

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Profesional de Biología - Microbiología**

**Caracterización de  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo  
termófilo cepa FC-13 aislado del compost**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. Christian Javier Alave Rosas**

**Para optar el Título Profesional de:**

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

**TACNA-PERÚ  
2024**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DE PREGRADO N°420**

En la ciudad de Tacna, en el Auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 09:35 horas del día 17 de Julio del 2024, estando presente el Jurado Calificador nominado por Resolución de Facultad N°10980-2024-FACI/UNJBG, estando presente el jurado calificador nominado por:

DRA. SOLEDAD AMPARO BORNÁS ACOSTA	PRESIDENTE
DRA. LIDUVINA SULCA QUISPE	SECRETARIA
DR. CARLOS FRANCISCO TITO VARGAS	VOCAL

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el presidente del Jurado instó al Bachiller Christian Javier Alave Rosas, a exponer la tesis titulada "**Caracterización de  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo termófilo cepa FC-13 aislado del compost**", para optar el título de profesional de Biólogo Microbiólogo.

Siendo las 10:15 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procede a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador, terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo al reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad con el calificativo de 17, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias. Siendo las 11:14 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador en señal de conformidad.



Dra. Soledad Amparo Bornás Acosta  
PRESIDENTE



Dra. Liduvina Sulca Quispe  
SECRETARIA




Dr. Carlos Francisco Tito Vargas  
VOCAL

**CERTIFICADO SIMILITUD**

Yo, Dr. Roberto castellanos Cabrera, en mi condición de Asesor de tesis de la escuela de Biología – Microbiología, declaro que le bachiller Christian Javier Alave Rosas (2014-118002), de la Escuela Profesional de Biología-Microbiología de la Facultad de Ciencias, quién sustento la tesis titulada: "Caracterización de  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo termófilo cepa FC-13 aislado del compost" para obtener el título profesional de BIÓLOGO MICROBIÓLOGO. Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo informe intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través de Software de similitud textual TURNITIN, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 7%, por lo que, CERTIFICO LA SIMILARIDAD del trabajo informe profesional líneas arriba, la cual está expedita para continuar con los tramites para la obtención del título profesional, según corresponda consiguientemente la publicación en el repositorio institucional.

Sin otro particular, me despido.

Atentamente.



Dr. Roberto Castellanos Cabrera  
DNI: 00417795

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres por apoyarme en las decisiones que he tomado hasta ahora, así como el ánimo a seguir adelante pese a las dificultades.

A mi asesor el Dr. Roberto Castellanos Cabrera, por haber depositado su confianza en mí, abriéndome las puertas del Laboratorio de Biotecnología Enzimática, y brindándome la oportunidad de realizar la presente investigación.

Al Dr. Alonso Poma Ticona, por su invaluable apoyo y orientación, en las etapas de redacción y sustentación.

A mi coasesor el Mgr. Héber Ramírez Arua, quien me acompañó de inicio a fin, brindándome su experiencia, paciencia y dedicación, que fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

A los investigadores Mgr. Mirella Yllanes Huanacuni, Mgr. Julissa Naquiche Calero, y demás personas del laboratorio, por sus consejos, compañía y amistad, que fueron esenciales en los momentos de incertidumbre.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
I. MARCO TEÓRICO .....	4
1.1 Planteamiento del Problema .....	4
1.2 Hipótesis .....	6
1.3 Justificación .....	6
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1 Objetivo General.....	8
1.4.2 Objetivos Específicos .....	8
1.5 Fundamento teórico .....	9
1.5.1 Celulosa .....	9
1.5.2 Celulasa .....	12
1.5.3 $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) .....	15
1.5.4 Clasificación de $\beta$ -glucosidasa.....	17
1.5.5 Mecanismo catalítico de la $\beta$ -glucosidasa.....	19
1.5.6 Producción de $\beta$ -glucosidasa en hongos termófilos .....	21
1.5.7 Factores influyentes en la actividad de $\beta$ -glucosidasa .....	24
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1 Materiales .....	34
2.1.1 Material Biológico .....	34
2.1.2 Equipos .....	34
2.1.3 Instrumentos y material de vidrio .....	35
2.1.4 Reactivos químicos .....	35

2.2	Diseño de investigación y tratamiento estadístico de datos.....	36
2.3	Métodos .....	39
2.3.1	Producción de $\beta$ -glucosidasa.....	39
2.3.2	Purificación de $\beta$ -glucosidasa .....	41
2.3.3	Determinación de las características de la $\beta$ -glucosidasa.....	42
2.3.4	Evaluación del efecto de la $\beta$ -glucosidasa en la hidrólisis de celulosa .....	51
III.	RESULTADOS.....	53
3.1	Producción de $\beta$ -glucosidasa .....	53
3.2	Purificación de $\beta$ -glucosidasa.....	55
3.3	Caracterización de la $\beta$ -glucosidasa.....	58
3.3.1	Análisis de electroforesis en gel SDS-PAGE y Zimograma.....	58
3.3.2	Determinación del pH óptimo de $\beta$ -glucosidasa.....	61
3.3.3	Determinación de la temperatura óptima para $\beta$ -glucosidasa .....	64
3.3.4	Determinación de la termoestabilidad de $\beta$ -glucosidasa .....	67
3.3.5	Determinación del efecto de los iones metálicos en la actividad $\beta$ - glucosidasa.....	70
3.3.6	Determinación del efecto de la glucosa en la actividad $\beta$ - glucosidasa.....	72
3.3.7	Determinación del efecto del etanol en la actividad $\beta$ -glucosidasa	73
3.3.8	Determinación de los Parámetros Cinéticos $K_m$ y $V_{max}$ para la $\beta$ - glucosidasa.....	75
3.4	Evaluación del efecto de la $\beta$ -glucosidasa en la hidrólisis de celulosa....	77
IV.	DISCUSIÓN .....	82
	CONCLUSIONES.....	97
	RECOMENDACIONES.....	98
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
	ANEXOS .....	117

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones fisiológicas para la producción de $\beta$ -glucosidasa por hongos .....	23
<b>Tabla 2.</b> Hongos productores de $\beta$ -glucosidasa y sus características enzimáticas .....	26
<b>Tabla 3.</b> Activación e Inactivación de $\beta$ -glucosidasa fúngica por iones metálicos .....	28
<b>Tabla 4.</b> Ensayo en microplaca para determinación de actividad de $\beta$ -glucosidasa .....	43
<b>Tabla 5.</b> Ensayo para determinación de glucosa .....	46
<b>Tabla 6.</b> Combinación con $\beta$ -glucosidasa en la degradación de celulosa .....	52
<b>Tabla 7.</b> Producción de $\beta$ -glucosidasa.....	53
<b>Tabla 8.</b> Actividad catalítica y específica de $\beta$ -glucosidasa en el extracto crudo .....	55
<b>Tabla 9.</b> Actividad $\beta$ -glucosidasa en pellets obtenidos con sulfato de amonio ...	56
<b>Tabla 10.</b> Actividad $\beta$ -glucosidasa en sobrenadantes de pellets.....	56
<b>Tabla 11.</b> Etapas de la purificación de $\beta$ -glucosidasa .....	57
<b>Tabla 12.</b> Efecto del pH sobre la actividad $\beta$ -glucosidasa.....	62
<b>Tabla 13.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad $\beta$ -glucosidasa .....	65
<b>Tabla 14.</b> Termoestabilidad de la $\beta$ -glucosidasa en 300 minutos.....	67
<b>Tabla 15.</b> Termoestabilidad a 50°C y 60°C de la $\beta$ -glucosidasa en 96 horas.....	69
<b>Tabla 16.</b> Efecto de los iones metálicos sobre la $\beta$ -glucosidasa .....	71
<b>Tabla 17.</b> Efecto de la glucosa en la actividad relativa de $\beta$ -glucosidasa.....	72

<b>Tabla 18.</b> Efecto del etanol sobre la actividad relativa de la $\beta$ -glucosidasa.....	74
<b>Tabla 19.</b> Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad $\beta$ -glucosidasa .....	75
<b>Tabla 20.</b> Valores de $K_m$ y $V_{max}$ para la $\beta$ -glucosidasa.....	77
<b>Tabla 21.</b> Producción de glucosa en los tratamientos empleados para la degradación del bagazo de caña.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de la molécula de celulosa .....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura y disposición de enlaces de hidrógeno en la cadena de celulosa .....	11
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la celulosa .....	15
<b>Figura 4.</b> Mecanismo catalítico de la $\beta$ -glucosidasa .....	20
<b>Figura 5.</b> Curva de producción de $\beta$ -glucosidasa .....	54
<b>Figura 6.</b> Electroforesis de fracciones de $\beta$ -glucosidasa .....	59
<b>Figura 7.</b> Electroforesis de $\beta$ -glucosidasa ultrafiltrada .....	60
<b>Figura 8.</b> Análisis de Zimograma de $\beta$ -glucosidasa .....	61
<b>Figura 9.</b> Efecto del pH sobre la actividad relativa de $\beta$ -glucosidasa .....	64
<b>Figura 10.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de $\beta$ -glucosidasa .....	66
<b>Figura 11.</b> Actividad Residual de la $\beta$ -glucosidasa en 300 minutos .....	68
<b>Figura 12.</b> Actividad Residual de $\beta$ -glucosidasa en 96 horas .....	70
<b>Figura 13.</b> Efecto de los iones metálicos sobre la $\beta$ -glucosidasa.....	71
<b>Figura 14.</b> Efecto de la glucosa en la actividad relativa de $\beta$ -glucosidasa .....	73
<b>Figura 15.</b> Efecto del etanol sobre la actividad relativa de la $\beta$ -glucosidasa .....	74
<b>Figura 16.</b> Modelo no lineal ajustado del sustrato vs la velocidad de la $\beta$ -glucosidasa .....	76
<b>Figura 17.</b> Producción de glucosa por los tratamientos en diferentes tiempos ..	79
<b>Figura 18.</b> Incremento relativo del $T_2$ en la producción de glucosa.....	79

## RESUMEN

La  $\beta$ -glucosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de glucósidos liberando glucosa, lo que le da un papel importante en las industrias de biocombustibles, alimentaria y farmacéutica. Determinar sus características permite comprender sus propiedades catalíticas, estabilidad y potencial para optimización en aplicaciones específicas.

En este trabajo se caracterizó la  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo termófilo cepa FC-13 aislado del compost, el cual tuvo mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa (1,179 U/mL) en el día 17, al cultivarlo en medio líquido Mandels-Weber, utilizando hojas de perejil en polvo al 1% (p/v) como fuente de carbono e inductor. La purificación de la  $\beta$ -glucosidasa se hizo por el método de fraccionamiento con sulfato de amonio en diferentes concentraciones, determinándose que la concentración del 50% era la adecuada para purificar la  $\beta$ -glucosidasa, con una recuperación del 46,72% del total de enzima en el extracto crudo. Además, se hizo una ultrafiltración para eliminar el sulfato de amonio, con una recuperación final del 37,96%.

La  $\beta$ -glucosidasa purificada, presentó un peso de 120 kDa, un pH óptimo de 5,0 y una temperatura óptima de 70°C. Mostró termoestabilidad a 50°C durante 96 horas, manteniendo una actividad residual del 56,64%. La actividad relativa de la enzima aumentó entre 126% y 150% con todos los iones metálicos empleados en concentraciones de 1 y 5 mM, pero disminuyó entre 68% y 97% a 10 mM. Fue sensible a la inhibición por glucosa, mostrando solo un 6% de actividad relativa a 100 mM. Mantuvo más del 50% de actividad relativa en etanol al 10%. Y los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron 5,645 mM y 1,981 U/mg. Además, la combinación de celulasa comercial con la  $\beta$ -glucosidasa, mostró ser eficaz en la hidrólisis de celulosa en comparación con el uso exclusivo de celulasa comercial, con un incremento relativo del 65% a las 8 horas en la producción de glucosa.

Palabras clave: *Thermomyces dupontii*,  $\beta$ -glucosidasa, celulasa comercial, celulosa.

## ABSTRACT

$\beta$ -glucosidase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of glucosides, releasing glucose, which plays an important role in the biofuel, food, and pharmaceutical industries. Determining its characteristics allows for an understanding of its catalytic properties, stability, and potential for optimization in specific applications.

In this study, the  $\beta$ -glucosidase produced by the thermophilic fungus strain FC-13 isolated from compost was characterized. The highest  $\beta$ -glucosidase activity (1,179 U/mL) was observed on day 17 when cultured in liquid Mandels-Weber medium, using 1% parsley powder (w/v) as the carbon source and inducer. The  $\beta$ -glucosidase was purified using ammonium sulfate fractionation at various concentrations, determining that 50% concentration was suitable for purifying the  $\beta$ -glucosidase, with a recovery of 46,72% of the total enzyme from the crude extract. Additionally, ultrafiltration was performed to remove ammonium sulfate, achieving a final recovery of 37,96%.

The purified  $\beta$ -glucosidase had a molecular weight of 120 kDa, an optimal pH of 5.0, and an optimal temperature of 70°C. It exhibited thermostability at 50°C for 96 hours, maintaining 56,64% residual activity. The enzyme's relative activity increased between 126% and 150% with all metal ions used at concentrations of 1 and 5 mM, but decreased between 68% and 97% at 10 mM. It was sensitive to glucose inhibition, showing only 6% relative activity at 100 mM. It maintained more than 50% relative activity in 10% ethanol. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were 5,645 mM and 1,981 U/mg, respectively. Moreover, the combination of commercial cellulase with  $\beta$ -glucosidase proved to be more effective in cellulose hydrolysis compared to the use of commercial cellulase alone, with a relative increase of 65% in glucose production at 8 hours.

**Keywords:** *Thermomyces dupontii*,  $\beta$ -glucosidase, commercial cellulase, cellulose.

## INTRODUCCIÓN

Durante la última década, ha surgido un gran interés de convertir biomasa lignocelulósica de residuos agrícolas, en azúcares fermentables como la glucosa, en un proceso llamado sacarificación. Con el fin de obtener bioetanol de segunda generación a partir de la fermentación de esos azúcares. Por lo general, la conversión de biomasa a bioetanol es de sólo entre el 30 al 50%, pero los nuevos procesos desarrollados en los últimos años, aumentan el rendimiento de conversión hasta aproximadamente el 92% (Kang et al., 2014). Un factor clave de tales procesos es la  $\beta$ -glucosidasa, que limita la velocidad de hidrólisis de la celulosa, al hidrolizar la celobiosa en glucosa, permitiendo superar el efecto inhibitorio de la celobiosa sobre otras enzimas celulolíticas, como las endoglucanasas y las exoglucanasas (Ahmed et al., 2017). Sin embargo, los procesos industriales para la sacarificación de la biomasa lignocelulósica, a menudo requieren condiciones de temperatura y pH extremos. Una limitación significativa es que estas condiciones pueden inactivar rápidamente las enzimas involucradas, como la  $\beta$ -glucosidasa, lo que reduce la eficiencia del proceso. (Zuliani et al., 2021).

