptidases, among others, which allow them to recycle the organic material back to the soil. Cellulase hydrolysis takes place by an enzyme complex called cellulases, basically made up by three enzymes: endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$ -glucosidases.

**Objective:** Given their importance in industry, in this research it is proposed a characterization of native strains of fungi isolated from several substrates, which were determined as *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* and *Trichoderma reesei*, all of them with cellulolytic activity.

**Materials and methods:** This activity was determined by measuring the production of  $\beta$ -exoglucanase,  $\beta$ -endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase.

**Results:** *Cladosporium herbarum* had the highest  $\beta$ -exoglucanase level, 0.0554 UI/ml; *Aspergillus niger* demonstrated a high  $\beta$ -endoglucanase's production, 0.02463UI/ml, and *Trichoderma reesei* had the best  $\beta$ -glucosidase activity, with 0.000138UI/ml. The latter is the fungus with the best cellulolytic activity.

**Key words:** Cellulolytic activity, endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, cellulose.

## Produção de celulases por isolados de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* e *Aspergillus niger*

### ■ Resumo

**Introdução:** A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza; os organismos capazes de degradá-lo são principalmente fungos e bactérias, reconhecidos pela habilidade de produzir enzimas não só celulases senão também amilases, proteases e peptidases, entre outras, que lhes permitem o reciclado de material orgânico de novo ao solo. A hidrólise da celulose se leva a cabo mediante um complexo enzimático chamado celulases, constituído basicamente por três enzimas: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidases.

**Objetivo:** Devido a sua importância na indústria, propôs-se neste estudo caracterizar cepas nativas de fungos isolados de diferentes substratos, os quais foram determinados como *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* e *Trichoderma reesei*, e mostram todos atividade celulolítica.

**Materiais e métodos:** Esta atividade se determinou medindo a produção de  $\beta$ -exoglucanase,  $\beta$ -endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase.

**Resultados:** *Cladosporium herbarum* apresentou o nível mais alto de  $\beta$ -exoglucanase 0.0554 UI/ml; *Aspergillus niger* mostrou uma alta produção de  $\beta$ -endoglucanase 0.02463UI/ml, e *Trichoderma reesei* apresentou a melhor atividade de  $\beta$ -glucosidase com 0.000138UI/ml. Este último é o fungo de melhor atividade celulolítica.

**Palavras importantes:** atividade celulolítica, endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, celulose.



## ■ Introducción

La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, forma entre el 40% y 90% de las paredes celulares de las plantas y genera la mayor cantidad de residuos en la biosfera. Este homopolisacárido está conformado por varios miles de unidades de glucosa, unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. Su reciclado e hidrólisis es lenta e imposible de realizar por algunos organismos monogástricos (Adney et al. 1991). En el caso de los organismos poligástricos el desdoblamiento de la celulosa la realizan en asociación con el ecosistema microbiano quien genera las fuentes energéticas para el animal (Murashima et al. 2002; Lynd et al. 2002).

La hidrólisis de la celulosa se realiza mediante un complejo enzimático llamado celulasas, constituido principalmente por tres enzimas: endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasas, las cuales son producidas por algunos hongos y bacterias en condiciones normales; generando glucosa, principal producto que puede ser utilizado como fuente de carbono y energía por otros microorganismos fermentadores (Ponce y Pérez 2002). Estas enzimas se emplean actualmente como insumos para la industria textil, alimentaria y papelera entre otras (Vilchez 2002).

Entre los organismos con mayor actividad celulolítica se encuentran los hongos; estos presentan características importantes como rápida colonización del sustrato y remoción de productos e hidrólisis (Vilchez 2002). Son descomponedores primarios de la materia orgánica, por lo tanto su recuperación se realiza en el suelo y en materiales de compostaje (Ponce y Pérez 2002; Vilchez 2002).

Las especies de hongos con mayor capacidad celulolítica son: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Neurospora crassa* y algunos hongos comestibles

como: *Lentinula edodes*, *Volvarella sp* y *Pleurotus sp.*, entre otros (Aceves y Casimiro 2001).

En Colombia, la mayoría de las enzimas, especialmente las celulasas, empleadas en la industria son importadas, debido al déficit biotecnológico existente en el país, constituyendo una alternativa para la investigación y el desarrollo de productos de innovación.

