



**CARACTERIZACIÓN DE  $\beta$ -GLUCOSIDASAS PRODUCIDAS POR *Aspergillus niger* ATCC 1004 EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

**CHARACTERIZATION OF  $\beta$ -GLUCOSIDASES PRODUCED BY *Aspergillus niger* ATCC 1004 IN SUBMERGED FERMENTATION FROM SUGARCANE BAGASSE**

D. Simas-Dias<sup>1</sup>, L.Y. Acevedo-Jaramillo<sup>1\*</sup>, U. Vasconcelos<sup>2</sup>, N. Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biorrosión, Biodegradación y Biosíntesis, Escuela de Química, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, Centro de Tecnologia, bloco E, sala 109, CEP. 21941-914, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup>Departamentode Biotecnología, Centro de Biotecnología, Universidade Federal de Paraíba, Campus I, Castelo Branco, CEP. 58051-900, João Pessoa, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Química, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, Centro de Tecnologia, bloco E, sala 203, CEP. 21941-914, Rio de Janeiro, Brasil.

Recibido 20 de septiembre de 2017; Accepted 9 de Noviembre de 2017

### Resumen

El costo de las enzimas comerciales es un factor limitante para la producción de bioproductos a partir de materiales lignocelulósicos, siendo necesario estudios de catálisis enzimática direccionados a la obtención de enzimas celulolíticas a partir de materias primas de bajo costo. En este sentido, las enzimas  $\beta$ -glucosidasas producidas por *Aspergillus niger* ATCC 1004 durante fermentación sumergida a partir de bagazo de caña de azúcar se caracterizaron de acuerdo a la estabilidad en diferentes temperaturas; la evaluación del efecto combinado del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática y el perfil electroforético. El concentrado enzimático mostró alta estabilidad en 4°C y 37°C. Los mayores valores de actividad enzimática se alcanzaron en los intervalos de 47 - 52.7 °C de temperatura y 3.6 - 5.2 de pH. Se identificaron dos tipos de  $\beta$ -glucosidasas, con masas moleculares 167.9 y 119.0 kDa estimadas mediante SDS-PAGE. De esta forma, las características del concentrado de  $\beta$ -glucosidasas sugieren su aplicación en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas.

**Palabras clave:** material lignocelulósico, enzimas celulíticas, estabilidad térmica, actividad enzimática.

### Abstract

The cost of commercial enzymes is a limiting factor for the production of bioproducts from lignocellulosic materials, encouraging studies of enzymatic catalysis in order to obtain cellulolytic enzymes from low cost raw materials.  $\beta$ -glucosidase enzymes produced by *Aspergillus niger* ATCC 1004 using submerged fermentation and sugarcane bagasse as carbon source was characterized in terms of stability at different temperatures, activity by combining the effect of pH and temperature, and electrophoretic profile. The enzymatic concentrate was highly stable at 4°C and 37°C. The highest enzymatic activities were achieved in the temperature and pH range between 47.0- 52.7°C and 3.6-5.2 respectively. Two types of  $\beta$ -glucosidasas were verified and their weights of 167.9 and 119.0 kDa were estimated by SDS-PAGE. The characteristics presented by the  $\beta$ -glucosidase concentrate suggests its application in simultaneous saccharification and fermentation processes.

**Keywords:** lignocellulosic materials, cellulolytic enzymes, thermal stability, enzymatic activity.

## 1 Introducción

La búsqueda de alternativas para reducción de los impactos ambientales ha llevado al surgimiento de investigaciones direccionadas al desarrollo de métodos de contención de emisiones y de tecnologías para la obtención de biocombustibles y sustancias químicas

dentro de la química verde. Todo esto asociado a la reducción del consumo de energía, al aumento de la eficiencia de conversión y utilización de materias primas alternativas como residuos agroindustriales, entre ellos, los materiales lignocelulósicos (Liao y col., 2015; Rodrigues y col., 2017; Marques y col., 2017).

Siguiendo esta línea, la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, denominada

\* Autora para la correspondencia. E-mail: lizethacevedo@eq.ufrj.br  
doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Simas  
issn-e: 2395-8472

producción de segunda generación (2G) se presenta como alternativa biotecnológica, donde la materia prima no tiene ningún tipo de competencia alimento contra energía y adicionalmente es de bajo costo, en comparación con las materias primas tradicionales (Balat y col., 2008; Liao y col., 2015; Ferraz y col., 2017). A pesar de que la conversión biológica a partir de materiales lignocelulósicos ofrece numerosos beneficios, el desarrollo a gran escala de este proceso se encuentra limitado por factores económicos y tecnológicos, relacionados principalmente con el pretratamiento del material y la producción de enzimas para disponibilización de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática (Alvira y col., 2010; González y col., 2011).

Los materiales lignocelulósicos están formados por dos estructuras de polisacáridos, la celulosa y la hemicelulosa, las cuales se encuentran asociadas a una estructura aromática denominada lignina, que se presenta como un material recalcitrante que no permite una disponibilidad natural y simple de los azúcares para bioconversión. El uso de pretratamientos permite la remoción de la lignina y la hemicelulosa, aumentando la porosidad de la fracción celulósica, facilitando el acceso de las enzimas para el proceso de hidrólisis que lleva a la obtención de glucosa para fermentación (Cardona y col., 2010; González y col., 2011; Santos y col., 2016).

La hidrólisis enzimática de la celulosa es conducida por enzimas celulolíticas llamadas celulasas, las cuales son un complejo enzimático formado por tres grupos principales: (i) las endoglucanasas, que atacan las regiones de baja cristalinidad; (ii) las exoglucanasas, que degradan las moléculas, generando celubiosa por acción en los terminales reductores y no reductores; (iii) las  $\beta$ -glucosidasas, que hidrolizan la celubiosa produciendo la liberación de moléculas de glucosa (Santos y col., 2016; Rodrigues y col., 2017). Estos grupos enzimáticos presentan diferente especificidad y modo de acción, siendo que su acción conjunta genera un sinergismo durante el proceso de hidrólisis. En este complejo enzimático, las  $\beta$ -glucosidasas contribuyen con la eficiencia del proceso una vez que reducen la inhibición de la celubiosa sobre las exoglucanasas (Arantes y Saddler, 2010; Junior y col., 2014; Liao y col., 2015; Abdella y col., 2016). Adicional a su uso en la hidrólisis de la fracción celulósica de materiales lignocelulósicos, las  $\beta$ -glucosidasas tienen otras aplicaciones industriales como la hidrólisis de glucósidos de isoflavonas para la producción de agliconas y para la liberación de hidroxitirosol de

subproducto de oliva (Quian y col., 2012; Abdella y col., 2016).