Es así, que en razón de las características deseadas por la industria para enzimas como la  $\beta$ -glucosidasa, este estudio tuvo como objetivo producir  $\beta$ -glucosidasa a partir del hongo termófilo cepa FC-13, realizar la purificación y caracterización enzimática, con implementación en la hidrólisis de celulosa junto a una celulasa comercial.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Planteamiento del Problema

En la naturaleza, la descomposición completa de la celulosa depende de la acción sinérgica de un sistema enzimático completo que incluye: Endoglucanasa (EC 3.2.1.4), Exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21). La  $\beta$ -glucosidasa desempeña un papel crucial al acelerar la descomposición de la celulosa y mejorar el rendimiento de glucosa al catalizar el paso limitante en la velocidad de hidrólisis de la celobiosa (Srivastava et al., 2020). Sin embargo, el proceso de hidrólisis de la celulosa en la industria, requiere costos bajos de producción enzimática y enzimas con una elevada actividad, que sean altamente tolerantes a condiciones de temperatura elevadas, a inhibidores y capaces de trabajar en conjunto de manera efectiva. Asimismo, las preparaciones comerciales de celulasa empleadas muy comúnmente en la industria, en su mayoría son de origen fúngico y principalmente de *Trichoderma reesei*, que contienen principalmente exoglucanasas y endoglucanasas (conforman más del 92% de toda la celulasa que producen), pero tienen una cantidad limitada de  $\beta$ -glucosidasas (Costa et al., 2018). Es por ello que, para lograr una hidrólisis eficiente de la celulosa, es necesario utilizar preparaciones comerciales suplementadas con  $\beta$ -glucosidasa exógena de otros microorganismos (Xia et al., 2016). Algunas cepas de hongos, especialmente hongos de los géneros *Aspergillus*, *Talaromyces*, y *Penicillium*, son buenos productores de  $\beta$ -glucosidasa (Rosa

et al., 2018). No obstante, la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas provenientes de estos hongos se inactivan rápidamente a temperaturas superiores a 50 °C, lo que restringe su uso en condiciones de altas temperaturas.

Los microorganismos que pueden sobrevivir a altas temperaturas son esenciales para obtener enzimas capaces de resistir la inactivación térmica. En este contexto, el compost es una fuente significativa de microorganismos termófilos, ya que, durante su fase termófila, las temperaturas superan los 45°C. En estas condiciones, se pueden encontrar hongos termófilos que producen cantidades considerables de enzimas, como la  $\beta$ -glucosidasa, que contribuyen a la degradación de la celulosa. Estas enzimas no solo resisten altas temperaturas, sino que también poseen otras propiedades valiosas para aplicaciones industriales (Nascimento et al., 2023).

Actualmente, en el Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Universidad Jorge Basadre Grohmann, se dispone de un cepario de hongos termófilos aislados de las plantas piloto de compostaje de residuos orgánicos de la Municipalidad Provincial de Tacna. De dichas cepas, se ha descrito cualitativamente a la Cepa FC-13 como la mayor productora de celulasas. Por lo que se ha planteado la siguiente interrogante:

**¿Qué características presenta la  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo termófilo cepa FC-13 aislado del compost?**

## 1.2 Hipótesis

La  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo termófilo cepa FC-13 aislado del compost, posee características enzimáticas específicas, como termoestabilidad y eficiencia hidrolítica, que la hacen adecuada para futuras aplicaciones industriales en la sacarificación de biomasa lignocelulósica.

## 1.3 Justificación

La creciente demanda y el continuo agotamiento de los combustibles fósiles han impulsado a los investigadores a buscar nuevas fuentes de energía renovable. Entre estas alternativas, el bioetanol producido a partir de celulosa se presenta como una opción rentable y viable frente al petróleo (Kang et al., 2014). La  $\beta$ -glucosidasa juega un papel crucial en la hidrólisis de la celulosa, lo que la hace esencial para la producción de bioetanol. Actualmente, la mayor parte del bioetanol comercializado se deriva principalmente de cultivos amiláceos y oleaginosos, conocidos como bioetanol de primera generación (1G) (Sharma et al., 2020). Sin embargo, el bioetanol de segunda generación (2G) se produce a partir de biomasa lignocelulósica, que se encuentra en abundancia en la mayoría de las paredes celulares de las plantas. Ejemplos de esta biomasa incluyen materiales de desecho como residuos forestales, residuos de actividades agrícolas (rastreo de maíz, bagazo de caña de azúcar, cascarilla de arroz y paja de trigo), así como residuos municipales e industriales (Costa et al., 2018).

En la industria, los procesos de sacarificación de la biomasa lignocelulósica para la obtención de bioetanol de segunda generación, suelen

realizarse con celulasas a temperaturas de 45 a 55°C, lo que ofrece ciertas ventajas como mejor solubilidad del sustrato, mayor velocidad de reacción y menor cantidad de enzimas necesarias (Ahmed et al., 2019). A menudo a los hongos se les identifica como los mejores productores de celulasa y se usan preferiblemente en aplicaciones industriales debido a su producción en fermentación a gran escala, bajo costo, selectividad, especificidad y estabilidad (Ghonemy, 2021). Sin embargo, las preparaciones comerciales de celulasa fúngicas suelen contener poca cantidad de  $\beta$ -glucosidasa, por lo que se deben suplementar con  $\beta$ -glucosidasas exógenas, que a su vez puedan soportar la inhibición por condiciones industriales como altas temperaturas, pH extremos, y tolerancia a ciertos inhibidores, tales como iones metálicos, glucosa y etanol. En respuesta a esta problemática los microorganismos termófilos como los hongos, ofrecen enzimas de alta productividad y bajo costo como la  $\beta$ -glucosidasa que pueden trabajar bajo las condiciones industriales mencionadas (Zuliani et al., 2021). En ese contexto, es importante descubrir y caracterizar nuevas  $\beta$ -glucosidasas fúngicas que puedan ser aplicadas en diversas condiciones de la industria.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 *Objetivo General*

Caracterizar la  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo termófilo cepa FC-13 aislado del compost.

### 1.4.2 *Objetivos Específicos*

- Producir  $\beta$ -glucosidasa en medio líquido a partir del hongo termófilo cepa FC-13.
- Purificar la enzima  $\beta$ -glucosidasa.
- Determinar las características enzimáticas de la  $\beta$ -glucosidasa.
- Evaluar el efecto de la  $\beta$ -glucosidasa en la hidrólisis de celulosa.

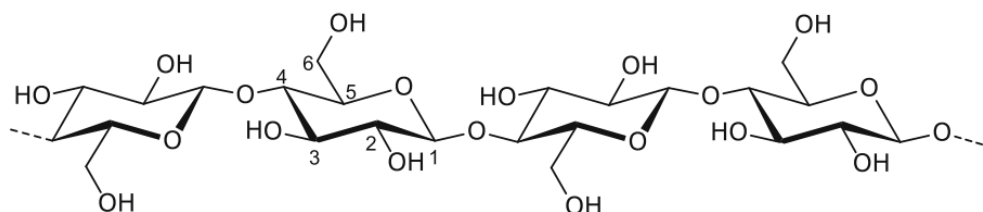
## 1.5 Fundamento teórico

### 1.5.1 Celulosa

En 1838, el químico francés Anselme Payen describió un componente fibroso de los tejidos vegetales que resistía la extracción con disolventes orgánicos y acuosos. A su vez, este químico determinó la fórmula molecular de este material ( $C_6O_5H_{10}$ ) y observó su similitud con la del almidón. El material fue descrito por primera vez como celulosa en 1839 en un informe sobre el trabajo de Payen, no fue hasta casi un siglo después que se determinó la estructura polimérica de la celulosa, principalmente gracias a las investigaciones de Hermann Staudinger, que observó que la celulosa consiste en un polímero lineal de moléculas de glucosa, en el que las unidades de glucosa individuales están conectadas covalentemente mediante enlaces acetal, entre los carbonos  $C_1$  y  $C_4$  de los anillos de glucopiranososa (Figura 1), que mantienen unido el polímero de celulosa de manera muy estable (Namara et al., 2015).

#### Figura 1

*Representación de la molécula de celulosa*

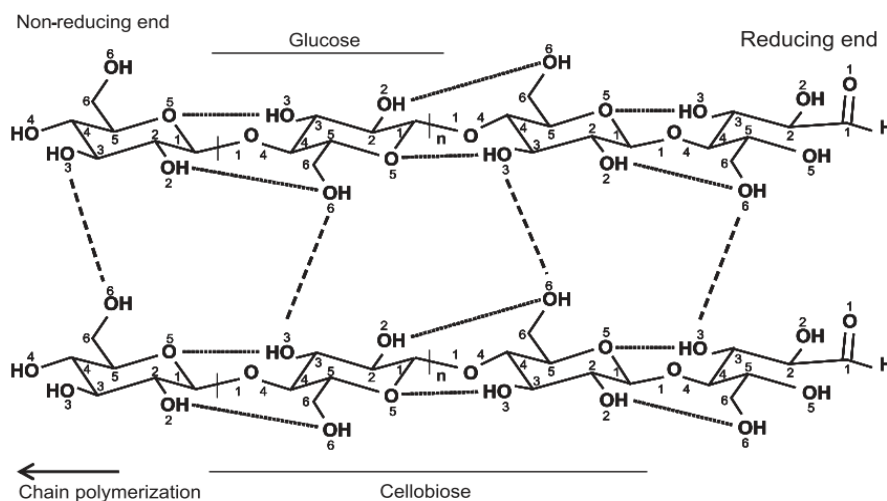


*Nota.* Obtenido de Cellulose: Structure and properties (Heinze, 2015)

La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra, los seres humanos han utilizado la celulosa durante milenios como material y fuente de energía. El advenimiento de una industria de combustibles lignocelulósicos, la elevará a la principal fuente de carbono para el floreciente sector de las energías renovables. Y es que, la mayoría del carbono fijado por las plantas mediante la fotosíntesis, se encuentra en las paredes de las células vegetales, que representan la fuente de carbono renovable más abundante sobre la Tierra. Asimismo, el componente básico de la pared de una célula vegetal, es la lignocelulosa, la cual está formada principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y la lignina, siendo la celulosa quien presenta mayor proporción respecto a los otros (Martínez y Prieto, 2021). Además, la celulosa posee varios sistemas de enlaces de hidrógeno (Figura 2), que tienen una influencia significativa en las propiedades, por ejemplo, la solubilidad limitada en la mayoría de los solventes, la reactividad de los grupos hidroxilo y la cristalinidad de las muestras de celulosa, que tienen origen en sistemas de enlaces de hidrógeno fuertes. La celulosa también contiene áreas hidrofóbicas alrededor de los átomos de carbono, que tienen cierta influencia en las propiedades generales, incluida la solubilidad. Junto con el enlace covalente  $\beta$ -glucosídico, los enlaces de hidrógeno intramoleculares son responsables de la rigidez del polímero de celulosa (Heinze, 2015).

**Figura 2**

*Estructura y disposición de enlaces de hidrógeno en la cadena de celulosa*



*Nota.* Líneas discontinuas (Enlaces de hidrógeno entre cadenas), Líneas punteadas (Enlace de hidrógeno intracadena). Obtenido de Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants (Festucci et al., 2007)

La celulosa es un material semicristalino, donde el grado de cristalinidad depende de su origen, método de extracción y pretratamiento, por ejemplo, el grado de cristalinidad de la celulosa a base de madera y de origen vegetal suele oscilar entre el 40 y el 60 %, mientras que la celulosa de otras fuentes, como las bacterias y los tunicados, muestran un mayor grado de cristalinidad, que oscila entre el 80 y el 100 %. Debido a ello, la celulosa cristalina se presenta en diferentes alomorfos, que incluyen la celulosa I, II, III y IV. La celulosa I tiene cadenas paralelas en su estructura cristalina y se encuentra en fuentes naturales como árboles, plantas, algas y bacterias. Las láminas de celulosa I se apilan mediante enlaces de hidrógeno e interacciones

de Van der Waals, lo que aporta rigidez y estructura a la celulosa. Por otro lado, la celulosa II se obtiene de la celulosa I mediante procesos como la regeneración o la mercerización. En esta conversión, la disposición de cadenas paralelas en la celulosa I se transforma en una disposición de cadenas antiparalelas más estable en la celulosa II, que es la forma cristalina de celulosa más termodinámicamente estable. Por otra parte, la celulosa III puede generarse a partir de la celulosa I o II mediante tratamiento con amoníaco líquido, y se identifica como celulosa III<sub>(I)</sub> y III<sub>(II)</sub>, respectivamente. Posteriormente, se pueden aplicar tratamientos térmicos junto con glicerol para obtener celulosa IV a partir de celulosa III<sub>(I)</sub> y III<sub>(II)</sub> (Seddiqi et al., 2021).

### **1.5.2 Celulasa**

La celulasa es una enzima producida por diversos microorganismos, como bacterias y hongos, cuya principal función es la biodegradación de los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos en la biomasa de celulosa. Por lo general, la celulasa fúngica y bacteriana tienen dos o más dominios estructurales y funcionales, ya que tanto los microorganismos aerobios como los anaerobios producen esta enzima, por lo tanto, hay dos tipos de sistemas de celulasa: los no complejos y los complejos. Un sistema de celulasa no compleja es una mezcla de enzimas cooperativas extracelulares, donde la disposición común es la unión de un dominio catalítico con un dominio de unión a celulosa, y es producido por microorganismos celulolíticos aeróbicos como los hongos (*Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium chrysogenum*) (Behera et al., 2017). Por otro lado, en sistemas complejos de celulasas, los

microorganismos anaeróbicos como algunas bacterias (*Clostridium thermocellum*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*), presentan un complejo enzimático denominado celulosoma, que se encuentra anclado en la superficie de estos microorganismos. A pesar de su complejidad, el celulosoma funciona de manera similar a las celulasas individuales no complejas, pero en una estructura unificada (Uversky y Kataeva, 2006).

En cuanto a los mecanismos de acción de esta enzima, se presentan como mecanismos de retención y mecanismos de inversión. Las celulasas escinden los enlaces glucosídicos mediante el uso de catálisis a base de ácido, donde son dos los residuos catalíticos de la enzima: un ácido general (donador de protones) y un nucleófilo/base. Las celulasas de "retención" retienen la misma configuración de carbono anomérico que lleva el enlace glucosídico objetivo, incluso después de una hidrólisis de doble desplazamiento con dos pasos clave de glicosilación o desglucosilación. En contra parte, las celulasas "invertidas" invierten la configuración de la configuración del carbono anomérico después de una sola hidrólisis de desplazamiento nucleofílico (Jayasekara y Ratnayake, 2019).