En este estudio se aislaron diferentes cepas de hongos con actividad celulolítica de varios sustratos: lajas de madera, hojas de bambú y hojarasca de mango, y se evaluó la actividad enzimática  $\beta$ -exoglucanasa y  $\beta$ -endoglucanasa *in Vitro* determinando azúcares reductores por el método de Millar (1959) del ácido dinitrosalicílico DNS y actividad  $\beta$ -glucosidasa, evaluando glucosa por el método enzimático glucosa-oxidasa GO (Ghose 1987).

## ■ Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Química, Biotecnología y Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista.

La investigación se inició colectando tres muestras de celulosa en descomposición: lajas de madera, hojas de bambú y hojarasca de mango; de estas se aislaron diferentes tipos de hongos, empleando diluciones de 10<sup>-1</sup> homogenizadas en agitador a 200rpm durante 1 hora.

**Aislamiento y purificación:** Se prepararon cuatro medios de cultivo comerciales: agar Sabouraud (Sigma Aldrich Química, Colombia) + CMC (carboximetilcelulosa) al 20%, agar PDA (agar papa dextrosa), agar Czapeck, Agar Mohagheghi.; y agar Celulosa; este último obtenido directamente de las hojas de maní forrajero 20g por cada 100ml de agua desionizada y 2% de agar agar.

Se inocularon 0,1 ml de la dilución 10-1 de cada muestra sobre cada medio de cultivo propuesto, excepto en el medio de celulosa. Se incubaron por 8 días a temperatura ambiente y a 30 °C. Al cabo de este tiempo las colonias que crecieron en los diferentes medios se purificaron, hasta obtener un aislado puro.

**Cultivo de cepas nativas:** Una vez aislados, purificados y caracterizados los hongos, se procedieron a cultivar directamente en agar celulosa y se incubaron a temperatura ambiente y a 30°C. Los aislados que crecieron en este medio se caracterizaron tanto morfológica como fisiológicamente en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; en esta caracterización se observaron estructuras macroscópicas, microscópicas y reproductoras.

**Evaluación cualitativa de celulasas:** Las cepas de hongos nativos caracterizados se sometieron a una evaluación cualitativa de producción de celulasas, detectados por la presencia de halos claros alrededor de la colonia cuando se adicionaba rojo congo al 5% como agente revelador. La caracterización enzimática se determinó por la actividad  $\beta$ -exoglucanasa con celulosa cristalina, la actividad  $\beta$ -endoglucanasa con carboximetilcelulosa CMC; determinando azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Millar 1959). La actividad

$\beta$ -glucosidasa se evaluó a través del método enzimático glucosa oxidasa GO (Ghose 1987).

Se hicieron tres repeticiones de cada experimento; y se determinó por análisis de varianza si había diferencias significativas en la producción de las tres enzimas por los tres hongos evaluados.

**Resultados:** En los diferentes medios de cultivo utilizados se recuperaron hongos de los tres sustratos empleados. La mayor variabilidad de hongos aislados se obtuvo de hojas de bambú, al compararse con los aislados de las hojas de mango y las lajas de madera.

El medio de cultivo que más recuperó microorganismos de los tres tipos de sustratos fue el de Sabourand, suplementado con carboximetil celulosa; el medio que menos recuperó colonias de hongos fue el propuesto por Mohagueghi; seguido del medio de celulosa. En el cuadro 1 se observan el número de colonias recuperadas en cada uno de los experimentos. La variabilidad observada en estos resultados se obtuvo probablemente a la diferencia en las fuentes de carbono de los medios de cultivo empleados los cuales fueron tanto orgánicos como inorgánicos.

Los aislados obtenidos en el primer tamizaje se cultivaron de nuevo en agar celulosa; estos fueron clasificados según observaciones macroscópicas

**Cuadro 1.** Conteo de colonias de hongos aislados en los diferentes medios de cultivo utilizados  
Fuente: Datos originales de los autores

Sustrato/medio de cultivo	PDA	CZAPECK	SABORAUD+ CMC 20%	CELULOSA	MOHAGHEGHI
Lajas de Madera	10	15	23	0	2
Hojas de Bambú	14	17	30	0	3
Hojas de mango	6	9	12	0	1