Algunas bacterias y hongos filamentosos presentan capacidad de producción de diferentes tipos de enzimas en forma de cocteles enzimáticos que pueden presentar la mezcla de diversos tipos de enzimas (Ramos y col., 2017). En el caso de bacterias, la capacidad de producción de celulasas es baja, llevando a que los estudios para producción de estas enzimas se encuentre direccionado al uso de hongos filamentosos, como especies de *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Sun y Cheng., 2002; Balat., 2011; Brito y col., 2017). Los cocteles enzimáticos producidos comercialmente por *Trichoderma reesei* presentan alta actividad de endoglucanasas y exoglucanasas, pero la cantidad de  $\beta$ -glucosidasas no es suficiente para una eficiente conversión de la biomasa, siendo necesaria la complementación con  $\beta$ -glucosidasas (Liao y col., 2015; Abdella y col., 2016).

Diferentes especies de hongos filamentosos como *Penicillium* y *Aspergillus* presentan capacidad para producción de  $\beta$ -glucosidasas (Moretti y col., 2012). Entre ellos, las mejores producciones son observadas con el uso de especies de *Aspergillus* a partir de substratos tradicionales. Para el caso de la producción de  $\beta$ -glucosidasas a partir de residuos agroindustriales, la eficiencia y características de las enzimas producidas se encuentran influenciadas por el tipo de cepa microbiana usada y las condiciones de cultivo (Quian y col., 2012).

En este contexto, una alternativa para la viabilidad económica de bioprocesos de segunda generación es la producción de enzimas a partir de materiales de bajo costo para formulación de cócteles enzimáticos. De esta forma, el objetivo de este trabajo era la caracterización de las  $\beta$ -glucosidasas producidas por *Aspergillus niger* ATCC 1004 a partir de bagazo de caña de azúcar, incluyendo estudios de estabilidad térmica, electroforesis y del efecto combinado del pH y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasica.

## 2 Metodología y materiales

### 2.1 Micro-organismo

En este estudio se utilizó una cepa de *Aspergillus niger* ATCC 1004. Para su conservación se realizaron repiques periódicos en medio Agar Papa Dextrosa (*Potato Dextrose Agar*, PDA). Las esporas para realización de los experimento se obtuvieron después

que el micro-organismo se cultivó en medio PDA a 30°C por 10 días, posteriormente las esporas se removieron por raspaje de forma aséptica con 10 mL de agua destilada estéril y la suspensión se colocó en tubos Eppendorf estériles con solución de glicerol al 20% para conservación y almacenada bajo refrigeración a 4 °C.

## 2.2 Pretratamiento del bagazo de caña

El material lignocelulósico se lavó, secó y molió. Se realizó una etapa de pretratamiento con ácido sulfúrico (1% v/v) a 121°C por 40 min para hidrólisis de la fracción hemicelulósica, el material resultante denominado lignocelulosa se lavó para eliminación del ácido y la hemicelulosa residual. El pH del material se ajustó en un valor de 5.0 y posteriormente secado. La lignocelulosa se sometió a un pretratamiento alcalino con una solución de hidróxido de sodio (0.5 mol/L) a 121°C por 30 min, posteriormente la lignina se removió mediante lavados sucesivos, el pH ajustado en un valor de 5.0 y secada. Finalmente el material resultante, denominado lignocelulosa parcialmente deslignificada se molió, quedando a disposición para la etapa de producción.

## 2.3 Producción del complejo enzimático

La producción enzimática por *Aspergillus niger* ATCC 1004 se llevó a cabo por fermentación sumergida en biorreactor (BioFlo®310, New Brunswick Scientific) con condiciones de operación controladas: temperatura 28°C, oxígeno disuelto 30%, pH 4.0 y volumen de trabajo de 3.0 L. El medio de producción contiene: extracto de levadura (10.0 g/L), lignocelulosa parcialmente deslignificada (7.5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4.3 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.0 g/L) y tween-80 (7 mL/L). Este medio se esterilizó a 121°C por 20 min. Se empleó un inóculo líquido (10% v/v) proveniente de un pre-inóculo obtenido a partir de 1 mL de solución de esporas. El tiempo de fermentación es de 107 horas y el complejo celulásico producido, denominado de extracto crudo se concentró utilizando un sistema de filtración tangencial Hollow Fiber® (*Quix stand GE Healthcare*, São Paulo, Brasil) de membranas de polisulfona.

## 2.4 Determinación de la actividad $\beta$ -glucosidásica y contenido de proteínas

La actividad  $\beta$ -glucosidásica se determinó incubando a 50°C por 15 min la mezcla compuesta por 50  $\mu$ L del

extracto enzimático y 50  $\mu$ L de solución de celubiosa (2% preparada en tampón de citrato de sodio 0.1 M /pH 5.0), la reacción se detuvo colocando las muestras en agua en ebullición durante 10 min. Posteriormente se adicionó 1 mL de reactivo enzimático glucosa-oxidasa y la muestra fue incubada a 37°C por 15 min. Finalmente se adicionaron 910  $\mu$ L de agua destilada y se realizó la lectura de absorbancia a 505 nm en espectrofotómetro SpectrumLab 22pc. La actividad  $\beta$ -glucosidásica se expresó en unidades internacionales (UI), donde una unidad equivale a la cantidad de extracto enzimático necesario para liberar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto (Ghose, 1987). Las muestras se analizaron por triplicado.

Para la determinación del contenido total de proteínas solubles se utilizó un Kit de proteínas comercial de Biorad, basado en el método de Bradford (1976), teniendo como estándar albumina bovina. Se adicionaron 800  $\mu$ L del extracto enzimático diluido y 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford (Kit-BioRad), la mezcla se incubó a 25 °C por 5 min, seguido de la lectura de absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro SpectrumLab 22pc. El factor de dilución varió dependiendo de cada muestra, siendo 100 el valor máximo.

## 2.5 Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la actividad  $\beta$ -glucosidásica se evaluó a través de la incubación del concentrado crudo a temperaturas de 37 y 50°C. Muestras para determinación de la actividad enzimática se tomaron cada tres horas durante las primeras 24 horas y posteriormente cada 24 horas por 16 días. La estabilidad de la actividad  $\beta$ -glucosidásica del concentrado crudo se verificó para la temperatura de almacenamiento (4°C) por un periodo de 60 días.

## 2.6 Influencia combinada del pH y la temperatura sobre el concentrado enzimático

Para estudiar el efecto combinado del pH y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidásica del concentrado enzimático se planteó un diseño Compuesto Central Rotacional (*Central Composite Rotational Design CCRD*), donde el pH y la temperatura actuaron como variables independientes y la actividad  $\beta$ -glucosidásica como variable dependiente o de respuesta.