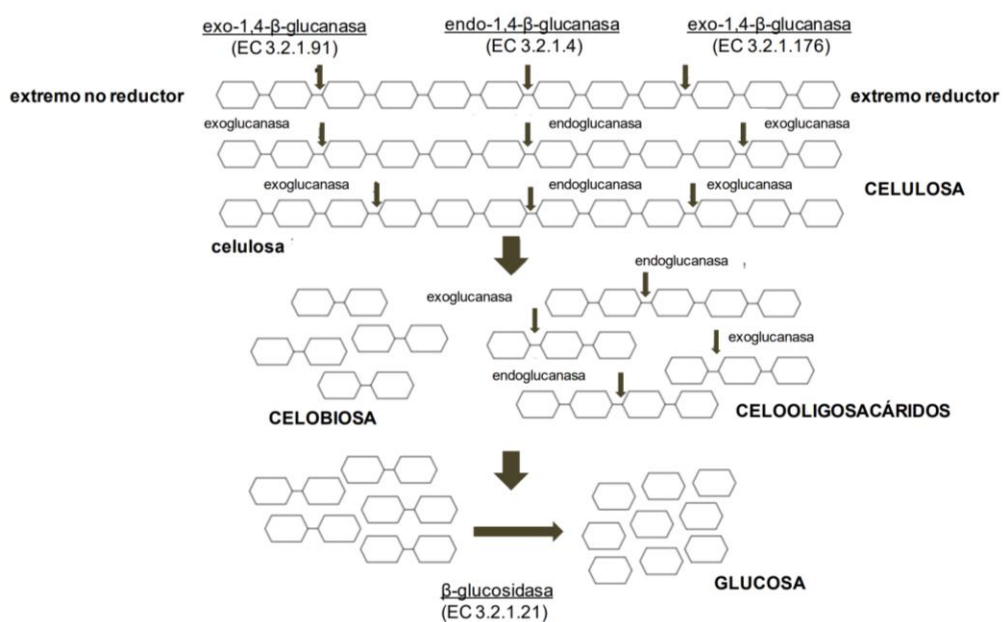
Según Fatani et al. (2021), las celulasas se clasifican según el sitio hidrolítico específico en tres grupos: Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que actúan al azar en sitios amorfos internos en la cadena de polisacáridos de celulosa, generando oligosacáridos de diversas longitudes y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena, los cuales son fácilmente atacados por otros tipos de enzimas como exoglucanasas  $\beta$ -glucosidasas. La

actividad más alta de esta enzima generalmente ocurre contra formas de celulosa soluble o celulosa amorfa tratada con ácido. Las exoglucanasas (EC 3.2.1.91), tienen la función de producir unidades de glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasa), atacando el extremo reductor o no reductor de las cadenas de polisacáridos de celulosa. Así mismo, estas enzimas son activas contra sustratos cristalinos como Avicel, celulosas amorfas y celooligosacáridos, sin embargo, son inactivos contra la celobiosa o las celulosas solubles sustituidas como la CMC (carboximetilcelulosa). Finalmente, la  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) se encarga principalmente de hidrolizar la celobiosa a glucosa desde los extremos no reductores (Figura 3).

Los productos de endoglucanasas y exoglucanasa, son celodextranos y celobiosa, los cuales inhiben la actividad de la enzima. Por lo tanto, la hidrólisis eficiente de la celulosa requiere la presencia de  $\beta$ -glucosidasa que escinden los enlaces glucosídicos finales produciendo glucosa. Así pues, existe un alto grado de sinergia entre estas enzimas, que se requiere para la hidrólisis eficiente de la celulosa.

Figura 3

Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la celulosa



*Nota.* Obtenido de Caracterización de enzimas activas sobre carbohidratos de un aislamiento de *Cellulomonas* sp. para degradación de biomasa lignocelulósica (Piccinni, 2019)

### 1.5.3 β-glucosidasa (EC 3.2.1.21)

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en todos los dominios de la vida (Archaea, Eubacteria y Eukaryotes) y desempeñan diversas funciones, incluyendo la conversión de biomasa en microorganismos, la degradación de glucolípidos y glucósidos exógenos en animales, en procesos como la lignificación, la activación de conjugados de fitohormonas, la liberación de aromas en plantas, entre otros (Ahmed et al., 2017).

Entre las décadas de 1970 y 1980, se despertó un gran interés en la  $\beta$ -glucosidasa debido a consideraciones prácticas en la sacarificación enzimática de la celulosa utilizando preparaciones de celulasa de *Trichoderma reesei*. Esto se debió a que la adición de esta enzima a las mezclas de reacción aumentaba tanto la velocidad como el grado de hidrólisis de la celulosa. Posteriormente se explicó que la  $\beta$ -glucosidasa tenía un efecto estimulante al descomponer la celobiosa y reducir la inhibición causada por el producto final de la actividad de la celulasa (Sternberg, 1976). En base a ello se definió a la  $\beta$ -glucosidasa como enzimas capaces de hidrolizar enlaces  $\beta$ -glucosídicos presentes en sacáridos y glucósidos, liberando glucosa como producto final.

Basándose en su actividad hidrolítica, la  $\beta$ -glucosidasa puede ser utilizada en la producción de bioetanol, la mejora del aroma en la industria del vino y los jugos de frutas a través de la liberación de los compuestos aromáticos de los glucósidos sin sabor. También se utilizan para hidrolizar isoflavonas, glucósidos aumentando así su absorción del intestino delgado afectando positivamente la salud humana (Ahmed et al., 2017). Por otro lado, esta enzima también posee actividad sintética, la  $\beta$ -glucosidasa se utiliza en la biosíntesis de oligosacáridos y glucósidos de alquilo, tales compuestos tienen una amplia gama de usos en las ciencias médicas como agentes terapéuticos, herramientas de diagnóstico, y como promotores del crecimiento de bacterias probióticas. Los glucósidos de alquilo tienen propiedades tensioactivas aniónicas, y pueden ser utilizados como agentes

antimicrobianos, en las industrias farmacéutica, cosmética, de detergentes y alimentaria (Yang et al., 2022).

#### **1.5.4 Clasificación de $\beta$ -glucosidasa**

Las  $\beta$ -glucosidasas son un grupo heterogéneo de enzimas hidrolíticas, y se han clasificado según diversos criterios, no hay un solo método bien definido para su clasificación, pero en general en la literatura aparecen dos métodos para su clasificación, los cuales se basan en el sustrato de especificidad, y la clasificación basada en la identidad de secuencias de nucleótidos, así como la de grupo hidrofóbico.

Según la especificidad de los sustratos, las  $\beta$ -glucosidasas se clasifican en tres clases: (I) las aril- $\beta$ -glucosidasas que hidrolizan solo el enlace aril- $\beta$ -glucósido, (II) las que solo hidrolizan celobiosa, (III) glucosidasas de amplia especificidad de sustrato, que exhiben actividad en muchos tipos de sustrato, por lo que tienen capacidades para la escisión de enlaces glucosídicos  $\beta$  1-4;  $\beta$  1-6;  $\beta$  1-2 y  $\alpha$  1-3;  $\alpha$  1-4. Además, estas son las  $\beta$ -glucosidasas que se encuentran con mayor frecuencia en fuentes microbianas (Bhatia et al., 2002).

También se propuso una clasificación en familias, basadas en similitudes de la secuencia de aminoácidos, debido a que existe una relación directa entre la secuencia de aminoácidos y las similitudes de plegamiento de la enzima. La ventaja que presenta este sistema de clasificación a comparación del anterior, radica en que refleja las características

estructurales de estas enzimas mejor que su única especificidad de sustrato; ayuda a revelar las relaciones evolutivas entre estas enzimas; y proporciona una herramienta conveniente para derivar información del mecanismo molecular de la enzima. Dicho sistema se denomina como enzimas activas de carbohidratos, o por sus siglas en inglés CAZY (Carbohydrate Active Enzyme), y agrupa a las enzimas en familias, basándose en características estructurales similares, especialmente aquellas relacionadas con los residuos catalíticos conservados y el mecanismo de catálisis enzimática (Yin et al., 2019). En la actualidad, hay 174 familias de glucósidos hidrolasas (GH) que se enumeran en el sitio web (<http://www.cazy.org>) que se actualiza con frecuencia. Las  $\beta$ -glucosidasas son el grupo más grande de enzimas en las familias GH, estando presentes en las familias GH 1, GH 3, GH 5, GH 9, GH 30 y GH 116 (Abdeljalil et al., 2019). La familia de glucósidos hidrolasas 1 (GH 1) presenta una parte considerable de las  $\beta$ -glucosidasas caracterizadas y está ampliamente presente en bacterias, insectos, vertebrados y plantas. En procariotas, las GH1 se dividen en ocho subfamilias, incluidas seis en bacterias y dos en arqueas. En eucariotas, las GH 1 se clasifican en seis subfamilias, incluida una en plantas, una en insectos, tres en mamíferos y una en hongos (He et al., 2022). Una gran parte de las  $\beta$ -glucosidasas bacterianas reportadas son intracelulares y pertenecen a la familia GH 1, por mencionar algunos ejemplos como: *Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus bogoriensis*, *Bacillus aurantiacus*, *Clostridium thermocellum*, *Pyrococcus furiosus*, *Lactobacillus brevis* y *Caldicellulosiruptor*

*saccharolyticus* (Zanphorlin et al., 2016). Por otro parte, la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas fúngicas reportadas son extracelulares y pertenecen a la familia GH 3, mencionando algunas de las especies más representativas como: *Penicillium decumbens*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus oryzae* (Mohsin et al., 2019).

### **1.5.5 Mecanismo catalítico de la $\beta$ -glucosidasa**

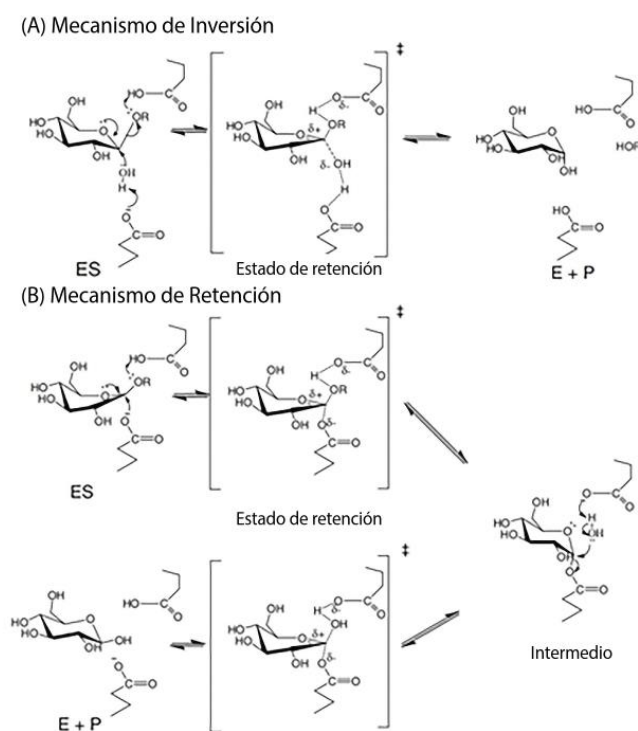
Las  $\beta$ -glucosidasas de las familias GH1 y GH3, son retenedoras e inversoras (Figura 4), pero en su mayoría son retenedoras, y catalizan la hidrólisis en dos pasos, glicosilación y desglicosilación. El glutamato es el residuo clave del sitio activo de las  $\beta$ -glucosidasas, dos de estos residuos de glutamato realizan la reacción catalítica general de la  $\beta$ -glucosidasa, donde uno de ellos actúa como nucleófilo y el otro residuo funciona como un catalizador ácido/base general (Davies y Henrissat, 1995).

Como primer paso de la hidrólisis de las  $\beta$ -glucosidasas retenedoras, se tiene a la glicosilación, donde un residuo de glutamato conservado actúa como nucleófilo y ataca los enlaces glucosídicos de la celobiosa. Esto da como resultado la formación de un complejo intermedio glucosa-enzima, durante el segundo paso llamado desglicosilación, otro residuo de glutamato conservado activa una molécula de agua presente en las proximidades mediante una reacción general de catalizador ácido/base y ahora esta molécula de agua activada actúa sobre el complejo intermedio glucosa-enzima, para liberar el residuo de glucosa. Por el lado opuesto, las enzimas inversoras catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico en una reacción de un

solo paso en la que una molécula de agua actúa como nucleófilo y ataca el átomo de carbono anomérico (el carbono que está unido al oxígeno en el anillo de azúcar) de un sustrato de glucósido. Esto provoca la ruptura del enlace glucosídico y la liberación de aglicona (la parte no glucosídica de la molécula). En este proceso, la quiralidad del carbono anomérico se invierte, lo que significa que su configuración espacial cambia de una forma a otra (Singh et al., 2016).

#### Figura 4

##### Mecanismo catalítico de la $\beta$ -glucosidasa



*Nota.* Adaptado de Retaining catalytic mechanisms of inverting and retaining  $\beta$ -glucosidasas (p.3398), por Cairns y Esen, (2010), Cellular and Molecular Life Sciences , 67(20).

### **1.5.6 Producción de $\beta$ -glucosidasa en hongos termófilos**

Solo un pequeño número de especies de hongos poseen la capacidad de prosperar en un rango de temperaturas que oscila entre 45 y 55°C. Estas variedades de hongos se pueden dividir en dos categorías, termófilos y termotolerantes, según sus límites de temperatura para el crecimiento. Los hongos termófilos tienen una temperatura mínima de crecimiento igual o superior a 20°C y una temperatura máxima de crecimiento igual o superior a 50°C. Por otro lado, las formas termotolerantes pueden crecer en un rango de temperaturas que va desde -20°C hasta alrededor de 55°C. (Maheshwari et al., 2000).

Los hongos termófilos como *Talaromyces thermophilus*, *Aspergillus fumigatus* y *Thermomyces lanuginosus*, destacan por su eficiente capacidad para descomponer los polisacáridos que conforman la biomasa, por lo que prosperan en grandes acumulaciones de material vegetal, como las pilas de compostaje, que crean un entorno cálido, húmedo y aeróbico ideal para su crecimiento. Además, las características de sus enzimas no solo varían entre distintas especies, sino también entre cepas de una misma especie. En particular, sus enzimas extracelulares exhiben temperaturas óptimas de actividad que son cercanas o incluso superiores a la temperatura óptima para el crecimiento del propio organismo, pudiendo producir enzimas termoestables que mantienen su actividad a temperaturas entre 40 y 70°C (Mohammad et al., 2023).

La investigación sobre diversos géneros de hongos ha impulsado la producción comercial de enzimas extracelulares de hongos termófilos, como la  $\beta$ -glucosidasa. El género *Aspergillus*, particularmente *Aspergillus niger*, ha sido ampliamente estudiado y se destaca como líder en la producción comercial de esta enzima. No obstante, en años recientes, se han publicado estudios sobre  $\beta$ -glucosidasas altamente eficientes provenientes de otras especies de *Aspergillus* y del género *Penicillium* (D. Liu et al., 2012). Así mismo, la literatura describe que, por lo general, en la fermentación en estado sólido los hongos producen  $\beta$ -glucosidasa en cantidades de 8,9 U/gss a 105,0 U/gss (Unidades por gramo de sustrato seco) (Frassatto et al., 2021). Sin embargo, estos valores pueden variar de acuerdo a las condiciones de cultivo, y del medio de producción, como sucede con las fuentes de carbono en el caso de *Penicillium funiculosum* NCL1, cuya producción de  $\beta$ -glucosidasa fue de 144 U/mL utilizando residuos de fábricas de papel como fuente de carbono, en contraste con la celulosa en polvo que solo produjo 3,1 U/ml. Estos resultados pueden deberse a que los sustratos celulósicos disponibles de forma natural son ricos en celulosa, xilano, proteínas, grasas, fibra y minerales, lo que los convierte en aditivos beneficiosos para el crecimiento de hongos y la producción de enzimas. Así mismo, según este mismo trabajo la producción de  $\beta$ -glucosidasa fúngica puede no estar correlacionada con el crecimiento y la producción de masa micelial (Ramani et al., 2012).