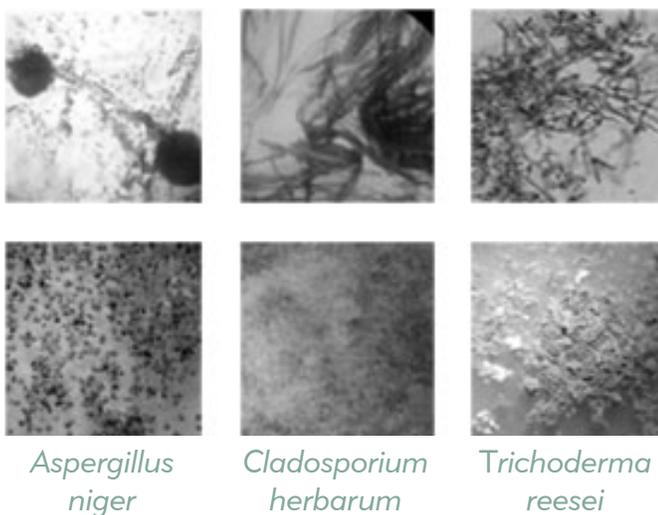


y microscópicas de las colonias como *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* . y *Trichoderma reesei* tal como aparece en la figura 1.

La producción de celulasas con rojo congo, mostró halos claros alrededor de las colonias en los tres microorganismos, encontrándose un halo de 5cm en *Trichoderma reesei*, seguido de uno de 3cm en *Aspergillus niger*.

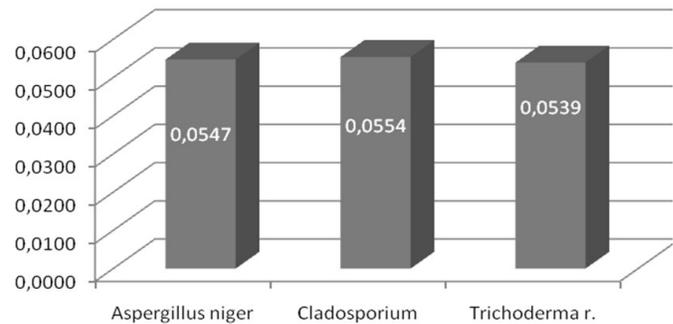
**Figura 1:** presentación macro y microscópica de los tres tipos de microorganismos

**Fuente:** Fotografía obtenida por los autores.



En la evaluación de la actividad enzimática  $\beta$ -exoglucanasa y  $\beta$ -endoglucanasa se implementó el método espectrofotométrico para determinar azúcares reductores empleando el reactivo DNS. La actividad de exoglucanasa para los tres aislados, no mostró diferencias significativas en los tres aislados. La actividad de *Cladosporium* sp fue 0.0554 UI/ml,  $\mu$ mol de glucosa producida/(min.ml de extracto), seguido de *Aspergillus niger* con 0,0547 UI/ml y posteriormente *Trichoderma* sp con 0,0539 UI/ml tal como se muestra en la grafico 1.

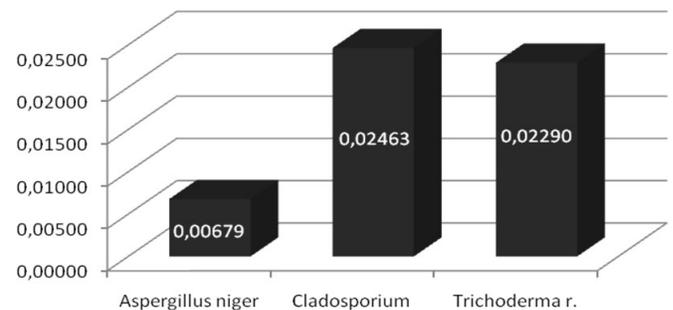
## Actividad $\beta$ -exoglucanasa en UI/ml



**Grafico 1:** Actividad  $\beta$ -exoglucanasa de los hongos *Aspergillus niger*, *cladosporium* y *Trichoderma reesei*.

En el grafico 2 se observa la actividad endoglucanasa, encontrándose que el índice más alto de producción enzimática se presentó en *Cladosporium herbarum*, 0,02463 UI/ml, siguiendo el *Trichoderma reesei* con 0.0229 UI/ml; mientras el más bajo lo presentó *Aspergillus niger* con 0.00679 UI/ml.