## 2.7 Análisis electroforética

Para la separación electroforética se utilizó un sistema de electroforesis vertical a temperatura de 25°C, utilizando gel separador de poliacrilamida 15% y gel apilador 4% (SDS-PAGE). Luego de la electroforesis, el gel SDS-PAGE se sumergió en una solución colorante *Coomassie blue* por tres horas, seguido de una decoloración con solución de ácido acético al 10%. Posterior a la separación de proteínas y para relevación de las bandas, el gel de zimograma se sumergió en una solución Triton X-100 (1%) durante 20 minutos y lavado con agua ultrapura seguida de una solución tampón de citrato de sodio 50 mM/pH 5.0 por 20 minutos para eliminar el SDS. Para revelar las bandas se empleó una solución de *esculin* 0.1 % (6,7-dihydroxycoumarin 6- glucosida) con incubación a 50°C por 30 min acompañada de agitación, finalmente se adicionó la solución de clorito de hierro (0.03%) a temperatura ambiente (Kwon y col., 1994). El gel fue analizado con el software *Gel-Pro Analyze (Media Cybernetics)* para estimación de las masas moleculares y la caracterización de proteínas se llevó a cabo por comparación de patrones *Full-range Rainbow*.

### 2.7.1 Diseño experimental y análisis estadístico

El efecto combinado del pH y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidásica del concentrado enzimático se analizó usando un diseño Compuesto Central Rotacional (CCRD), compuesto de 4 experimentos factoriales, 4 puntos axiales y 3 puntos centrales. En este diseño el pH y la temperatura corresponden a las variables independientes y la actividad  $\beta$ -glucosidásica es la variable de respuesta. Los resultados se analizaron con un Diagrama de Pareto y un Análisis de Varianza (ANOVA) con 5% de nivel de significancia, utilizando los software STATISTICA® v.7.0 (Statsoft, USA) y DESIGN-EXPERT® v.7.0 (Stat-Ease, USA).

## 3 Resultados y discusión

El extracto crudo producido presentó 16.0 U/mg de proteínas, un valor de actividad enzimática  $\beta$ -glucosidásica de 4882 U/L y una concentración final de proteínas de 309 g/mL. Estos resultados se presentan similares a los obtenidos por Sohail y col. (2009) para la producción de celulasas por *Aspergillus* MS82 en las mejores condiciones encontradas. La

producción enzimática realizada en modo batch por 107 horas presentó un comportamiento lineal, sin presencia de una fase de adaptación prolongada, contrario a lo observado por Abdella y col. (2016) donde la producción de  $\beta$ -glucosidasas por *Aspergillus niger* NRRL 3112 inició luego de 72 horas de fermentación con 5400 U/L para 240 horas de proceso, usando células libres a partir de salvado de trigo y glicerol. Para el concentrado enzimático se alcanzó un valor de actividad enzimática  $\beta$ -glucosidásica de 49331 U/L. Durante la separación del material microbiológico se registraron pérdidas alrededor de 12% ocasionadas por la retención de material conteniendo proteínas en el sistema de filtración.

La actividad  $\beta$ -glucosidásica obtenida para el extracto crudo en el presente trabajo se presenta favorable en comparación con resultados reportados en la literatura para diferentes especies y cepas de hongos, utilizando diferentes sustratos, en diversas condiciones y modos de fermentación. Lan y col. (2013) presentaron la producción de  $\beta$ -glucosidasas por *T. viridi* a partir de bagazo de caña y salvado de trigo en fermentación sumergida, obteniendo 260 U/L. Usando *P. simplicissimum* y a partir de diversos materiales lignocelulósicos Bai y col. (2013) indicaron 150 U/L. La cepa *P. janthinellum* usada por Sharma y col. (2015) presentó una producción máxima de 3100 U/L usando salvado de arroz. De Cassia (2015) trabajó con fermentación en estado sólido para producción de  $\beta$ -glucosidasas por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 a partir de harina de soya, obteniendo 2400 U/L. Vasconcellos y col. (2015) presentaron la producción por *A. oryzae* 3T5B8 a partir de bagazo de caña, obteniendo 5000 U/L para fermentación sumergida y 1900 U/L para fermentación en estado sólido.

Valores mayores de actividad  $\beta$ -glucosidásica pueden ser encontrados en la literatura, asociados principalmente al uso de micro-organismos genéticamente modificados y fermentación en estado sólido. Sin embargo la producción a escala industrial relacionada al uso de micro-organismos modificados puede estar limitada por las normas de bioseguridad, que buscan garantizar la protección de la salud humana, del medio ambiente y de la diversidad biológica, respecto de los efectos adversos que podrían causarles las actividades con micro-organismos modificados, esto incluye la evaluación de riesgos en relación con los micro-organismos modificados y los sistemas de expresión biológica, el uso de cámaras de seguridad biológica y medidas de contención, como barreras físicas y/o combinación de con barreras

químicas o biológicas, adicional a los problemas relacionados con estabilidad genética (OMS, 2005; DOF 06-03-2009). Por otro lado, la producción industrial en estado sólido es de difícil escalamiento, teniendo en cuenta los problemas relacionados con la esterilización del sustrato, el control de las variables operacionales como temperatura, pH, humedad, agitación y aeración; también existe la necesidad de grandes cantidades de inóculo, dificultad para determinación del crecimiento microbiano y mantenimiento de la pureza de los cultivos; se requiere de grandes espacios físicos, prolongados tiempos de operación con dificultad para recuperación del producto (Pandey, 2003; Jackson y col., 2004; Couto y Sanromán, 2006; Mitchell y col., 2011).

De esta forma es importante continuar con estudios de producción, optimización y caracterización de enzimas por fermentación sumergida, la cual puede ser realizada en diferentes modos de operación como lote alimentado y operación continua, que permiten disminuir problemas de inhibición y aumentar los rendimientos. Así, los resultados sugieren la alta capacidad de producción de  $\beta$ -glucosidasas por *Aspergillus niger* ATCC 1004 a partir de material lignocelulósico, lo que presenta beneficios económicos y ambientales.