**Tabla 1**

Condiciones fisiológicas para la producción de  $\beta$ -glucosidasa por hongos

Hongo	Condiciones fisiológicas				Actividad BGL (U/mL)
	T°C	pH	Fermentación	Sustrato	
<i>Trichoderma a troviridae</i> TUB F-1505	30°C	6,2	Sumergida	Sauce pretratado al vapor	5,30
<i>Penicillium oxalicum</i>	30°C	-	Sumergida	Celulosa Microcristalina	150
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	70°C	4,0	Sumergida	Glucosa	1,8
<i>Penicillium piceum</i>	55°C	5,0	Sumergida	Avicel	53,12
<i>Penicillium echinulatum</i>	50°C	4,8	Sumergida	Celulosa Microcristalina + Glucosa + Salvado de Soya	1,5
<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361 U2/1	30°C	8,0	Sumergida	Salvado de Trigo	104,7
<i>Penicillium sp.</i> LMI01	60°C	6,0	Sumergida	Carboximetilcelulosa (CMC)	0,058 $\pm$ 0,004
<i>Aspergillus flavus</i>	37°C	-	Sumergida	Salvado de Trigo	0,64
<i>Lichtheimia ramosa</i>	32°C	-	Sumergida	Semillas de Lino	3,54

*Nota.* Adaptado de Various microorganisms producing  $\beta$ -glucosidases under different physiological conditions and the activity of produced beta-glucosidase (BGL) in (IU/mL). (p.220), por Srivastava et al. (2019), Biomolecules 2019, 9(6).

### **1.5.7 Factores influyentes en la actividad de $\beta$ -glucosidasa**

#### **1.5.7.1. Temperatura**

Las enzimas presentan una sensibilidad notable a los cambios de temperatura. Su comportamiento, como la mayoría de reacciones químicas, obedece a la regla de Van't Hoff, la cual indica que las tasas de reacción se duplican por cada incremento de temperatura de 10°C, ya que un aumento de temperatura incrementa la energía cinética de las moléculas reactantes, y dicho aumento de energía cinética, facilita un mayor número de colisiones exitosas entre las moléculas, lo cual resulta en una aceleración de la tasa de reacción. Asimismo, la temperatura donde la enzima funciona con la máxima eficiencia, catalizando la reacción a su velocidad más alta, se denomina como temperatura óptima (Yeoman et al., 2010). Para las  $\beta$ -glucosidasas termófilas producidas por hongos, la temperatura óptima varía de entre 50 a 80°C (Bala y Singh, 2019).

Cuando una enzima se expone a temperaturas fuera de su rango óptimo, puede desnaturalizarse, y sufrir alteraciones significativas en su estructura y función, sin embargo, las enzimas termófilas, muestran adaptaciones específicas que les permiten mantener su actividad a temperaturas elevadas. Estas adaptaciones incluyen una estructura formada principalmente por residuos hidrofóbicos y cargados, con una menor proporción de residuos polares no cargados, en comparación con las proteínas mesófilas. Asimismo, estos residuos hidrofóbicos son abundantes en aminoácidos como la Valina e Isoleucina, por lo que predominan en

muchas de las proteínas termófilas, ya que tienden a agruparse en el núcleo de la enzima para reducir la exposición a solventes, formando interacciones estabilizadoras de Van Der Waals con otros residuos hidrofóbicos, posiblemente debido a la falta de direccionalidad, permitiendo que la enzima adopte una conformación que minimiza los huecos en su estructura y maximiza el área de superficie de contacto. Además, los residuos cargados correctamente orientados, permiten la formación de puentes salinos estabilizadores, cuya contribución energética a la estabilidad del plegamiento proteico suele ser mayor que la de las interacciones hidrofóbicas. También las interacciones aromáticas y los puentes disulfuro contribuyen a la estabilidad de la proteína frente a condiciones de altas temperaturas (Rigoldi et al., 2018).

#### **1.5.7.2. pH**

La medición del pH indica la concentración de protones ( $H^+$ ) en el medio, lo cual es crucial para la actividad enzimática. Las enzimas, a través de su acción catalítica, desplazan electrones y protones hacia diferentes sitios dentro de una molécula, facilitando la formación y ruptura de enlaces químicos, lo que altera la estructura de las moléculas de sustrato. El pH óptimo de una enzima es el valor de pH en el cual su actividad catalítica es máxima. Por el contrario, cambios en el pH del medio pueden alterar el estado de protonación de los grupos carboxílico ( $-COOH$ ) y carboxilato ( $-COO^-$ ) en el sitio activo de la enzima, afectando negativamente la catálisis enzimática (Maheshwari et al., 2000). Aunque los valores de pH son muy diferentes

dependiendo de la fuente de  $\beta$ -glucosidasas, las que son producidas por hongos generalmente tiene un pH óptimo en un rango de entre 4 a 6, y su actividad disminuye significativamente a pH más bajos (Magwaza et al., 2024).

**Tabla 2**

*Hongos productores de  $\beta$ -glucosidasa y sus características enzimáticas*

Microorganismo	Actividad			Temp.	pH	Ref.
	Sustrato	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Óptimo (°C)	Óptimo	
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 599	p-NPG	3,11	20,83	60	4,80	(Zahoor et al., 2011)
<i>Aspergillus saccharolyticus</i>	p-NPG	1,9	45	58	4,20	(Sørensen et al., 2012)
<i>Daldinia eschscholzii</i>	p-NPG	1,52	3,21	50	5,00	(Karnchanatat et al., 2007)
<i>Penicillium funiculosum</i> NCL1	p-NPG	0,057	1920	60	4,0–5,0	(Ramani et al., 2012)
<i>Aspergillus terreus</i>	p-NPG	1,73	42,37	65	5,00	(Yan et al., 2016)

### 1.5.7.3. Iones Metálicos

Algunas enzimas, además de necesitar una coenzima, requieren un ion metálico para su actividad completa. La falta de estos iones a menudo reduce la actividad enzimática o incluso la elimina por completo. Sin embargo, los metales son modificadores inorgánicos comunes que, además de acelerar

la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas (activadores), también pueden inhibir esta velocidad (inhibidores) (Dikshit y Tallapragada, 2014).

Los iones metálicos pueden estar presentes en el agua, pueden provenir de la corrosión del equipo, u otros reactivos utilizados en procesos industriales donde se emplea  $\beta$ -glucosidasa y otras enzimas. A pesar de esto, los mecanismos exactos de interferencia no se comprenden completamente y se necesitan más datos para determinar si la inhibición o activación ocurre mediante un mecanismo alostérico o no alostérico. El tamaño del ion, además de su carga, afecta la actividad y estabilidad de la enzima. Los iones con un radio más grande tienden a influir menos en los aminoácidos catalíticos de las enzimas debido a su menor densidad de carga y, por lo tanto, tienen menos impacto en la conformación de la enzima. Por otro lado, los iones más pequeños tienen una mayor densidad de carga, lo que les permite interactuar más fuertemente con los aminoácidos cargados. Estas interacciones pueden causar cambios en la conformación de la enzima, especialmente en su sitio activo, lo que puede dañar la función de la enzima al afectar su capacidad para catalizar reacciones químicas (Prejanò et al., 2020).

El impacto de iones divalentes en las actividades de las celulasas parece ser variable entre las enzimas producidas por distintos microorganismos. Además, el mecanismo exacto por el cual los iones divalentes afectan a las celulasas no está completamente comprendido, pero podría deberse a efectos redox sobre los aminoácidos, lo que podría aumentar o disminuir sus actividades. Por ejemplo, se ha observado que los

iones  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  tienden a inhibir las actividades de las celulasas, incluidas las  $\beta$ -glucosidasas, muy probablemente debido a la formación de complejos entre estos iones y aminoácidos específicos, como D/L-lisina y L-metionina en el caso de  $\text{Fe}^{2+}$ , histidina en el caso de  $\text{Cu}^{2+}$ , arginina, glutamina, prolina, serina y valina en el caso del  $\text{Ba}^{2+}$  (Pereira et al., 2017).

**Tabla 3**

*Activación e Inactivación de  $\beta$ -glucosidasa fúngica por iones metálicos*

Hongo Productor	Activador	Inhibidor	Referencia
<i>Penicillium citrinum</i> YS40-5	$\text{Na}^+$	$\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$	(Pereira et al., 2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$	$\text{Hg}^{2+}$	(Pereira et al., 2017)
<i>Monascus sanguineus</i>	-	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{K}^+$	(Dikshit y Tallapragada, 2014)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	$\text{Zn}^{2+}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ ,	$\text{Ca}^{2+}$	(Karnaouri et al., 2013)
<i>Thermomyces dupontii</i>	-	$\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$	(Nisar et al., 2022)
<i>Penicillium funiculosum</i>	$\text{Na}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$	(Ramani et al., 2012)
<i>Penicillium simplicissimum</i> H-11	$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Sn}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$	(Bai et al., 2013)

#### 1.5.7.4. Glucosa

Un factor considerable en la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, es el producto final de la hidrólisis de celulosa, la glucosa, que generalmente no se

elimina durante la hidrólisis y se va acumulando, lo que significa que la velocidad de reacción real de la enzima difiere cada vez más de la máxima velocidad de reacción. En ese sentido, la acumulación de glucosa durante la hidrólisis puede disminuir considerablemente la velocidad de hidrólisis de la celulosa, debido a la inhibición de las enzimas por parte del producto, ya sea bloqueando los sitios activos o impidiendo que el sustrato hidrolizado se libere. Además de la glucosa, otros compuestos presentes en la biomasa, como otros azúcares simples, derivados de azúcares, aminos y fenoles, pueden ser inhibidores y afectar la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa (Chauve et al., 2010).

Las  $\beta$ -glucosidasas se pueden clasificar según su respuesta a la inhibición por glucosa en las siguientes categorías: (I) aquellas que son fuertemente inhibidas por bajas concentraciones de glucosa, (II) aquellas que toleran la glucosa, (III) aquellas que son estimuladas por bajas concentraciones de glucosa, pero inhibidas por concentraciones más altas, y (IV) aquellas que no son inhibidas por altas concentraciones de glucosa. Aunque, la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas resistentes a la glucosa pertenecen a la familia GH1 (origen bacteriano generalmente), también se pueden encontrar algunas GH3 en esta clase (origen fúngico) (Salgado et al., 2018).

La inhibición de la  $\beta$ -glucosidasa por la glucosa representa un desafío significativo para la producción de azúcares fermentables a partir de la celulosa en biomasa vegetal. Una estrategia para superar este problema es llevar a cabo la sacarificación y fermentación simultánea, donde la celulosa

se descompone en glucosa y esta se fermenta inmediatamente en etanol por microorganismos fermentadores. Esto reduce el impacto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad enzimática. Sin embargo, las enzimas utilizadas en este proceso deben ser resistentes a la presencia de etanol (Garbin et al., 2021).

Las concentraciones de glucosa en los hidrolizados enzimáticos de lignocelulosa pueden alcanzar niveles de 650–1000 mM, en condiciones de alta concentración de sólidos. Sin embargo, la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas actualmente disponibles en el mercado, son sensibles a concentraciones de glucosa que van desde 0,5 a 100 mM. Asimismo, valores de  $K_i$  superiores a 200 mM indican que la mayor parte de la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se inhibirá durante la hidrólisis de la celulosa a glucosa (Srivastava et al., 2019). Las  $\beta$ -glucosidasas tolerantes a la glucosa pueden eludir el problema de la inhibición por retroalimentación en la producción de bioetanol, de hecho, se ha demostrado la eficiencia de las enzimas tolerantes a la glucosa en la hidrólisis de celobiosa en presencia de un 6% (p/v) de glucosa. Como sucede en la suplementación de un cóctel enzimático para la hidrólisis del bagazo de caña con la  $\beta$ -glucosidasa estimulada por glucosa de *Scytalidium thermophilum*, que aumentó la liberación de azúcares reductores en aproximadamente un 50%. También, se ha demostrado que la aplicación de  $\beta$ -glucosidasas tolerantes a la glucosa mejoró la eficiencia de sacarificación del bagazo explotado con vapor, aumentando el rendimiento total de azúcares en un 20% en 12 horas. (Salgado et al., 2018).

Es así el gran interés del aislamiento y la caracterización de  $\beta$ -glucosidasas que toleren la glucosa, ya que pueden ayudar en el diseño de mejores cócteles de enzimáticos para la hidrólisis de biomasa, y a desarrollar enfoques específicos para modificar la tolerancia a la glucosa de las  $\beta$ -glucosidasas existentes (Zang et al., 2018).

#### **1.5.7.5. Etanol**

El etanol puede tener un impacto significativo en la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, sobre todo en un contexto en el que se dé la sacarificación de la biomasa lignocelulósica, y la fermentación en simultáneo. Donde dichas fermentaciones por lo general no superan el 10% de etanol, ya que pueden resultar dañinas para la levadura fermentadora (Garbin et al., 2021).

Por un lado, se ha observado que concentraciones moderadas de etanol pueden tener un efecto estabilizador en la estructura de la  $\beta$ -glucosidasa, reduciendo su inactivación térmica y preservando su actividad en condiciones operativas prolongadas. Esto lo refleja el estudio sobre *Aspergillus sp.* DHE7, que informa acerca de la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, y como aumenta un 25% en presencia de un 15% de etanol y mantiene su actividad al 20% de etanol. Lo cual sugiere que el etanol puede estabilizar la estructura de la enzima, haciéndola adecuada para procesos industriales que involucran la producción de etanol (Ghonemy, 2021).

Por otro lado, concentraciones más altas de etanol pueden inhibir la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa. Como sucedió con *Thermomucor indicae-*

*seudaticae*, cuya  $\beta$ -glucosidasa mostró una actividad residual del 21,5% de al aumentar la concentración de etanol al 20% (Martins et al., 2019). Este efecto inhibitor se debe a la competencia entre el etanol y el sustrato natural de la enzima por el sitio activo (inhibición competitiva), así como a posibles cambios conformacionales inducidos por la interacción del etanol con la proteína (inhibición no competitiva). La inhibición puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la concentración de etanol y del tiempo de exposición (Li et al., 2020).

Es así que, la comprensión del impacto del etanol sobre la  $\beta$ -glucosidasa fúngica es esencial para diseñar estrategias de mitigación y mejorar la eficiencia de los procesos biotecnológicos que involucran la conversión de biomasa lignocelulósica a bioetanol, así como para el desarrollo de formulaciones enzimáticas más robustas y resistentes a las condiciones adversas de los procesos industriales.

#### **1.5.7.6. Importancia de la $\beta$ -glucosidasa en la hidrolisis de celulosa**

La producción de bioetanol a partir de fuentes renovables ha ganado atención en la última década debido a la preocupación por el agotamiento de los combustibles fósiles y el impacto sobre el medio ambiente. La biomasa vegetal lignocelulósica está disponible en abundancia en todo el mundo; las fuentes celulósicas como el rastrojo de maíz, el bagazo de caña de azúcar, el arroz y la paja de trigo son las fuentes más prometedoras para ser utilizadas como sustratos para la producción de bioetanol (Rezania et al., 2020).

Actualmente se utilizan preparaciones celulolíticas comerciales para la hidrólisis de biomasa, tales como Celluclast® (Novo Nordisk), Acellerase® (Sigma-Aldrich), Cellic® CTec2 y Cellic® CTec3 (Novozymes), que en su mayoría incorporan celulasas de origen fúngico en su composición. Uno de los hongos utilizados en dichas preparaciones celulíticas comerciales, y siendo uno de los más estudiados es *Trichoderma reesei*, debido a que secreta una mezcla de celulasas compuesta principalmente por exoglucanasas y endoglucanasas (conforman más del 92% de toda la celulasa que producen), y solo un pequeño porcentaje de  $\beta$ -glucosidasas (Costa et al., 2018). Sin embargo, las aplicaciones industriales de estas enzimas enfrentan muchas dificultades, como valores de pH bajos, concentración de sales, respuesta a iones metálicos, baja durabilidad, inestabilidad en entornos industriales, y un rango de temperatura funcional moderado, siendo este último factor de gran importancia, ya que el aumento de la temperatura mejora la eficiencia catalítica, además que alivia la inhibición del producto de endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Srivastava et al., 2019). Es así que las investigaciones actuales se enfocan en encontrar o desarrollar microorganismos con alta productividad de  $\beta$ -glucosidasa, con alta tolerancia a la glucosa, termoestabilidad y eficiencia catalítica (Yousef y Mawad, 2023).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 *Material Biológico*

El hongo termófilo cepa FC-13 pertenece a la colección de hongos termófilos del Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la UNJBG (Anexo 1). Que fue aislado de las plantas piloto de compostaje de residuos orgánicos de la Municipalidad Provincial de Tacna. Y cuyas secuencias de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) tuvo un porcentaje de identidad del 99,84% con *Thermomyces dupontii* NRRL2155. El cual fue gentilmente proporcionado para la presente investigación.