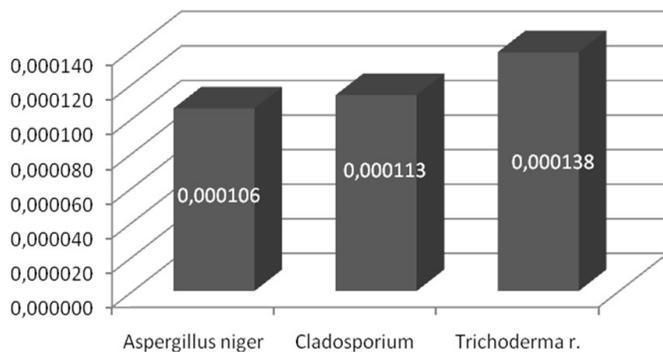
## Actividad $\beta$ -endoglucanasa en UI/ml



**Grafico 2:** Actividad  $\beta$ -endoglucanasa de los hongos *Aspergillus niger*, *Cladosporium* y *Trichoderma reesei*.

Cuando se determinó la enzima  $\beta$ -glucosidasa con el método espectrofotométrico de glucosa-oxidasa (GO), tal como se muestran en el grafico 3 los resultados no arrojaron diferencias significativas en los tres tipos de hongos, encontrando que el nivel menor de producción enzimática la tuvo *Aspergillus niger* con 0,000106 UI/ml.

## Actividad $\beta$ -Glucosidasa en UI/ml



**Grafico 3:** Actividad  $\beta$ -glucosidasa de los hongos *Aspergillus niger*, *Cladosporium* y *Trichoderma reesei*.

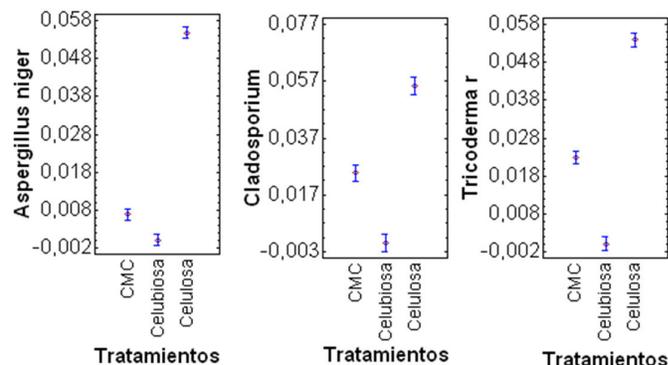
En la tabla 1 se observa el análisis de varianza para las variables respuestas (*A.niger*, *C.herbarum* y *T.reesei*). Los tratamientos presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), al evaluar la producción de enzimas en los tres medios diferente.

**Tabla 1.** Análisis de Varianza para la producción de enzimas de los tres hongos en los tres medios

Variable respuesta	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<i>A. niger</i>	Tratamientos	0,00532715	2	0,00266358	1243,37	0,0000
	Residuo	0,0000128534	6	0,00000214223		
	Total	0,00534	8			
	$R^2 = 99,75\%$					
<i>C. herbarum</i>	Tratamientos	0,00459865	2	0,00229932	267,61	0,0000
	Residuo	0,0000515527	6	0,00000859212		
	Total	0,0046502	8			
	$R^2 = 98,89\%$					
<i>T. reesei</i>	Tratamientos	0,00437511	2	0,00218756	711,01	0,0000
	Residuo	0,0000184601	6	0,00000307668		
	Total	0,00439357	8			
	$R^2 = 99,57\%$					

En la figura 2 se observa los intervalos LSD, con un nivel de confianza del 95%. El tratamiento con celulosa en los tres hongos, presenta el mayor nivel de respuesta, tanto en *Aspergillus niger* como *Trichoderma reesei*.

**Figura 2.** Intervalos LSD para *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* y *Trichoderma reesei* en los tres medios evaluados





**Discusión:** El medio de cultivo que permitió la mayor recuperación de hongos celulósicos fue el agar Saboraud + CMC al 20%, debido a su composición química, ya que es rico en fuentes de nitrógeno y carbono que facilitan la degradación por parte de muchos microorganismos. El sustrato que mas presentó diversidad microbiana fue el bambú, debido posiblemente a la relación lignina-celulosa que tiene este sustrato, donde además de poder sobrevivir hongos con actividad sobre la celulosa, también lo pueden hacer sobre la lignina; generando de esta forma el mayor índice de descomposición.