### 3.1 Evaluación de la estabilidad del concentrado enzimático

Las propiedades de las enzimas producidas microbiológicamente dependen del micro-organismo productor y las condiciones del proceso de producción, de esta forma, la caracterización del complejo enzimático producido por *Aspergillus niger* ATCC 1004 es fundamental para conocer su comportamiento y direccionar las posibles aplicaciones y condiciones de trabajo. En la Fig. 1 (a) se presenta la estabilidad de la actividad  $\beta$ -glucosidasica del concentrado enzimático crudo para las temperaturas de 37 y 50°C, se observa que en 37°C se presentó, con una pérdida de solo 3% de la actividad inicial durante las primeras 3 horas y a partir de 6 horas se entra en una fase de estabilización con 87% de actividad residual. Para la temperatura de 50°C se observó que durante este mismo periodo de tiempo se presentó una notoria disminución de la actividad  $\beta$ -glucosidasica, llegando a 30% de actividad residual con un tiempo de vida medio de 2 horas. La pérdida de actividad continuó de forma menos acentuada durante el transcurso del tiempo llegando a menos de 5% de actividad residual a partir de 15 horas, siendo el ensayo

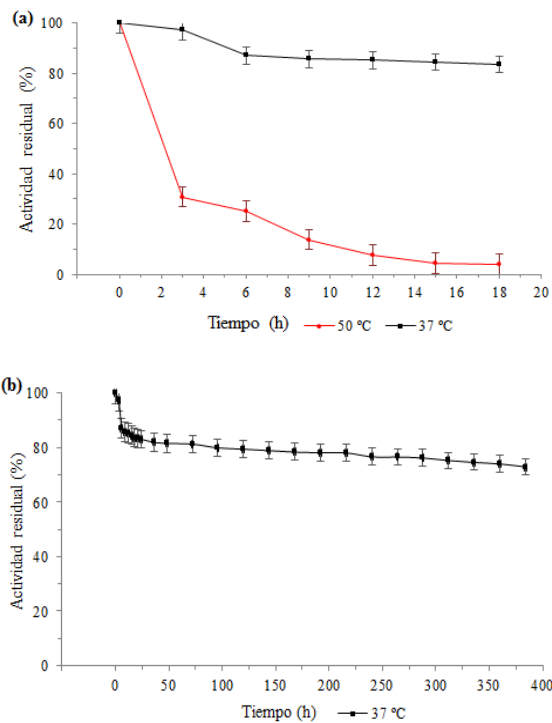


Fig. 1. Estabilidad térmica para la actividad  $\beta$ -glucosidasica del concentrado enzimático crudo producido *A. niger* ATCC 1004, expresada como actividad residual (%). Actividad  $\beta$ -glucosidasica inicial 56407 U/L. Muestras analizadas por triplicado. (a) temperaturas de 37 y 50°C por 18 horas; (b) temperatura de 37°C por 384 horas.

de estabilidad a 50°C detenido con 18 horas. La evaluación de estabilidad a 37°C continuó por un tiempo total de 384 horas, como se presenta en la Fig. 1 (b), durante las primeras horas se observó una ligera pérdida de actividad  $\beta$ -glucosidasica del concentrado enzimático y a partir de 50 horas se alcanzó un valor sin grandes variaciones, con alrededor de 80% del valor inicial de actividad.

El comportamiento de la actividad enzimática a 50°C no resulta del todo sorprendente, una vez que la incubación de extractos enzimáticos producidos por micro-organismos mesófilos en temperaturas igual o superiores a los 50°C genera pérdida de actividad enzimática debido a la desnaturalización de las enzimas (Liao y col., 2015). En este sentido, diferentes autores evaluaron la estabilidad de  $\beta$ -glucosidasas en diferentes temperaturas. Farinas y col. (2010) observaron una actividad residual próxima a 50% para una temperatura de 50°C luego de 100 horas. Elyas y col. (2010) encontraron actividades residuales entre 15 y 20% para 60°C después de seis horas. Ramani

y col. (2012) indicaron un tiempo de vida medio de una hora para  $\beta$ -glucosidasas producidas por *P. funiculosum* NCL1. Junior y col. (2014) evaluaron la estabilidad térmica de  $\beta$ -glucosidasas producidas por *A. niger* 12 a 50°C por aproximadamente 95 horas, indicando una fuerte disminución de la actividad, llegando a un residual de menos de 10% después de 20 horas y un residual final menor de 5%, este resultado es similar al obtenido en el presente trabajo, indicando la baja estabilidad térmica de las  $\beta$ -glucosidasas producidas por *A. niger* en temperaturas alrededor de 50°C.

De forma similar Liao y col. (2015) encontraron una baja estabilidad térmica a 50°C para  $\beta$ -glucosidasas producidas por *P. oxalicum* GZ-2 con una actividad residual casi nula luego de 0.5 horas. Santos y col. (2016) presentaron un tiempo de vida media de 36 min y una actividad residual de aproximadamente 30% pasados 50 min a 60°C para  $\beta$ -glucosidasas producidas por *Gongronella butleri*. En estos dos casos, las enzimas obtenidas por los autores son menos estables que las  $\beta$ -glucosidasas del presente estudio. Adicional a la característica mesófila de las enzimas producidas por hongos filamentosos, el proceso de concentración o purificación parcial puede tener una influencia negativa sobre la estabilidad térmica, una vez que son retiradas proteínas como proteasas que pueden formar agregados con las  $\beta$ -glucosidasas, favoreciendo la estabilidad térmica a altas temperaturas. Sin embargo el proceso de purificación es necesario y sería posible mejorar la estabilidad con la adición de estabilizantes térmicos (Junior y col., 2014).

Para la temperatura de 37°C Farinas y col. (2010) observaron una actividad residual un poco inferior a 90% corridas 100 horas. Elyas y col. (2010) reportaron una actividad residual entre 81y 92% para la evaluación de estabilidad a 40 °C después de seis horas. Junior y col. (2014) observaron que en 37°C las  $\beta$ -glucosidasas de *A. niger* 12 presentaron una pérdida constante de actividad enzimática, llegando a una actividad residual alrededor de 30% luego de 95 horas. Considerando los resultados anteriores, las  $\beta$ -glucosidasas de *A. niger* ATCC 1004 obtenidas en este trabajo presentan una satisfactoria y prolongada estabilidad en temperaturas alrededor de 37°C ya que luego de 384 horas se tiene una actividad residual de 80%, esta característica sugiere la posibilidad de aplicación en procesos de sacarificación y fermentación simultaneas, donde las condiciones de operación se encuentran en temperaturas entre 37-40°C y tiempo de 3 días (Pejé y col., 2008; Olofsson y

col., 2008).

Finalmente, la estabilidad del concentrado enzimático en temperatura de almacenamiento (4°C) presentó como valor medio de actividad  $\beta$ -glucosidasica residual para los treinta primeros días un valor de 99,5% y posterior a 60 días un valor 99, 2%, demostrando una destacable estabilidad de la actividad enzimática del preparado en condiciones de almacenamiento por prolongados periodos de tiempo.