#### 2.1.2 *Equipos*

- Incubadora estática (T° máx 80°C)
- Lector de microplaca
- Agitador orbital
- Cocina eléctrica
- Cámara de refrigeración (-20 °C)
- Cabina de bioseguridad Tipo II
- Autoclave
- Horno esterilizador
- Microscopio óptico
- Ultracongeladora
- Balanza analítica
- Centrífuga refrigerada
- Centrífuga universal
- Shaker
- Transiluminador

- Sistema de documentación de gel
- Fuente de poder
- Thermomixer
- Baño María
- Agitador magnético
- pH-metro
- Cámara de electroforesis vertical

### **2.1.3 Instrumentos y material de vidrio**

- Microplacas de reacción transparente con fondo plano
- Micropipetas multicanal (0,5-10; 20-300  $\mu$ L)
- Micropipetas monocanal (20-200; 100-1000  $\mu$ L)
- Cámara de Neubauer
- Matraces de Erlenmeyer (50, 250, 500 mL)
- Probetas (25, 50, 100, 500 mL)
- Vasos de precipitados (50, 100, 250 mL)
- Tubos Falcon de 12 y 50 mL
- Microtubos Eppendorf de 2mL
- Piseta
- Embudo de vidrio
- Dispositivo de filtrado centrifugo Amicon ® Ultra-4 10 K

### **2.1.4 Reactivos químicos**

- Agar PDA
- Peptona
- Extracto de levadura
- Sulfato de magnesio
- Hidróxido de sodio
- Cloruro de calcio
- Fosfato mono potásico
- Sulfato de amonio
- Acetato de sodio

- Para-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (p-NPG)
- Carbonato de sodio
- Metanol
- Ácido acético glacial
- Dodecilsulfato de sodio (SDS)
- Persulfato de Amonio (APS)
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)
- Poliacrilamida
- Azul brillante de Coomassie® R-250
- Marcador de peso molecular de la marca Spectra-260kDa.
- Reactivo Wiener para Glicemia enzimática
- Papel filtro Whatman grado 1
- Celulasa comercial (Celluclast ® 1.5L)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )
- Cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ )
- Cloruro de potasio (KCl)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

## **2.2 Diseño de investigación y tratamiento estadístico de datos**

En esta tesis se llevó a cabo una investigación de carácter básico descriptivo. Se empleó estadísticos descriptivos como media, coeficiente de variación y error estándar, para la evaluación de la producción de  $\beta$ -glucosidasa durante un período de 22 días, utilizando como variables de respuesta la actividad enzimática (U/ml). De la misma manera, se emplearon estos estadísticos descriptivos para la purificación de la  $\beta$ -glucosidasa utilizando sulfato de amonio en concentraciones del 10% al 90%.

Los ensayos experimentales empleados para la determinación del pH y temperatura óptima, se realizaron por triplicado y se promediaron los valores de actividad relativa. Además, los datos fueron sometidos a análisis estadísticos utilizando el programa Statgraphics Centurion 19. Dichos análisis incluyeron una prueba de análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia estadística de  $p < 0,05$  para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, es decir, contrastamos la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que no hay diferencias en las medias de los tratamientos frente a la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) de que al menos la media de un tratamiento difiere de los demás. Y se complementó con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con el fin de determinar cuáles tratamientos presentaban diferencias significativas en la actividad enzimática. Esto permitió identificar las condiciones óptimas de pH y temperatura para la actividad máxima de la  $\beta$ -glucosidasa.

Se utilizaron los mismos estadísticos descriptivos mencionados anteriormente para tratar los datos de la estabilidad térmica, efecto de iones metálicos, glucosa y etanol. La estabilidad térmica se evaluó midiendo la actividad enzimática residual, sometiendo la enzima a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 y 80°C) en un periodo de 5 horas (300 min), y 96 horas para las temperaturas de 50 y 60°C. Asimismo, se utilizaron diferentes concentraciones de iones metálicos (1, 5, y 10 mM), glucosa (1 a 100 mM) y etanol (0 al 40%) para determinar el efecto sobre la actividad relativa.

Para determinar los parámetros cinéticos  $V_{\max}$  y  $K_m$  de la  $\beta$ -glucosidasa, se utilizó el software Origin Pro. Primero, ingresando los datos de concentración del sustrato (mM) y velocidad de reacción (U/mg). Luego, se utilizó la función de ajuste no lineal, para determinar los parámetros cinéticos en la ecuación de Michaelis-Menten. Finalmente se validó el ajuste mediante el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), y se visualizaron los resultados a través de un gráfico que mostraba la curva ajustada junto con los datos experimentales.

Por último, para determinar el efecto de la  $\beta$ -glucosidasa sobre la sacarificación de celulosa en el bagazo de caña pretratado, se utilizó una celulasa comercial como tratamiento 1 ( $T_1$ ), mientras que el tratamiento 2 ( $T_2$ ) consistió en la  $\beta$ -glucosidasa purificada y la celulasa comercial. Estos se evaluaron en diferentes tiempos (2, 4, 8, 16, y 24 horas), en consecuencia, se utilizó un ANOVA mixto de factores intrasujetos e intersujetos (ANOVA de medidas repetidas con factor intersujetos), para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de glucosa liberada a partir del bagazo de caña en los 2 tratamientos, y evaluar la significancia de la interacción tiempo por tratamiento.

## 2.3 Métodos

### 2.3.1 Producción de $\beta$ -glucosidasa

#### 2.3.1.1. Reactivación y preparación del cultivo

La cepa de hongo termófilo FC-13 se mantuvo preservada en un vial con agar papa dextrosa (PDA; 200 g de papa, 20 g de glucosa, 20 g de agar, 1000 ml de agua destilada) inclinado a 4°C. Para la reactivación se utilizó 2 mL de caldo de Soya Tripticasa, y fue incubado a 50°C durante 24 a 48 horas. Luego se realizó la siembra en placas de PDA a partir del micelio formado en la reactivación, dejando en incubación a 50°C por 7 días (Anexo 2). Posteriormente, una vez que el hongo haya desarrollado su crecimiento, la colonia pura aislada fue seccionada y transferida a una nueva placa con Agar PDA (Anexo 3), la cual se incubó a 50°C hasta la esporulación (Bonfá et al., 2018).

#### 2.3.1.2. Producción enzimática

El medio de cultivo se preparó utilizando una solución Mandels y Weber, (1969), la cual consistió en los siguientes componentes por cada 100 mL: urea 0,03 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,14 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g;  $\text{CaCl}_2$  0,03 g;  $\text{MgSO}_4$  0,03 g; extracto de levadura 0,025 g; peptona 0,075 g. Combinando con 1 gramo de hojas de perejil en polvo como fuente de carbono e inductor para la producción de la enzima, de modo que estuviese a una concentración del 1% (p/v). Asimismo, se añadieron 0,1 mL de una solución de trazas ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 mg;  $\text{CoCl}_2$  200 mg;  $\text{MnSO}_4$  16 mg;  $\text{ZnSO}_4$  14 mg disueltos en 10 mL de agua destilada) por cada 100 mL del medio Mandels-Weber final.

Por otra parte, el inóculo consistió en un volumen del 5 % respecto al volumen total (100 mL), es decir 5 mL de una suspensión de esporas de  $10^7$ /mL. Y su preparación se realizó de la siguiente manera: las esporas se recolectaron de las placas del hongo cultivado utilizando un asa y se suspendieron en un microtubo que contenía 1 mL de solución de Tween 80 al 0,1% (v/v). Posteriormente, esta suspensión se agitó en un vortex durante 30 segundos para asegurar la adecuada separación de las esporas, y seguidamente se hizo su conteo en una cámara de Neubauer, en 4 cuadrantes grandes de las esquinas. Dicho conteo se repitió tres veces para obtener un promedio del total de las esporas que había en cada cuadrante, y como en la cámara de Neubauer cada cuadrante grande tiene un volumen de 0,1  $\mu$ L, se calculó el número de esporas que habrían en 1 mL, y así se determinó la concentración final del inóculo (esporas/mL). Una vez hecho esto se procedió a hacer diluciones hasta obtener una concentración de  $10^7$  esporas/mL, la cual fue verificada nuevamente en la cámara de Neubauer. Una vez hecho el inóculo, el cultivo se mantuvo en incubación a una temperatura de 50 °C durante un período de 22 días (Anexo 4). Y se recolectaron muestras del sobrenadante de 550  $\mu$ L diariamente, que se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos, para poder medir la actividad  $\beta$ -glucosidasa (U/mL) y proteínas totales (mg/mL) del sobrenadante.

### **2.3.1.3. Obtención del extracto crudo**

Para la obtención del extracto crudo, se colocó el volumen total del medio de producción en una tela de muselina y se exprimió. El líquido

obtenido se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se filtró a través de papel filtro Whatman N°1, de modo que lo filtrado se utilizó como extracto crudo de la  $\beta$ -glucosidasa para la posterior purificación (Ghonemy, 2021).

### **2.3.2 Purificación de $\beta$ -glucosidasa**

Se utilizó el método de precipitación con sulfato de amonio establecido por Nasir et al. (2011) y modificado por Dikshit y Tallapragada, (2014). Y el cálculo de sulfato de amonio para las diferentes concentraciones, se determinó con el programa ©EnCor Biotecnología Inc. 2023, disponible en internet (<https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>).

Inicialmente, se colocó 100 mL del extracto crudo de la  $\beta$ -glucosidasa en un matraz de 250 mL, luego se añadió sulfato de amonio hasta llegar a una concentración del 10%, y se colocó en un agitador magnético a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se tomó una muestra de 1mL, la cual se centrifugó a 12600 rpm a 4°C por 15 minutos, que permitió la obtención de un pellet que se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) (Anexo 7), para luego medirle la actividad  $\beta$ -glucosidasa, así como la cantidad de proteínas totales. Este procedimiento se repitió con el pellet obtenido a las concentraciones de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90%, con el fin de determinar la concentración en donde haya la mayor actividad enzimática y proteínas totales, para luego obtener el pellet de todo el extracto crudo en dicha concentración (Anexo 8).

Una vez obtenido todo el pellet del extracto crudo, se hizo un procedimiento de lavado, para eliminar sales y demás componentes que no son de interés, para lo cual se utilizaron dispositivos de filtrado centrífugo Amicon® Ultra-4 10 K para volúmenes de hasta 4 mL (Millipore, EE. UU) (Anexo 9). Por lo que se colocó el pellet resuspendido con tampón acetato 25 mM a pH 7, en el dispositivo Amicon, hasta alcanzar un volumen final de 4 mL, para luego centrifugarse a 7000 rpm durante 10 minutos. Repitiéndose el procedimiento 5 veces o hasta que el eluato ya no presente actividad enzimática. Finalmente, la  $\beta$ -glucosidasa quedó concentrada en la parte superior del filtro de Amicon (eluído), y se guardó en un tubo Eppendorf de 2 mL a 4°C para su uso posterior (Magwaza et al., 2024).

### ***2.3.3 Determinación de las características de la $\beta$ -glucosidasa***

#### **2.3.3.1. Determinación de actividad $\beta$ -glucosidasa**

Para ello se utilizó un sustrato cromogénico como el p-nitrofenil glucopiranosido (p-NPG), y se llevó a cabo las reacciones en una microplaca termorresistente. La mezcla de reacción contuvo 75  $\mu$ L de enzima adecuadamente diluida, 7  $\mu$ L de p-NPG 10 mM y 148  $\mu$ L de tampón acetato 100 mM a pH 5,0, para luego incubar la mezcla a 50 °C durante 10 minutos. Finalmente, la reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, y se leyó la absorbancia a 405 nm (Yan et al., 2016).

**Tabla 4***Ensayo en microplaca para determinación de actividad de  $\beta$ -glucosidasa*

Reactivos	Enzima Sustrato	Blanco de la Enzima	Blanco del Sustrato
	(ES)	(BE)	(BS)
Tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM	148 $\mu$ L	155 $\mu$ L	223 $\mu$ L
p-NPG 10mM ( $\mu$ L)	7 $\mu$ L	-	7 $\mu$ L
Enzima diluida ( $\mu$ L)	75 $\mu$ L	75 $\mu$ L	-
Incubar a 50 °C por 10 minutos			
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( $\mu$ L) 500 mM	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Lectura $\lambda$ 405 nm			

Las mediciones de cada pocillo se calcularon restando el valor del blanco de reactivo (BR) y blanco de sustrato (BS). La lectura neta de la absorbancia se determinó de la siguiente manera:

$$LN = ES - (BE + BS)$$

### 2.3.3.2. Cálculo de la actividad catalítica de $\beta$ -glucosidasa

La actividad catalítica se determinó en base a la cantidad de enzima utilizada para reaccionar con p-NPG, el tiempo, y la cantidad de p-nitrofenol liberado en la reacción, utilizando la curva estándar del p-nitrofenol con la ecuación de regresión encontrada previamente (Anexo 11). Con lo obtenido se calculó la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Act. catalítica (U/mL)} = \frac{\text{pNOH } (\mu\text{mol/mL}) \times \text{Vol. reacción } (\mu\text{L}) \times \text{Dilución de la enzima}}{\text{Vol. solución enzimática } (\mu\text{L}) \times \text{Tiempo de reacción (min)}}$$

En donde una unidad de actividad  $\beta$ -glucosidasa (U), se definió como la cantidad de enzima que producía 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo establecido.

### **2.3.3.3. Determinación de proteínas totales**

Se utilizó el método de Bradford (1976), en el cual se mezcló 20  $\mu$ L de la muestra con 200  $\mu$ L del reactivo Bradford de la marca Sigma-Aldrich. Posteriormente, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante un periodo de 5 minutos, seguido de la lectura de absorbancia a 595 nm. Para establecer un control o blanco de muestra, se repitió el mismo procedimiento utilizando 20  $\mu$ L de agua destilada en lugar de la muestra enzimática, lo que permitió medir la absorbancia en ausencia de la enzima. Para determinar la concentración de proteínas se tuvo que hacer una curva de calibración diferentes concentraciones de BSA (albúmina de suero bovino), lo que permitió la obtención de una ecuación de regresión lineal a partir de dicha curva ( $y = ax + b$ ), donde “y” es el valor de la absorbancia y “x” es la cantidad de proteína (mg/mL) de la muestra (Anexo 13).