Una vez fueron caracterizados los aislados fúngicos como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* y *Cladosporium herbarum*; se compararon estos resultados con otros reportados por Elosegui (2006) quien aisló *Trichoderma reesei* sobre tejidos vegetales en descomposición, observando dominancia de éste en los suelos, debido a su naturaleza agresiva y su capacidad metabólica para competir con otros organismos patógenos, además de presentar capacidad de parasitar a otros hongos, producir celulasas y antibiosis.

Estudios similares se realizaron en la sabana de Bogotá por Cruz et al. (2009), en donde encontraron 46 microorganismos con potencial para degradar xilano siendo promisorios el hongo *Aspergillus niger* y *Cladosporium* aislado del compost, mostrando *Aspergillus niger* una alta producción *in Vitro* de celulasas degradadoras del sustrato.

En trabajos realizados por Gao et al. (2008), encontraron que los géneros con el mayor índice de producción de celulasas fue *A.niger* y *A.terreus*, resultados que corroboran los encontrados en esta investigación donde la misma especie de *Aspergillus niger* exhibió un comportamiento similar.

Los tres aislados fúngicos mostraron actividades

$\beta$ -exoglucanasas similares, no hubo diferencias significativas en su evaluación, comportamiento también observado por Boer et al. (2000) en donde *Trichoderma* y *Aspergillus*, en ensayos de hidrólisis de la celulosa con celulasas, mostraron las mejores perspectivas de actividad enzimática en presencia de celulosa cristalina. Así mismo Cuivero y colaboradores en 2001 reportaron que *Trichoerma reesei* produce altos niveles de celulasas cuando se comparó con otros mohos aislados de frutas en Zimbague, hongos que no mostraron degradación de la celulosa en los medios de cultivo ricos en este polisacárido. La  $\beta$ -exoglucanasa producida por este hongo se excreta de forma extracelularmente favoreciendo la hidrólisis de celulosa amorfa y cristalina.

La actividad endoglucanasa de los hongos *T.reesei* y *C.herbarum* fue mayor que en *A.niger*, mostrando que estas enzimas producen una mayor reducción en el grado de polimerización de la celulosa, principalmente en la zona amorfa de la estructura polimérica (Montoya 2008).

Los resultados alcanzados en esta investigación fueron semejantes a los obtenidos por Vilchez (2002), con las especies de *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*; sin embargo éste muestra variaciones significativas en la actividad exoglucanasa de estos hongos (0.028 UI/ml para *Cladosporium herbarum* y 0,073 y 0,014 UI/ml para *Aspergillus niger* ). Las actividades resultan ser bajas respecto a otros trabajos (Vilchez 2002; Murali et al 1994), esto es debido a que no se trabajó optimización del medio de cultivo suplementado con fuente de carbono y nitrógeno adicionales, sustancias surfactantes, aireación, y agitación, entre otros, los cuales mejorarían sustancialmente la actividad celulolítica de los hongos (Abrha y Gashe 1992); además el uso de otros carbohidratos como la lactosa mejorarían la expresión de las enzimas y el tween 80 estimularía la secreción de las celulasas al medio extracelular (Ramírez 2003).

La etapa determinante del proceso es la hidrólisis de celubiosa y oligoglucósidos de cadena corta por la  $\beta$ -glucosidasa debido a que su actividad resultó mucho menor que la demás actividades celulolíticas, este mismo resultado se observó en el trabajo realizado por Montoya (2008). Por lo tanto, resulta el *Trichoderma reesei* como la cepa de mayor potencial celulolítico al presentar una diferencia significativa respecto a las otras dos especies en la actividad  $\beta$ -glucosidasa, esta característica se corrobora con los análisis estadísticos en cuales muestra diferencias significativas en la producción de enzimas en los tres medios de cultivo; así mismo en los análisis de Intervalos se muestra *T.reesei* como el hongo con mayor de producción de enzimas especialmente en un medio de cultivo como la celulosa.