### 3.2 Evaluación de la influencia combinada del pH y la temperatura sobre la actividad $\beta$ -glucosidasica

El efecto combinado del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática se estudió como parte de la caracterización de las  $\beta$ -glucosidasas producidas por *A. niger* ATCC 1004 con el objetivo de seleccionar condiciones operacionales para su uso. En la Tabla 1 se presentan los resultados del diseño experimental DCCR realizado para esta evaluación, puede observarse que de acuerdo con las condiciones estudiadas, la actividad  $\beta$ -glucosidasica varió entre  $11101 \pm 356$  y  $64395 \pm 637$  U/L. Los mayores valores de actividad enzimática se alcanzaron en los experimentos 2 (pH 4.0- 50.0°C) y 8 (pH 5.0-52.7°C), los cuales presentan las mayores temperaturas evaluadas, de esta forma se observa la relación de la actividad  $\beta$ -glucosidasica con el aumento de temperatura, por otro lado debe considerarse que en altas temperaturas se tiene un aumento del número de colisiones moleculares que lleva a la desnaturalización progresiva de la estructura proteica y consecuente disminución del tiempo de estabilidad (Santos y col., 2013).

A partir de los resultados obtenidos (Tabla 1) fue construido el diagrama de Pareto que se presenta en la Fig. 2, en este grafico puede observarse que la temperatura se presenta como la variable con mayor influencia positiva sobre la actividad enzimática, sugiriendo el aumento de la actividad enzimática en temperaturas más elevadas. Cuando se aumenta la temperatura, se genera una mayor energía cinética, resultando en colisiones más productivas entre las moléculas y en este caso resultando en una mayor actividad enzimática. Sin embargo, si las moléculas absorben mucha energía las enzimas pueden ser desnaturalizadas, perdiendo su actividad catalítica, con lo cual es posible tener tiempos de estabilidad cortos para estas mayores actividades enzimáticas (Santos y col., 2013; Junior y col., 2014).

Tabla 1. Matriz de experimentos del diseño experimental Compuesto Central Rotacional (DCCR) para evaluación del efecto combinado del pH y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa del concentrado enzimático crudo producido por *A. niger* ATCC 1004 a partir de bagazo de caña de azúcar.

Experimento	pH	Temperatura	Actividad* (U/L)
1	4.0 (-1)	37.0 (-1)	23743 $\pm$ 487
2	4.0 (-1)	50.0 (1)	51516 $\pm$ 857
3	6.0 (1)	37.0 (-1)	11615 $\pm$ 410
4	6.0 (1)	50.0 (1)	22835 $\pm$ 267
5	3.6 (-1.41)	43.5 (0)	24849 $\pm$ 236
6	6.4 (1.41)	43.5 (0)	11101 $\pm$ 356
7	5.0 (0)	34.3 (-1.41)	21531 $\pm$ 208
8	5.0 (0)	52.7 (1.41)	64395 $\pm$ 637
9	5.0 (0)	43.5 (0)	40849 $\pm$ 385
10	5.0 (0)	43.5 (0)	39388 $\pm$ 265
11	5.0 (0)	43.5 (0)	40573 $\pm$ 538

Los valores codificados para las variables son presentados en paréntesis.

\*Muestras analizadas por triplicado.

Tabla 2. Análisis de varianza para el modelo cuadrático reducido de la actividad  $\beta$ -glucosidasa del concentrado enzimático crudo producido por *A. niger* ATCC 1004 en función del pH y la temperatura.

Fuente de variación	SC	GL	CM	$F_{Calculado}$	Valor P
Modelo	2.596 E+009	3	8.65E+08	29.51	0.0002
pH	4.535 E+008	1	4.54E+08	15.46	0.0057
T	1.24E+09	1	1.24E+09	42.31	0.0003
pH <sup>2</sup>	9.02E+08	1	9.02E+08	30.76	0.0009
Residuos	2.05E+08	7	2.93E+07		
Total	2.80E+09	10			
R <sup>2</sup>			0.927		
$F_{tab}$			4.35		
$F_{modelo}/F_{tab}$			6.78		

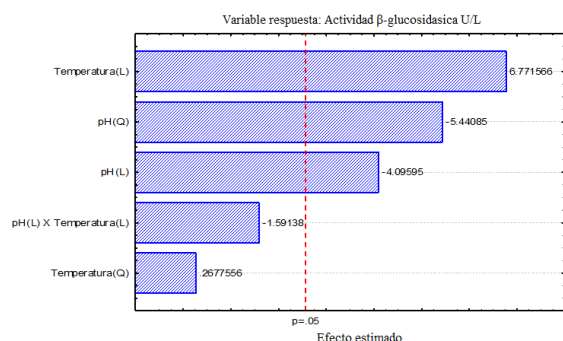


Figura 2. Diagrama de Pareto para evaluación de la influencia combinada del pH y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa del concentrado enzimático crudo producido por *A. niger* ATCC 1004.

Por otro parte, la variable pH presentó un efecto negativo, de esta forma, valores de pH bajos resultan en mayor actividad enzimática. Así, las  $\beta$ -glucosidasas de este estudio presentan mayor actividad en condiciones de pH ácidos y temperaturas alrededor de 50°C.

A partir de los resultados fue posible obtener un modelo cuadrático reducido Ec. (1) que relaciona la actividad  $\beta$ -glucosidasa en función del pH y de la temperatura con una significancia de 95%. El análisis de varianza (ANOVA) del modelo se presenta en la Tabla 2, donde se muestra que el coeficiente de correlación (0.927) y el valor de F calculado (6.8 veces mayor al F tabulado) son satisfactorios para la predicción del modelo,

confiriendo significancia estadística. Este modelo representa el efecto combinado y sinergia de la temperatura y el pH sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa en los intervalos estudiados de cada variable. Se obtuvo un factor lineal positivo para la variable temperatura, indicando la relación directa entre la actividad enzimática y el aumento de la temperatura en las condiciones evaluadas. Para el pH se observó un factor lineal negativo, indicando un aumento de la actividad enzimática en menores valores de pH; para esta variable también se encontró un coeficiente cuadrático, que sugiere que dentro del intervalo estudiado y por efectos sinérgicos se presenta un punto o región de pH óptimo, a partir del cual cambios de pH llevan a alteraciones estructurales de los sitios activos, disminuyendo la actividad enzimática.

$$\text{Actividad } \beta\text{-glucosidasa (U/L)} = 40822.65 - 7529.20\text{pH} + 12453.73T - 12079.51\text{pH}^2 \quad (1)$$