### **2.3.3.4. Cálculo de la actividad específica de $\beta$ -glucosidasa**

Se determinó al dividir la actividad catalítica de la  $\beta$ -glucosidasa (U/mL), entre la cantidad de proteína total (mg/mL) presente en la dilución de la enzima que se usa en la reacción.

$$\text{Act. Específica (U/mg)} = \frac{\text{Actividad catalítica (UI/mL)}}{\text{Concentración proteína (mg/mL)}}$$

### 2.3.3.5. Cálculo de la actividad relativa de $\beta$ -glucosidasa

La actividad relativa se expresó como un porcentaje de la actividad enzimática en una condición experimental respecto a la condición de referencia o grupo de control.

$$\text{Actividad Relativa (\%)} = \frac{\text{Actividad Enzimática Experimental}}{\text{Actividad Enzimática de Referencial}} \times 100$$

### 2.3.3.6. Cálculo de la actividad residual de $\beta$ -glucosidasa

La actividad residual se calculó como el porcentaje de actividad enzimática restante después de aplicar el tratamiento térmico (actividad enzimática final), respecto a la actividad enzimática sin tratamiento (actividad enzimática inicial).

$$\text{Actividad Residual (\%)} = \frac{\text{Actividad Enzimática Final}}{\text{Actividad Enzimática Inicial}} \times 100$$

### 2.3.3.7. Cálculo del incremento relativo de glucosa

Para calcular el incremento relativo de la producción de glucosa, entre el tratamiento 1 (Control), y el tratamiento 2 (Experimental), en la sacarificación del bagazo de caña, se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Incremento Relativo (\%)} = \frac{(\text{Glucosa en el T2} - \text{Glucosa en el T1})}{\text{Glucosa en el T1}} \times 100$$

### 2.3.3.8. Determinación de glucosa

Se utilizó el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD-POD), que consistió en tres mezclas de reacción, B (Blanco) y M (Muestra), como se detalla en la siguiente Tabla:

**Tabla 5***Ensayo para determinación de glucosa*

<b>Reactivos</b>	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
Estándar	-	10 $\mu$ L	-
Muestra	-	-	10 $\mu$ L
Reactivo A	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

Completadas las mezclas, se incubó en Baño María por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se leyó en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero con la mezcla del blanco. Finalmente, el cálculo de la cantidad de glucosa se hizo con las absorbancias y una ecuación lineal obtenida a partir de una curva de calibración con soluciones de glucosa a diferentes concentraciones (Anexo 12).

#### **2.3.3.9. Electroforesis y Zimograma en gel de poliacrilamida**

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la  $\beta$ -glucosidasa, se realizó siguiendo el procedimiento establecido por Laemmli, (1970), y modificado por Yan et al. (2016). Para lo cual utilizando SDS al 0,1%, se preparó un gel separador al 12% (pH 8,8), y gel de apilamiento al 4% (pH 6,8). Una vez preparado los geles, la fracción de la  $\beta$ -glucosidasa precipitada con sulfato de amonio, y la fracción del lavado posterior, se procesaron del siguiente modo:

Se prepararon las muestras proteicas concentradas, con una cantidad de 1 mg/mL de proteínas totales, luego de haberles añadido buffer de muestra. Estas mezclas se calentaron en un baño de agua a 100°C durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización de las proteínas. Seguidamente, se colocó un volumen total de 10 µL de la muestra desnaturalizada en cada carril del gel de poliacrilamida al 4%, y en carriles separados se cargó el marcador de peso molecular.

Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis a una temperatura de 4°C, una tensión de 100 V y una corriente de 50 mA durante un período de 2 horas. Terminada la corrida electroforética se cortó el gel de resolución al 12%, y se hizo la tinción con Azul Brillante de Coomassie durante 1 hora con agitación (80 rpm) y se decoloró dos veces en una solución de metanol y ácido acético. Como resultado, se obtuvieron bandas coloreadas correspondientes a las proteínas de interés y al marcador de peso molecular. La estimación del peso molecular aproximado de las proteínas se realizó mediante la observación de las bandas presentes en el gel, y comparando las posiciones de las bandas generadas por la muestra con las del marcador molecular, mediante el uso del programa Vision Capt versión 16.08.

Para el Zimograma, se realizaron los mismos procedimientos que en el SDS-PAGE, solo que se omitieron las partes de desnaturalización en agua hirviendo, y la tinción con azul brillante de Coomassie. Sin embargo, terminada la electroforesis, el gel se incubó con una solución de p-NPG a una concentración de 20 mM, en tampón acetato 100 mM a pH 5,0 a 50°C durante

10 minutos. Seguidamente, se observó una banda de color amarillo, la cual sería indicador de actividad enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa en dicha posición del gel, así como su peso molecular aproximado.

#### **2.3.3.10. Determinación de temperatura óptima sobre la actividad $\beta$ -glucosidasa**

La temperatura óptima para la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, se determinó llevando a cabo el ensayo estándar descrito previamente en la sección 2.3.3.1. Y se midió la actividad a varias temperaturas entre 40 y 90 °C, con un incremento gradual de 10°C por ensayo. Así mismo, los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **2.3.3.11. Determinación de pH óptimo sobre la actividad $\beta$ -glucosidasa**

El pH óptimo se determinó utilizando el mismo procedimiento estándar empleado para medir actividad y determinar la temperatura óptima que se describió anteriormente. Además, la variación del pH de la reacción se dio en el rango de entre 3 a 10, y los tampones utilizados se prepararon a una concentración de 50 mM, e incluyeron: Glicina HCl (pH 3,0), Acetato de sodio (pH 4,0 y pH 5,0), Fosfato de sodio (pH 6,0 y pH 7,0), Tris HCl (pH 8,0), y Glicina NaOH (pH 9,0 y pH 10,0).

### **2.3.3.12. Determinación de la Termoestabilidad de $\beta$ -glucosidasa**

Se realizó el procedimiento según Bonfá et al, (2018), donde se incubó la enzima a las temperaturas de 50 y 60°C, se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L a las 6, 12, 24, 48, 96, 112 horas. Posteriormente, la actividad residual se determinó utilizando la enzima en su pH y temperatura óptima. Y se utilizó la enzima sin incubación como control, que representó el 100% de la actividad original.

### **2.3.3.13. Parámetros cinéticos de $\beta$ -glucosidasa**

Se utilizó el ensayo estándar para determinar actividad de  $\beta$ -glucosidasa en condiciones optimizadas de pH y temperatura. Además, se determinó la velocidad inicial para concentraciones de sustrato (p-NPG) de entre 2 a 30 mM, con lo que se realizó la curva de velocidad enzimática vs concentración de sustrato.

La constante de Michaelis ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) se calcularon basándose en la ecuación de Michaelis-Menten, y se realizó un ajuste no lineal de la curva de velocidad enzimática vs concentración de sustrato generada anteriormente, utilizando el programa Origin v.8.5 (Liu et al., 2023).

#### **2.3.3.14. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad $\beta$ -glucosidasa**

Se utilizaron diferentes iones metálicos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , en una concentración de 1, 5, y 10 mM. La enzima se preincubó con cada ión metálico durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se añadió el sustrato (p-NPG) para iniciar la reacción enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa, ya mencionada anteriormente. Así mismo, se hizo un control sin la adición de ningún ion metálico, que se expresó como el 100% de la actividad enzimática, a partir del cual se determinó la actividad relativa, y se determinó el tipo de interacción de la enzima con el ion metálico (Zhao et al., 2013).

#### **2.3.3.15. Efecto de la glucosa y etanol sobre la actividad $\beta$ -glucosidasa**

Se utilizó el método descrito por Ariaeenejad et al. (2020), que consistió primero en preparar mezclas para determinar actividad de la  $\beta$ -glucosidasa como se describe en la sección 2.3.3.1, con la diferencia de que no se agregó sustrato (p-NPG). A estas mezclas de reacción se les adicionó glucosa para llegar a una concentración final de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mM, y luego se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió el sustrato (p-NPG) y se determinó la actividad  $\beta$ -glucosidasa, y al mismo tiempo, se hizo lo mismo con el grupo control en ausencia de glucosa, que se consideró como referente del 100% de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, y que sirvió para el Cálculo de la actividad relativa. Finalmente se determinó el efecto de la glucosa, al comparar la actividad

relativa de la  $\beta$ -glucosidasa en las diferentes concentraciones de glucosa. Asimismo, se empleó la misma metodología para determinar el efecto del etanol en concentraciones del 15, 20, 25, 30, 35 y 40% (v/v).

#### **2.3.4 Evaluación del efecto de la $\beta$ -glucosidasa en la hidrólisis de celulosa**

Según la metodología empleada por Sun et al. (2022), se utilizó bagazo de caña como fuente de biomasa lignocelulósica, para evaluar el rendimiento de la  $\beta$ -glucosidasa purificada junto a una celulasa comercial, en la degradación de celulosa. Cabe añadir que, aunque la celulosa no es el sustrato donde actúa directamente la  $\beta$ -glucosidasa, sí lo es la celobiosa, la cual es uno de los productos formados durante la hidrólisis de celulosa, por lo que la  $\beta$ -glucosidasa actúa de manera sinérgica con otras celulasas para degradar la celulosa, formando parte de este proceso.

Como primer paso se pretrató 100 g de biomasa lignocelulósica, con NaOH al 1% (p/v) a 121 °C durante 30 min en autoclave. Posteriormente se hizo lavados con agua destilada desionizada, hasta que el pH de la biomasa tuviese un valor aproximado al neutro, y se dejó secar en un horno esterilizador a 40°C por 48 horas, para luego pulverizarlo con un molino eléctrico.

En la parte experimental, se usó 1mL de tampón acetato 100 mM (pH 5,0) a una concentración del 2% (p/v) de la biomasa pretratada (20 mg). Asimismo, los componentes enzimáticos correspondientes fueron la celulasa

comercial (Celluclast® 1.5), y la  $\beta$ -glucosidasa de este trabajo (Anexo 10), que se agregaron en diferentes cantidades que se detallan en la Tabla 6. Para la celulasa comercial, una Unidad de Papel Filtro (FPU) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto a partir de un sustrato de celulosa. Y en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa purificada, una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria que producirá 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto (Sun et al., 2022).

**Tabla 6**

*Combinación con  $\beta$ -glucosidasa en la degradación de celulosa*

<b>Combinación de enzimas</b>	<b>Cantidad de enzima por gramo de biomasa seca</b>
Celulasa comercial (grupo control)	5 FPU
Celulasa comercial + $\beta$ -glucosidasa purificada	5 FPU + 12 U

Posteriormente, se incubó a 50 °C en 120 rpm durante 24 horas en un agitador orbital. Y se tomó 3 muestras de ambos grupos en los siguientes tiempos: 2, 4, 8, 12, 16, y 24 horas. Deteniendo la reacción en agua hirviendo por 5 minutos, y después se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, seguidamente el sobrenadante se utilizó para medir la cantidad glucosa liberada, utilizando el método de GOD-POD descrito en la sección 2.3.3.8. Cabe añadir, que todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Producción de $\beta$ -glucosidasa

La producción enzimática fue evaluada diariamente por 22 días. En la Tabla 7 se presenta los valores de medias obtenidos de la producción de  $\beta$ -glucosidasa por día, expresándose la actividad enzimática en (U/mL).

**Tabla 7**

*Producción de  $\beta$ -glucosidasa*

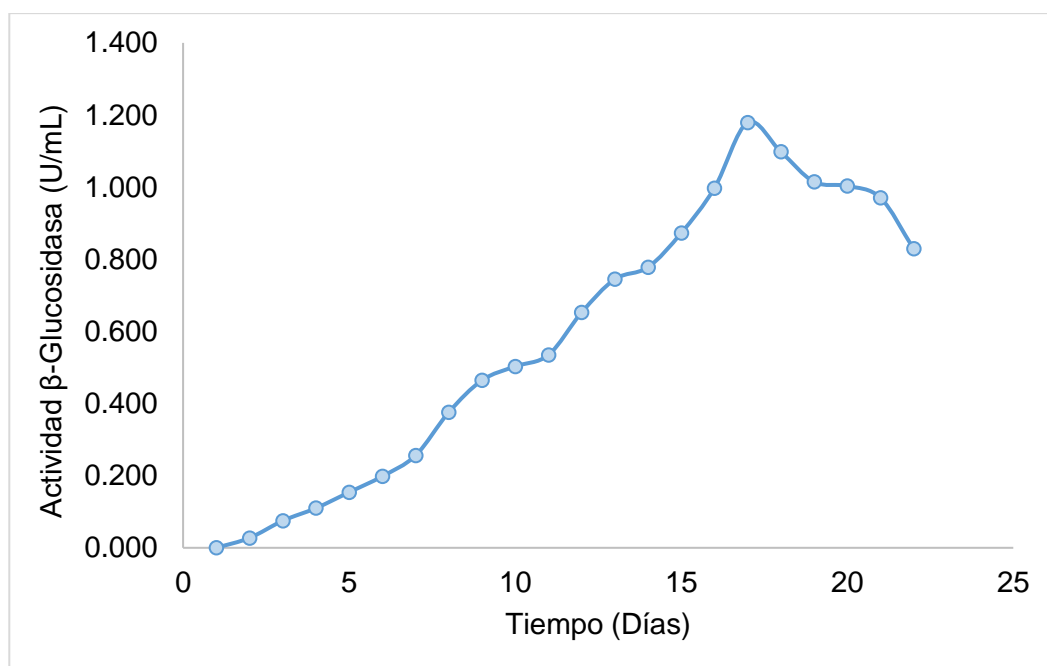
Días	N	Actividad (U/mL)	Proteínas Totales (mg/mL)	Error Estándar	Coefficiente de Variación
2	3	0,027	0,000	0,001	0,092
3	3	0,075	0,000	0,003	0,067
4	3	0,110	0,000	0,001	0,018
5	3	0,154	0,004	0,003	0,034
6	3	0,198	0,014	0,001	0,010
7	3	0,256	0,017	0,002	0,010
8	3	0,376	0,026	0,006	0,026
9	3	0,464	0,037	0,001	0,005
10	3	0,503	0,050	0,001	0,002
11	3	0,535	0,082	0,002	0,006
12	3	0,652	0,106	0,001	0,002
13	3	0,745	0,118	0,003	0,006
14	3	0,778	0,115	0,001	0,003
15	3	0,873	0,113	0,014	0,028
16	3	0,997	0,117	0,002	0,004
17	3	1,179	0,118	0,011	0,017
18	3	1,098	0,118	0,004	0,007
19	3	1,015	0,115	0,001	0,002
20	3	1,003	0,113	0,004	0,006
21	3	0,970	0,117	0,003	0,006
22	3	0,829	0,116	0,003	0,006

*Nota.* N: número de réplicas

En la Figura 5, se aprecia como en el día 17 la  $\beta$ -glucosidasa llegó a su máximo de actividad (1,179 U/mL), y posteriormente los valores fueron disminuyendo hasta el día 22 (0,829 U/mL). Esto permitió determinar el día de corte del cultivo, para así obtener un extracto crudo con la mayor cantidad de enzima posible.

**Figura 5**

*Curva de producción de  $\beta$ -glucosidasa*



En la Tabla 8 , se muestran los valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa y proteínas totales correspondientes al extracto crudo obtenido en el día máximo de producción, y se hizo el cálculo para determinar la actividad específica de la enzima, como se detalla en la sección y 2.3.3.4.