## ■ Conclusiones

Los aislados nativos recuperados de los tres sustratos evaluados; lajas de madera, hojas de Bambú y hojas de mango fueron *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* y *Trichoderma reesei*; ellos mostraron actividad celulolítica en medios de cultivo ricos en celulosa como fuente de carbono. El mejor perfil de producción de celulasas, lo mostró el hongo *Trichoderma reesei*. De acuerdo a los resultados la mayor actividad de  $\beta$ -exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa se observó en *Trichoderma reesei*; y en *Cladosporium herbarum*; solo se observó una buena actividad de  $\beta$ -exoglucanasa, es importante además que *Aspergillus niger* mostro producción de las tres enzimas, evidencias similares fueron publicadas por Gaoen 2008.

## ■ Agradecimientos

Los investigadores agradecen a la Corporación Universitaria Lasallista, por su aporte en la financiación de este proyecto.

## ■ Referencias

- Abrha B., Gashe B.A. (1992). Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. World J. Microbiol. And Biotech. 8: 73-75.
- Aceves M., Casimiro A. (2001). Cepas nativas de *Trichoderma reesei* (euascomicetes: hipocreales), su antibiosis y micoparasitismos sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (hyphomycetes: hyphales). Tecoman, Colima, México. Universidad de Colima, Doctorado en ciencias: área biotecnología. p176. [En línea] [http://digeset.uco.mx/tesis\\_posgrado/Pdf/Alejandro%20Casimiro%20Michel%20Aceves.PDF](http://digeset.uco.mx/tesis_posgrado/Pdf/Alejandro%20Casimiro%20Michel%20Aceves.PDF). [Citado el 14 de Diciembre de 2010].
- Adney W.S., Rivard C.J., Ming S., Himmel M.E. (1991). Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes: cellulases and related enzymes. Appl. Biochem. and Biotechnol. 30(2):165-183.
- Boer H., Teeri T. T., Koivula A. (2000). Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. Biotechnol Bioeng. 69 (5): 486-494.
- Chivero E., Mutukumira A., Zvauya R. (2001). Partial Purification And Characterization Of A Xylanase Enzyme Produced By A Micro-Organism Isolated From Selected Indigenous Fruits Of Zimbabwe. Food Chem. 72:179-185.
- Cruz Norella., Castellanos D., Argüello A.H. (2009). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. Revista colombiana de ciencias hortícolas 3 (2): 237-249.
- Elósegui O. (2006). Métodos Artesanales de Producción de Bioplaguicidas a partir de hongos Entomopatógenos y Antagonistas. Ciudad de la



Habana, Cuba. [En línea]. <http://www.inisav.cu/OtrasPub/METODOS%20ARTESANALES%20DE%20PRODUCCION%20DE%20BIOPLAGUICIDAS.pdf>. [Citado el 10 de Diciembre de 2010]

Gao J. M., Weng H. B., Zhu D. H., Yuan M. X., Guan F. X, Xi Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresour. Technol.* 99: 7623-7629.

Ghose T. K. (1987). Measurements of cellulase activities. IUPAC. Applied chemistry division commission on biotechnology. *Pure & Appl. Chem.* 59 (2): 257-268.

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

Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Montoya, S. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa. Manizales, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales. Maestría en Ingeniería. p96. [En línea]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/956/1/sandramontoyabarreto.2008.pdf>. [Citado el 10

de Diciembre de 2010]

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

Ponce, T.; Pérez, O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. En *Avance y Perspectiva* [En línea] vol. 21 septiembre-octubre. <http://www.cinvestav.mx/Portals/0/Publicaciones%20y%20Noticias/Revistas/Avance%20y%20perspectiva/sep02/4%20CELULASAS.pdf>. [Citado el 14 de Diciembre de 2010]

Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Bioinformática de celulasas. [En línea]. [http://recursostic.javeriana.edu.co/wiki/index.php/Bioinform%C3%A1tica\\_de\\_Celulasas](http://recursostic.javeriana.edu.co/wiki/index.php/Bioinform%C3%A1tica_de_Celulasas). [Citado el 9 de Julio de 2010]

Ramírez P.; Coba J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev. Perú Biol.* 10 (1):67-77

Vilches P.L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaras. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p77. [En línea] [http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bibvirtual/Tesis/Basic/Vilches\\_P\\_L/introducci%C3%B3n.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bibvirtual/Tesis/Basic/Vilches_P_L/introducci%C3%B3n.htm). [Citado el 14 de Diciembre de 2010].