El estudio combinado de pH y temperatura permiten entender la acción catalítica de las enzimas en diferentes condiciones, diversos autores, entre ellos Elyas y col. (2010), Farinas y col. (2010), Ni y col. (2012), Liao y col. (2015) Santos y col. (2016), Brito y col. (2017), Silva y col., (2017), Marques y col., (2017) indican rangos de pH y temperatura donde se presentan altas actividades enzimáticas para diferentes enzimas obtenidas a partir de diversos micro-organismo y materias primas, siendo que la mayoría de estudios presenta el efecto de estas variables de forma separadas, diferente del estudio combinado realizado en este trabajo. El estudio de superficie de respuesta realizado permitió definir un rango de trabajo para las  $\beta$ -glucosidasas de *Aspergillus niger* ATCC 1004 de forma eficiente incluyendo los efectos individuales y combinados de estas variables. A partir de los datos experimentales y del modelo Ec. (1) se construyó el gráfico de contorno para la actividad enzimática en función de la temperatura y del pH como se presenta en la Fig. 3, en este gráfico puede observarse que la región con los mejores resultados se encuentran el intervalo de combinaciones de pH entre 3.6 - 5.2 con temperaturas entre 47.0 - 53.0°C. Usando las herramientas de optimización numérica de Desing-Expert y teniendo como criterio de mayor peso la maximización de la actividad  $\beta$ -glucosidasa dentro de los intervalos estudiados, es posible resolver el modelo Ec. (1) para la determinación de una condición óptima teórica en pH 4,69 y temperatura de 53.0 °C donde se estima una actividad  $\beta$ -glucosidasa de 60197.5 (U/L).

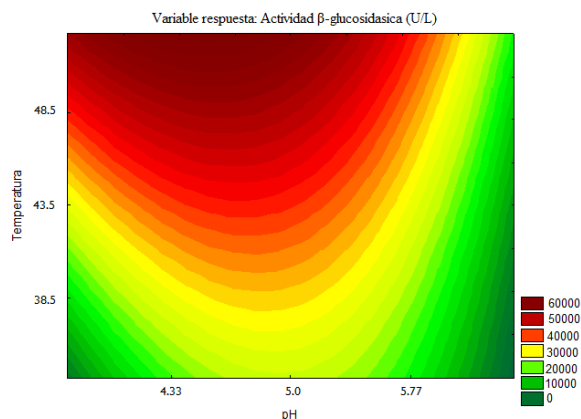


Fig. 3. Gráfico de contorno de la influencia combinada del pH y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa del concentrado enzimático crudo producido por *A. niger* ATCC 1004.

Diferentes autores han evaluado el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de diversos complejos enzimáticos, en su mayoría de forma individual. Singh y col. (2009) evaluaron el efecto individual de diferentes variables incluyendo la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática de un complejo enzimático producido por *A. heteromorphus*, indicando que la mayor actividad enzimática fue observada en pH 4.8 y temperatura de 60°C. Elyas y col. (2010) presentaron que el punto óptimo de actividad enzimática para un complejo celulósico se encuentra en el intervalo de pH entre 3.0 y 4.0 con una temperatura de 60°C, siendo que temperaturas superiores llevan a la pérdida de la actividad enzimática. Farinas y col. (2010) estudiaron el rango de pH entre 2.4 a 6.6 y temperatura de 23° a 87°C, reportando el pH como la variable con mayor efecto, los mayores valores de actividad estuvieron entre 34 a 60°C y pH de 4.0 a 5.5, estando la máxima actividad en pH 4.5 y temperatura 55°C. Ni y col. (2012) indicaron que las mejores actividades para  $\beta$ -glucosidasas de *A. niger* se encontraron en pH entre 4.5-5.0 y temperaturas entre 55- 60 °C. Liao y col. (2015) evaluaron de forma independiente el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de enzimas celulolíticas de *P. oxalicum* GZ-2, para la actividad  $\beta$ -glucosidasa se observó que las mejores actividades se encuentran en el intervalo de pH de 4.0 a 5.0 y de temperatura de 60°C. Santos y col. (2016) en su estudio individual del efecto del pH y la temperatura para  $\beta$ -glucosidasas de *G. butleri*, encontró la actividad óptima en pH 4.5 y 65°C, con tiempo de vida media de 36 min.



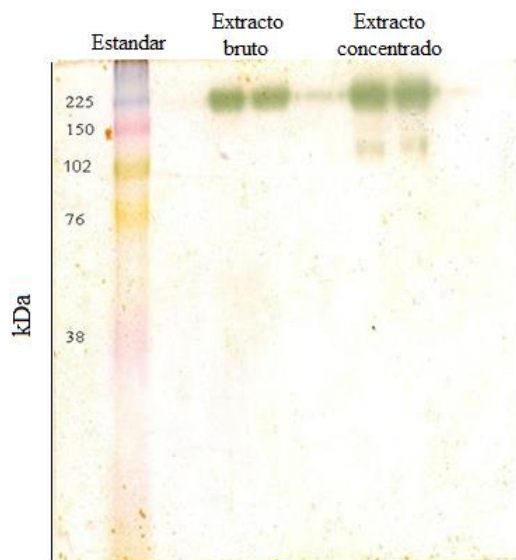


Fig. 4. Zimograma de la actividad  $\beta$ -glucosidasica en condiciones nativas.

Junior y col. (2014) presentaron un estudio combinado del efecto del pH y la temperatura para  $\beta$ -glucosidasas *A. niger* 12, encontrando que los efectos cuadráticos de ambas variables y el efecto lineal de la temperatura presentaban un efecto negativo sobre la actividad enzimática, diferentes de lo observado en el presente trabajo, donde la temperatura mostró la mayor influencia y efecto positivo. Esta diferencia puede deberse a las condiciones evaluadas por Junior y col. (2014) que llegaron a temperaturas de 87°C donde puede ocurrir la desnaturalización de las enzimas, de acuerdo con las condiciones evaluadas por esos autores, se reportó que en el rango de pH entre 4.0-6.5 y de temperatura entre 40-65°C se presentaron las mejores actividades. Este rango de pH se muestra similar al resultante en este estudio, por otro lado, para la temperatura se presenta una pequeña diferencia como consecuencia de los diferentes intervalos de temperatura evaluados y las características propias de las  $\beta$ -glucosidasas obtenidas.

### 3.3 Evaluación electroforética del concentrado enzimático

Se llevaron a cabo pruebas en condiciones nativas mediante zimograma para identificación de las formas de  $\beta$ -glucosidasas presentes en el extracto enzimático y en condiciones desnaturalizantes mediante SDS-PAGE para determinación de la masa molecular de las formas de  $\beta$ -glucosidasas identificadas.