**Tabla 8***Actividad catalítica y específica de  $\beta$ -glucosidasa en el extracto crudo*

<b>Proteínas Totales (mg/mL)</b>	<b>Actividad Catalítica (U/mL)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg)</b>
0,118	1,179	10,014

**3.2 Purificación de  $\beta$ -glucosidasa**

Una vez obtenido el extracto crudo del medio líquido de producción de  $\beta$ -glucosidasa como se detalla en la sección 2.3.1.3. Se hizo la purificación con sulfato de amonio en concentraciones del 10 al 90%, obteniéndose diferentes actividades de la enzima para cada fracción (Tabla 9). Asimismo, se midió la actividad del sobrenadante de cada fracción precipitada con sulfato de amonio (Tabla 10). Se obtuvo que la concentración del 50% con sulfato de amonio, fue en donde se empezó a registrar la mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa en el pellet (5,192 U/mL), y una caída drástica en el sobrenadante de dicho precipitado (1,220 U/mL). También, la concentración al 60%, produjo un incremento de hasta 5,514 U/mL de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en pellet, y en el sobrenadante se redujo hasta 0,176 U/mL. Además, en concentraciones superiores la actividad  $\beta$ -glucosidasa fue disminuyendo. Esto permitió concluir que tanto la concentración del 50 y 60% precipitaban la  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, por fines prácticos, se escogió la concentración del 50% para este trabajo, ya que se quería evitar la coprecipitación de otras proteínas, así como el empleo de mucha cantidad de sulfato de amonio.

**Tabla 9***Actividad  $\beta$ -glucosidasa en pellets obtenidos con sulfato de amonio*

<b>Sulfato de Amonio</b>	<b>N</b>	<b>Media (U/ml)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
10%	3	0,000	0,000	0,000
20%	3	0,000	0,000	0,000
30%	3	0,052	0,015	0,486
40%	3	0,344	0,051	0,255
50%	3	5,192	0,039	0,013
60%	3	5,514	0,076	0,024
70%	3	4,039	0,077	0,033
80%	3	0,000	0,000	0,000
90%	3	0,000	0,000	0,000

*Nota.* N: número de réplicas**Tabla 10***Actividad  $\beta$ -glucosidasa en sobrenadantes de pellets*

<b>Sulfato de Amonio</b>	<b>N</b>	<b>Media (U/ml)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
10%	3	6,682	0,053	0,014
20%	3	6,390	0,051	0,014
30%	3	5,893	0,039	0,011
40%	3	5,426	0,076	0,024
50%	3	1,220	0,051	0,072
60%	3	0,176	0,001	0,005
70%	3	0,117	0,003	0,049
80%	3	0,142	0,001	0,009
90%	3	0,015	0,002	0,174

*Nota.* N: número de réplicas

**Tabla 11***Etapas de la purificación de  $\beta$ -glucosidasa*

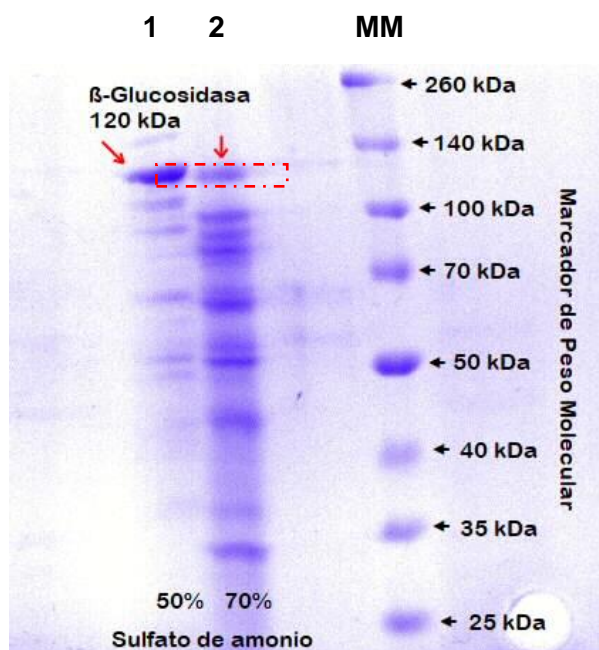
<b>Pasos de Purificación</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Unidades Totales (U)</b>	<b>Proteínas Totales (mg/ml)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>Factor de Purificación</b>
Extracto Crudo	80,8	46,490	0,210	2,742	100	1
Sulfato de Amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2	21,719	3,780	3,024	46,72	1,10
Amicon® ultra-4 10 K	1,87	17,647	3,286	2,872	37,96	1,05

En la Tabla 11, se muestran las etapas de purificación de la  $\beta$ -glucosidasa, así como el porcentaje de enzima recuperado con sulfato de amonio respecto al total que había en el extracto crudo, que fue de un 46,72%. En la última fase de eliminación del sulfato de amonio por ultrafiltración con dispositivos Amicon, la recuperación respecto al extracto crudo disminuyó a un 37,96%.

### **3.3 Caracterización de la $\beta$ -glucosidasa**

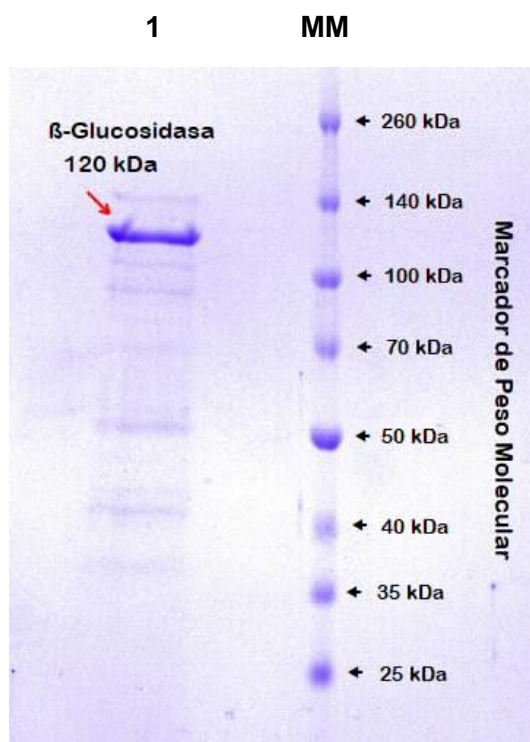
#### ***3.3.1 Análisis de electroforesis en gel SDS-PAGE y Zimograma***

Para determinar el peso molecular de la  $\beta$ -glucosidasa, así como su grado de pureza en los precipitados con sulfato de amonio del 50% y 70%, se analizaron las bandas generadas mediante electroforesis (Figura 6). Donde se determinó un peso molecular de 120 kDa, en dos carriles, correspondientes a las dos fracciones de la enzima precipitada con sulfato de amonio. Observándose un mayor número de bandas en la fracción precipitada al 70% en comparación con la fracción precipitada al 50%, pudiéndose atribuir la presencia de más bandas, a la precipitación de otras proteínas a parte de la  $\beta$ -glucosidasa. Por otro lado, en el carril del precipitado al 50%, pese a no tener tantas bandas proteicas como la fracción precipitada del 70%, se pudo apreciar una mayor intensidad de la banda que corresponde a la  $\beta$ -glucosidasa, así como una menor proporción de bandas adicionales de otras proteínas. Lo cual es un indicador del mayor grado de pureza en una precipitación al 50%.

**Figura 6***Electroforesis de fracciones de  $\beta$ -glucosidasa*

*Nota.* Carril MM: marcador molecular de proteínas; Carril 1: Fracción precipitada con sulfato de amonio al 50%; Carril 2: Fracción precipitada con sulfato de amonio al 70%.

En la Figura 7, se puede observar en un solo carril la banda correspondiente a la  $\beta$ -glucosidasa ultrafiltrada, de una forma más definida y con menos ruido en general. Lo cual fue un buen indicador, de que el proceso de eliminación de sulfato de amonio con dispositivos Amicon, tuvo el efecto esperado al reducir las bandas difusas.

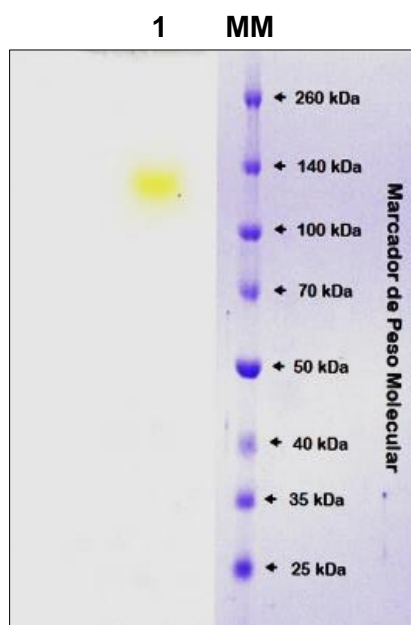
**Figura 7***Electroforesis de  $\beta$ -glucosidasa ultrafiltrada*

*Nota.* Carril MM: marcador molecular de proteínas; Carril 1: Fracción de  $\beta$ -glucosidasa precipitada con sulfato de amonio al 50% luego de ultrafiltración con dispositivo Amicon.

Adicionalmente en la Figura 8 , se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (NATIVE-PAGE) para analizar la actividad  $\beta$ -glucosidasa del precipitado con sulfato de amonio al 50%. El zimograma resultante permitió visualizar la actividad enzimática mediante la aparición de una banda de color amarillo, correspondiente a la hidrólisis del p-NPG, lo cual confirmó la actividad  $\beta$ -glucosidasa en dicha muestra.

**Figura 8**

*Análisis de Zimograma de  $\beta$ -glucosidasa*



*Nota.* Carril MM: marcador molecular de proteínas; Carril 1: Actividad  $\beta$ -glucosidasa en la fracción precipitada con sulfato de amonio al 50%.

### **3.3.2 Determinación del pH óptimo de $\beta$ -glucosidasa**

La actividad enzimática se evaluó a diferentes valores de pH, y los resultados se resumen en la Tabla 12. La enzima mostró actividad en un rango de pH de 4 a 9, y la actividad enzimática aumentó considerablemente desde pH 4 hasta alcanzar su máximo de actividad a pH 5, seguido de una disminución progresiva a medida que el pH continuó aumentando. A pH 3 y 10, no se detectó actividad enzimática, indicando que estos valores extremos de pH no son favorables para la actividad de la enzima. Asimismo, a pH 9 la actividad enzimática fue significativamente menor en comparación con los pH

más bajos, sugiriendo una pérdida considerable de actividad enzimática en condiciones alcalinas.

**Tabla 12**

*Efecto del pH sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa*

<b>pH</b>	<b>N</b>	<b>Media (U/ml)</b>	<b>Actividad Relativa (%)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Coficiente de Variación</b>
3	3	0,000	0,000	0,000	0,000
4	3	2,474	34,476	0,007	0,005
5	3	6,514	100,000	0,009	0,002
6	3	5,916	93,640	0,012	0,003
7	3	4,129	62,788	0,011	0,005
8	3	1,369	17,585	0,002	0,003
9	3	0,572	5,389	0,011	0,033
10	3	0,000	0,000	0,000	0,000

*Nota.* N: número de réplicas

También, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para la actividad enzimática (Anexo 14), comparando las medias de los tratamientos para los 8 niveles de pH evaluados. Donde el valor P de la prueba F fue menor a 0,05, lo que indicó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la actividad  $\beta$ -glucosidasa (U/mL) para los diferentes niveles de pH, con un nivel de confianza del 95,0%.

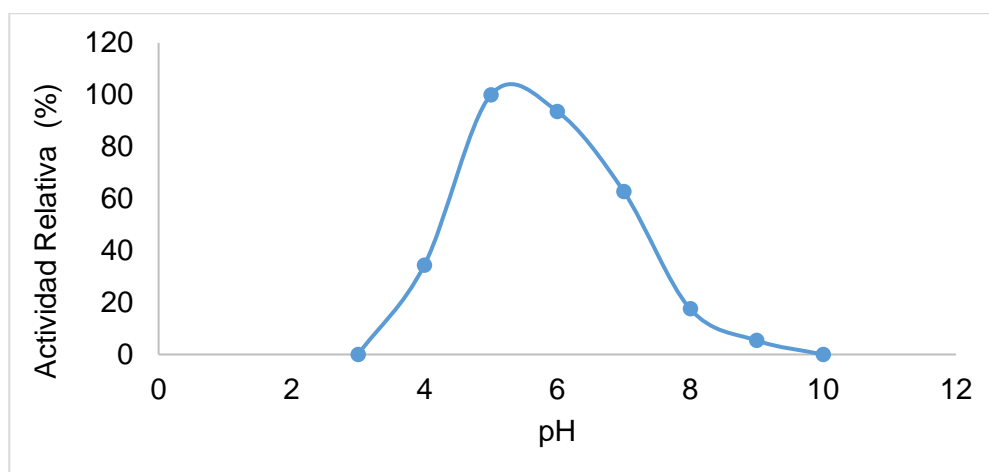
Además, se hicieron comparaciones múltiples de las medias de cada tratamiento mediante la prueba de Tukey (Anexo 15), utilizada para identificar cuáles medias son significativamente diferentes entre sí. De esa forma, se

identificaron 7 grupos homogéneos según la alineación de las "X's" en columnas, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de "X's". De esta forma, no se encontraron diferencias significativas entre los pHs 3 y 10, ya que en ambos se registró una ausencia total de actividad  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, el resto de pHs sí difirieron entre sí, obteniéndose el mayor valor de actividad en el pH 5, seguido del pH 6, 7, 4, 8, y 9.

La Figura 9 muestra la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa frente al cambio de pH. Se observa que la enzima presenta altos valores de actividad en un rango de pH de 4 a 7, alcanzando un máximo del 100% a pH 5. Por otro lado, la actividad disminuyó notablemente a partir de pH 7, siendo especialmente baja a pH 9 y siendo nula a pH 10 y 3. Es así, que la curva reflejó una alta actividad enzimática en condiciones ácidas y neutras, con una marcada reducción en condiciones alcalinas.

**Figura 9**

*Efecto del pH sobre la actividad relativa de  $\beta$ -glucosidasa*



### **3.3.3 Determinación de la temperatura óptima para $\beta$ -glucosidasa**

La Tabla 13 muestra los resultados del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa, evaluada a seis temperaturas diferentes (40, 50, 60, 70, 80 y 90°C) con tres réplicas cada una. A una temperatura de 40°C, se observó una actividad enzimática promedio, que aumentó a 50 y 60°C, pero que llegó a su máximo valor a 70°C (5,834 U/mL). Sin embargo, al aumentar la temperatura a 80°C, la actividad disminuyó, y se redujo aún más a 90°C. Estos resultados indicaron que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa aumenta con la temperatura hasta un máximo a 70°C, disminuyendo posteriormente debido a la desnaturalización térmica de la enzima.

**Tabla 13***Efecto de la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa*

<b>T(°C)</b>	<b>N</b>	<b>Media (U/mL)</b>	<b>Actividad Relativa (%)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
40	3	1,596	27,348	0,031	0,000
50	3	2,720	46,620	0,015	0,009
60	3	4,402	75,455	0,023	0,009
70	3	5,834	100,000	0,015	0,004
80	3	5,351	91,709	0,026	0,008
90	3	1,649	28,257	0,033	0,035

*Nota.* N: número de réplicas

También se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para la actividad enzimática (Anexo 16), comparando las medias de los tratamientos para los 6 niveles de temperatura evaluados. Donde el valor-P de la prueba F fue menor a 0,05, lo que indicó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la actividad  $\beta$ -glucosidasa (U/mL), para los diferentes niveles de temperatura con un nivel de confianza del 95,0%.