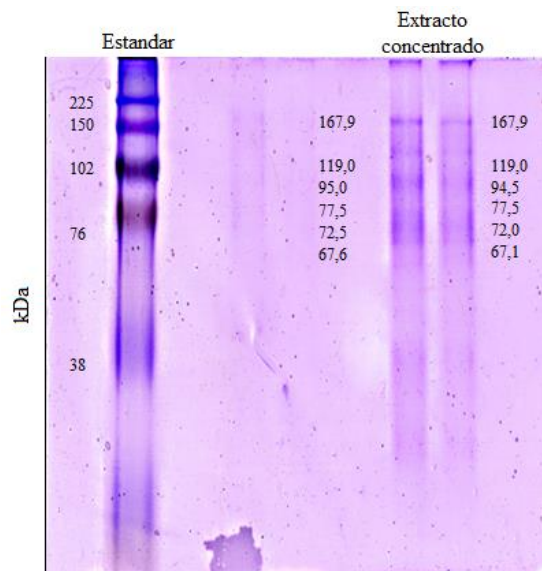


Fig. 5. Electroforesis gel SDS-PAGE en condición desnaturalizante.

La Fig. 4 presenta el zimograma de actividad  $\beta$ -glucosidasica, donde se identificaron dos formas de  $\beta$ -glucosidasas y de acuerdo al orden decreciente de su peso molecular se nombraron  $\beta$ -glucosidasa I y  $\beta$ -glucosidasa II. Las bandas teñidas para la actividad  $\beta$ -glucosidasica se hacen más intensas a medida que transcurre el tiempo, de esta forma se pudo determinar que la forma  $\beta$ -glucosidasa I presenta mayor actividad, esto se observó para el extracto crudo y el extracto concentrado.

El análisis del gel SDS-PAGE usando el software *Gel-Pro Analyzer 4.0* permitió identificar bandas con pesos moleculares de 167.9, 119.0, 95.0, 77.5, 72.5 y 67.6 kDa como se presenta en la Fig. 5. Para las formas  $\beta$ -glucosidasa I y  $\beta$ -glucosidasa II se estimaron los pesos moleculares de 167.9 y 119.0 kDa respectivamente. La presencia de bandas adicionales a las  $\beta$ -glucosidasas previamente identificadas indica la presencia de otras proteínas con actividad enzimática diferente, correspondiendo posiblemente a endoglucanasas o exoglucanasas, las cuales muestran bajos valores de actividad en el extracto enzimático. De esta forma el complejo enzimático producido por *A. niger* ATCC 1004 está formado principalmente por dos formas de  $\beta$ -glucosidasas que presentan variación del peso molecular debido a posibles diferencias en el tamaño de las cadenas polipeptídicas.

Las  $\beta$ -glucosidasas producidas en fermentación sumergida por *A. niger* ATCC 1004 presentaron

valores de peso moleculares dentro lo reportado por otros autores para enzimas de este grupo producidas por diferentes especies de hongos. Yan y Lin (1997) encontraron pesos de 107 kDa para  $\beta$ -glucosidasas producidas por *A. niger*, para esta misma especie Rashid y Siddiqui (1998) reportaron pesos de 330 kDa y Narasimha y col. (2015) estimaron un peso molecular de 95 kDa. Li y col. (2005) encontraron para  $\beta$ -glucosidasas producidas por *Valvariela valvacea* pesos moleculares de 380 kDa. Kaur y col. (2007) reportaron para  $\beta$ -glucosidasas de *Melanocarpus sp.* MTCC 3922 valores de peso molecular entre 92 y 102 kDa. Joo y col. (2010) presentaron para  $\beta$ -glucosidasas de *P. pinophilum* pesos de 120 kDa y más recientemente Borgi y Gargouri (2016) reportaron altos pesos moleculares para  $\beta$ -glucosidasas de *Beauveria bassiana* con pesos entre 400 y 600 kDa. Los valores de peso molecular encontrados en este trabajo concuerdan con valores reportados en la literatura y también con los indicados para  $\beta$ -glucosidasas producidas comercialmente de 135 kDa. De forma conjunta, los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados por otros autores muestran la variabilidad del peso molecular de las diferentes formas  $\beta$ -glucosidasa producidas por diferentes cepas *A. niger* y por otras especies de hongos, indicando la importancia de la caracterización de estos complejos enzimáticos.

## Conclusiones

La producción enzimática por *Aspergillus niger* ATCC 1004 a partir de bagazo de caña se mostró favorable para aprovechamiento de este residuo con la obtención de un complejo enzimático con alta actividad  $\beta$ -glucosidasa. El análisis combinado del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa con el uso de metodología de superficie de respuesta, permitió identificar que los mejores resultados experimentales de actividad enzimática se encuentran en pH entre 3.6 y 5.2 con temperatura entre 47.0 y 52.7°C. La solución del modelo resultante del diseño experimental DCCR permite estimar como condiciones óptimas teóricas pH 4,69 y temperatura 53.0 °C. En términos de estabilidad térmica, el concentrado enzimático crudo se presentó altamente estable a temperatura de almacenamiento 4°C y 37°C. En la temperatura de 50°C el concentrado enzimático presentó un tiempo de vida media de 2 horas. Finalmente la electroforesis permitió

identificar dos formas de  $\beta$ -glucosidasas, cuyos pesos moleculares se estimaron en 167.9 y 119.0 kDa. De esta forma, las características presentadas por la  $\beta$ -glucosidasas producidas por *A. niger* ATCC 1004 sugieren su aplicación en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas para producción de diversos productos entre ellos biocombustibles como etanol.

## Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) y al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por la beca otorgada y apoyo financiero durante la realización del presente trabajo de investigación, también agradece al Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Escola de Química/UFRJ por la infraestructura para el desarrollo de los experimentos.

## Nomenclatura

ANOVA	análisis de variancia
ATCC	American Type Culture Collection
CCRD	Central Composite Rotational Design
F	valor de Fisher
KDa	Kilodalton
PDA	Potato Dextrose Agar
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

## Referencias

- Abdella, A., Mazeed, T. E-S., El-Baz, A. F., Yang, S. T. (2016). Production of  $\beta$ -glucosidase from wheat bran and glycerol by *Aspergillus niger* in stirred tank and rotating fibrous bed bioreactors. *Process Biochemistry*, PRBI 10735.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro M. J. (2010). Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology* 101-13, 4851-4861.
- Arantes, V., Saddler, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 3, 4.

- Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., Han, X., Yang, Q. (2013). Production, purification and characterization of novel  $\beta$ -glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. *Journal Experimental and Clinical Science* 12, 528-540.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management* 52-2, 858-875.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34-5, 551-573.
- Borgi, I., Gargouri, A. (2016). A novel high molecular weight thermo-acidoactive  $\beta$ -glucosidase from *Beauveria bassiana*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 52-6, 602-607.
- Brito, A. R., Reis, N. S., Silva, T. P., Bonomo, R. C. F., Uetanabaro, A. P. T., Assis, S. A., Silva, E. G. P., Aguiar-Oliveira, E., Oliveira, R. O., Franco, M. (2017). Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, DOI: 10.1080/10826068.2017.1365247.
- Cardona, C. A., Quintero, J. A., Paz, I.C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology* 101-13, 4754-4766.
- Couto, S.R., Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry. *Journal of Food Engineering* 76-3, 291-302.
- De Cassia, P. J., Leite, R.S.R., Do Prado, H.F.A., Martins, D.A.B., Gomes, E., Da Silva, R. (2015). Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175, 723-732.
- DOF 06-03-2009. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Estados Unidos Mexicanos. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.
- Elyas, K. K., Mathew, A., Sukumaran, R. K., Ali, P. P. M., Sapna, K., Kumar, S. R., Mol, K. R. R. (2010). Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus-SA 58*. *New Biotechnology* 27-4, 347-351.
- Farinas, C.S., Loyo, M.M., Baraldo Jr, A., Tardioli, P.W., Bartuccineto, V., Couri, S. (2010). Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology* 27- 6, 810-815.
- Ferraz, J.L.A.A., Souza, L.O., Soares, G.A., Coutinho, J.P., de Oliveira, J.R., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M. (2017). Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. *Bioresource Technology*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>.
- González-Rentería, S.M., Soto-Cruz, N.O., Rutiaga-Quiñones, O.M., Medrano-Roldán, H., Rutiaga-Quiñones, J.G., López-Miranda, J. (2011). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (*pinto villa, pinto saltillo, pinto mestizo y flor de mayo*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10-1, 17-28.
- Jackson, M., Payne, A., Odelson, D. (2004). Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31, 149-154.
- Joo, A., Jeya, M., Lee, K., Moon, H., Kim, Y., Lee, J. (2010). Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry* 45-6, 851-858.
- Junior, A. B., Borges, D. G., Tardioli, P. W., Farinas, C. S. (2014). Characterization of  $\beta$ -glucosidase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation and partially purified using MANAE-agarose. *Biotechnology Research International*, ID 317092.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Kaur, G.S., Saini, H.S. (2007). Purification and

- characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology* 10-2.
- Lan, T.Q., Wei, D., Yang, S.T., Liu, X. (2013). Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Bioresource Technology* 133, 175-182.
- Li, X. L., Ljungdahl, L. G., Ximenes, E. A., Chen, H., Felix, C. R., Cotta, M. A., Dien, B. S. (2005). Properties of a recombinant  $\beta$ -glucosidases from polycentric anaerobic fungus orpinomyces PC-2 and its application for cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116, 233-250.
- Liao, H., Fan, X. T., Mei, X., Wei, Z., Raza, W., Shen, Q., Xu, Y. (2015). Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. *Biomass and Bioenergy* 74, 122-134.
- Marques, G. L., Reis, N. S., Silva, T. P., Ferreira, M. L. O., Aguiar-Oliveira, E., Oliveira, J. R., Franco, M. (2017). Production and characterisation of xylanase and endoglucanases produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through the solid-state fermentation of rice husk residue. *Waste Biomass Valor*, DOI 10.1007/s12649-017-9994-x.
- Mitchell, D.A., de Lima, L.L.F., Krieger, N., Berovic, M. (2011). Bioreactors for solid-state fermentation. *Comprehensive Biotechnology*, 347-360.
- Moretti, M.M.S., Martins, D.A.B., Da Silva, R., Rodrigues, A., Sette, L.D., Gomes, E. (2012). Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazil Journal of Microbiology* 43, 1062-1071.
- Narasimha, G., Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G., Rajasekhar, B.R. (2015). Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Properties* 19, 652-661.
- Ni, H., Cai, H., Chen, F., You, Q., Xiao, A., Wang, Y. (2012). Purification and characterization of  $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus niger* naringinase. *Journal of Food Biochemistry* 36-4, 395-404.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. DOI:10.1186/1754-6834-1-7
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*, 3a ed. ISBN. 92 4 354650 3.
- Pejó, T.E., Olivia, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L. (2008). Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering* 100-6, 1122-1131.
- Quian, L.C., Fu, S.J., Zhou, H.M., Sun, J.Y., Weng X.Y. (2012). Optimization of fermentation parameters for  $\beta$ -glucosidase production by *Aspergillus niger*. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11-5, 583-591.
- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rao, M., Gunasekaran, P. (2012). Production, purification, and characterization of a  $\beta$ -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 959-972.
- Ramos Ibarra, J.R., Miramontes, C., Arias, A., Arriola, E., Guatemala, G., Corona-González, R.I. (2017). Production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation with new fungal strains using orange by-products. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16-1, 19-31.
- Rashid, M. H., Siddiqui, K. S. (1998). Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 33-2, 109-115.
- Rodrigues, P.O., Dos Santos, B. V., Costa, L., Henrique, M. A., Pasquini, D., Baffi, M. A. (2017). Xylanase and  $\beta$ -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. *Industrial Crops and Products* 95, 453-459.

- Santos, F. R. S., Garcia, N. F. L., Da Paz, M. F., Fonseca, G. G., Leite R. S. R. (2016). Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology* 15-16, 633-64.
- Santos, T. C., Filho, G. A., Oliveira, A.C., Rocha, T. J. O., Machado, F. P. P., Bonomo, R. C. F., Mota, K. I. A., Franco, M. (2013). Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. *Food Science and Biotechnology* 22-1, 1-7.
- Silva, T.P., Souza, L. O., Reis, N. S., Assis, S. A., Ferreira, M. L. O., Oliveira, J. R., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M. (2017). Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16-3, 745-756.
- Sharma, B., Agrawal, R., Singhania, R.R., Satlewal, A., Mathur, A., Tuli, D., Adsul, M. (2015). Untreated wheat straw: Potential source for diverse cellulolytic enzyme secretion by *Penicillium janthinellum* EMSUV-8 mutant. *Bioresource Technology* 196, 518-524.
- Singh, A., Kumar, R., Bishnoi, K., Bishnoi, N. R. (2009). Optimization of synergistic parameters activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 48-1, 28-35.
- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., Kham, S. A. (2009). Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect temperature and pH. *New Biotechnology* 25-6, 437-441.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83-1, 1-11.
- Vasconcellos, V.M., Tardiolo, P.W., Giordano, R.L.C., Farinas, C.S. (2015). Production efficiency versus thermostability of (hemi)cellulolytic enzymatic cocktails from different cultivation systems. *Process Biochemistry* 50, 1701-1709.
- Yan, T. R., Lin, C. L. (1997). Purification and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC31494. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61-6, 965-970.