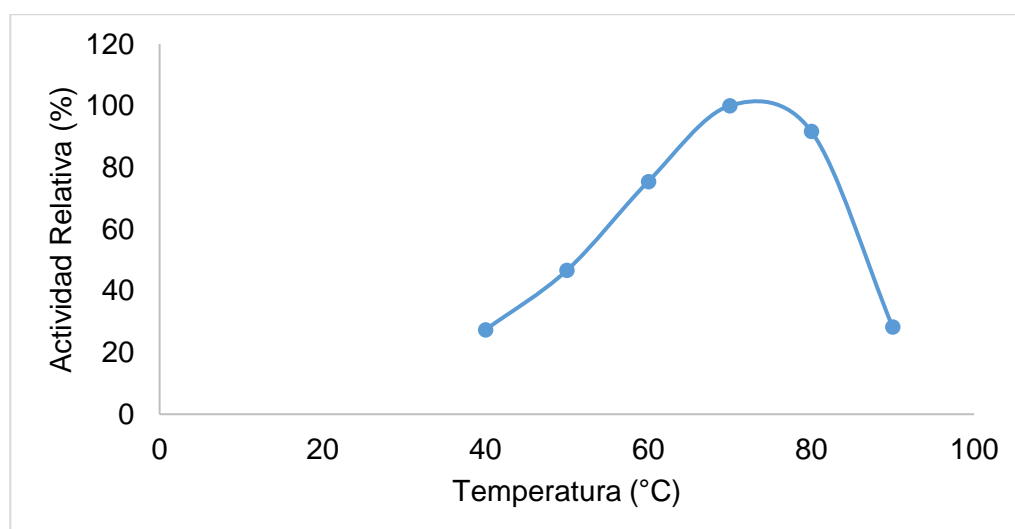
Adicionalmente, se presenta los resultados de las comparaciones múltiples de las medias de cada tratamiento mediante la prueba de Tukey, (Anexo 17) utilizada para identificar cuáles medias son significativamente diferentes entre sí. De esa forma, se identificaron 5 grupos homogéneos según la alineación de las "X's" en columnas, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de "X's". Asimismo, no se encontraron diferencias

significativas entre las temperaturas 40 y 90°C. Sin embargo, en el resto de temperaturas sí hubo una diferencia estadísticamente significativa, obteniéndose el mayor valor de actividad  $\beta$ -glucosidasa en la temperatura de 70°C, siguiéndole las temperaturas de 80, 60, y 50°C.

La Figura 10 muestra la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa en función a 6 valores de temperatura. Y se observa un incremento en la actividad desde 40°C, con un valor de 27%, a 50°C con un 47%, a 60°C un 75% hasta alcanzar un máximo de 100% a 70°C. Posteriormente, la actividad disminuye hasta un 92% a 80°C, y cae significativamente a un 28% en 90°C. Este comportamiento sugirió que la temperatura óptima para la actividad  $\beta$ -glucosidasa fue de 70°C.

### Figura 10

*Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de  $\beta$ -glucosidasa*



### 3.3.4 Determinación de la termoestabilidad de $\beta$ -glucosidasa

La Tabla 14 detalla los resultados de la termoestabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa, que se evaluaron a 40, 50, 60 y 70°C, en intervalos de tiempo de hasta 300 minutos. A 40, 50, y 60°C la actividad residual de la enzima se mantuvo por encima del 90% después de 300 minutos. En cambio, tras incubarse a 70°C por 30 minutos, la actividad disminuyó hasta un 9%, sugiriendo una rápida desnaturalización de la enzima (Figura 11).

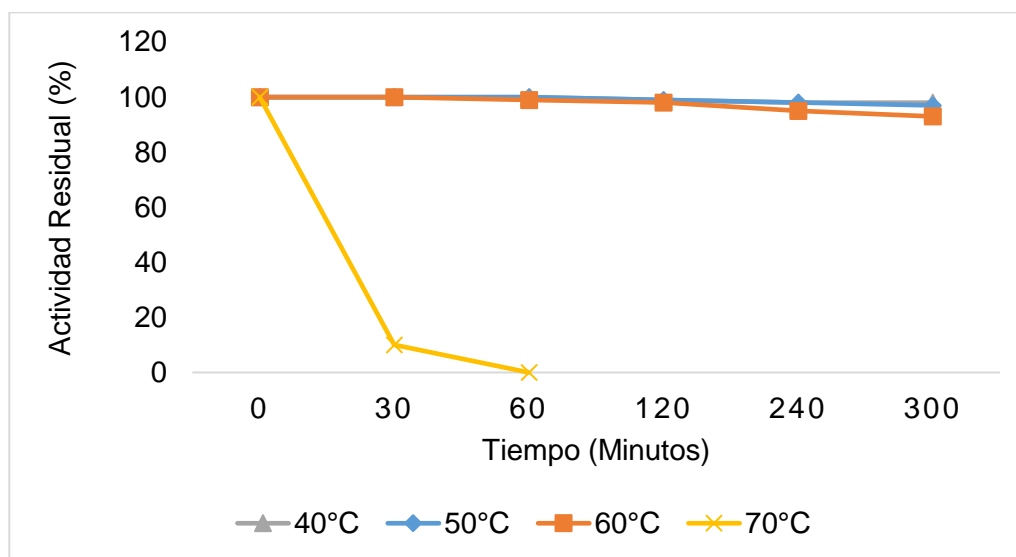
**Tabla 14**

*Termoestabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa en 300 minutos*

Tiempo (Minutos)	Temperatura (°C)	N	Actividad Residual (%)	Error Estándar	Coficiente de Variación
0	Control	3	100,000	0,134	0,002
30	40	3	99,504	0,152	0,003
	50	3	99,859	0,137	0,002
	60	3	99,814	0,068	0,012
	70	3	9,715	0,336	0,006
60	40	3	99,835	0,104	0,002
	50	3	99,984	0,687	0,012
	60	3	99,120	0,358	0,006
120	40	3	98,618	0,100	0,002
	50	3	98,999	0,969	0,017
	60	3	98,322	1,077	0,019
240	40	3	97,663	0,412	0,007
	50	3	98,334	0,439	0,008
	60	3	95,228	0,876	0,016
300	40	3	97,828	0,438	0,008
	50	3	96,607	0,253	0,005
	60	3	93,161	0,134	0,002

**Figura 11**

*Actividad Residual de la  $\beta$ -glucosidasa en 300 minutos*

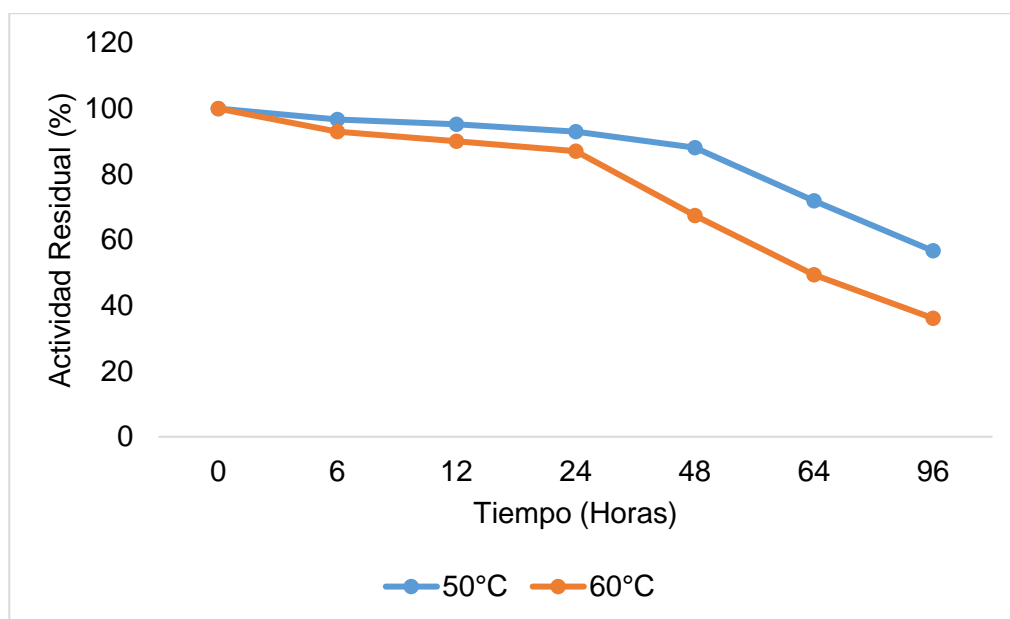


La Tabla 15 muestra los valores de actividad residual que se hicieron en una evaluación de termoestabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa a 50 y 60°C, durante un período de 96 horas. Los resultados destacan una disminución progresiva en la actividad residual con el tiempo, siendo más pronunciada a temperaturas más altas. A 50°C, la actividad residual se redujo del 97% en las 6 horas al 57% a las 96 horas. En contraste, a 60°C, la reducción fue más rápida, cayendo del 93% en las 6 horas a un 36% a las 96 horas. Estos resultados indicaron que la  $\beta$ -glucosidasa es altamente termoestable hasta 60°C, pero no es adecuada a temperaturas superiores, debido a la significativa pérdida de actividad (Figura 12).

**Tabla 15***Termoestabilidad a 50°C y 60°C de la  $\beta$ -glucosidasa en 96 horas*

<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>N</b>	<b>Actividad Residual (%)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
0	Control	3	100,000	0,191	0,003
6	50	3	96,651	0,201	0,004
	60	3	92,673	0,526	0,010
12	50	3	95,210	0,095	0,002
	60	3	89,577	0,130	0,003
24	50	3	92,689	0,225	0,004
	60	3	87,035	0,219	0,004
48	50	3	88,079	0,288	0,006
	60	3	67,406	0,272	0,007
64	50	3	71,908	0,531	0,013
	60	3	49,363	0,312	0,011
96	50	3	56,638	0,805	0,025
	60	3	36,109	0,288	0,014

*Nota.* N: número de réplicas

**Figura 12***Actividad Residual de  $\beta$ -glucosidasa en 96 horas*

### **3.3.5 Determinación del efecto de los iones metálicos en la actividad $\beta$ -glucosidasa**

En la Tabla 16 se muestra los efectos de diferentes iones metálicos en la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa a concentraciones de 1, 5, y 10 mM. Los resultados mostraron que el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , incrementaron la actividad enzimática a bajas concentraciones. Por ejemplo, a 1 mM, estos compuestos aumentaron la actividad entre un 126% a 150% en comparación con el control. Sin embargo, a concentraciones más altas (10 mM), la actividad disminuyó significativamente, con valores que oscilaron entre el 68% y el 97% (Figura 13).

Tabla 16

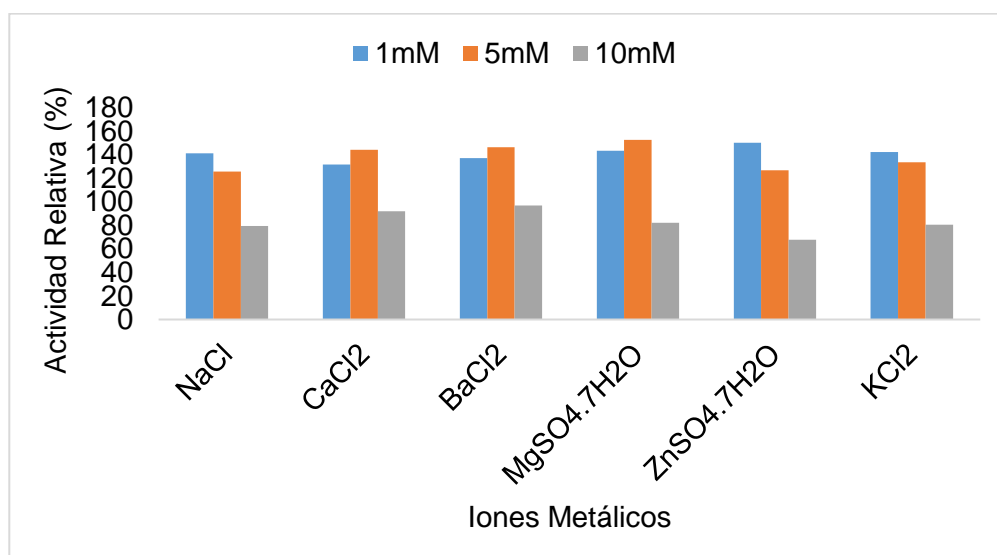
Efecto de los iones metálicos sobre la  $\beta$ -glucosidasa

Ion Metálico	Concentración (%)					
	1 mM		5 mM		10 mM	
	A.R	E.E	A.R	E.E	A.R	E.E
Control	100	0,32	100	0,37	100	0,12
NaCl	141	0,82	126	0,17	79	0,64
CaCl <sub>2</sub>	132	0,34	144	0,33	92	1,13
BaCl <sub>2</sub>	137	0,77	147	0,77	97	0,55
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	143	0,74	153	0,17	82	0,28
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	150	0,52	127	0,84	68	0,28
KCl <sub>2</sub>	142	0,31	134	0,59	81	0,45

Nota. A.R: Actividad relativa de  $\beta$ -glucosidasa (%), E.E: Error estándar

Figura 13

Efecto de los iones metálicos sobre la  $\beta$ -glucosidasa



### 3.3.6 Determinación del efecto de la glucosa en la actividad $\beta$ -glucosidasa

La Tabla 17, muestra los valores de actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa, y como disminuye a medida que aumenta la concentración de glucosa. En 1 mM de glucosa, la actividad relativa fue del 87%, mientras que a 10 mM cayó drásticamente al 44%. Esta tendencia continúa con una disminución gradual en la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa, a medida que la concentración de glucosa aumenta, alcanzando un mínimo del 6% a 100 mM (Figura 14).

**Tabla 17**

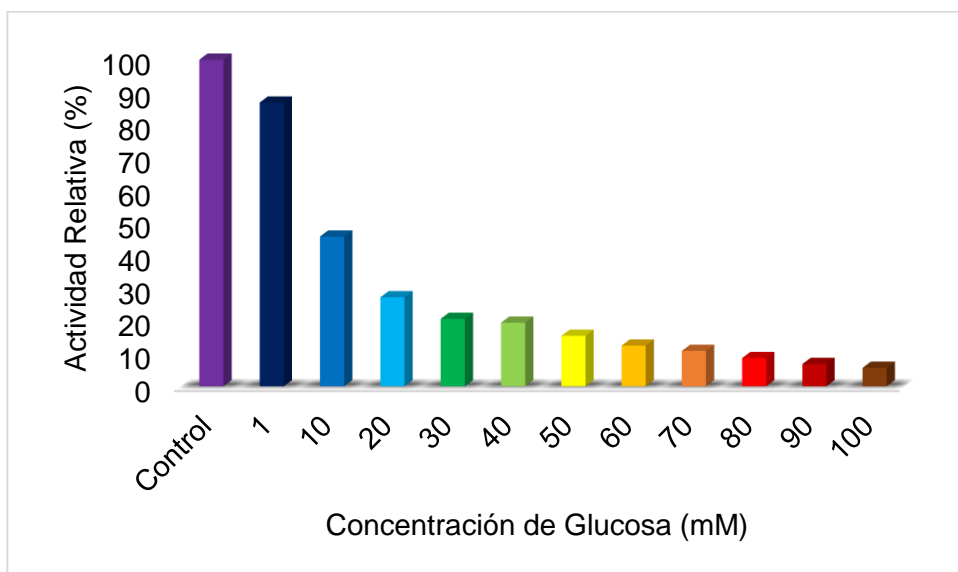
*Efecto de la glucosa en la actividad relativa de  $\beta$ -glucosidasa*

Glucosa (mM)	N	Actividad Relativa (%)	Error Estándar	Coefficiente de Variación
1	3	87	0,848	0,017
10	3	47	0,858	0,032
20	3	27	0,247	0,016
30	3	21	0,958	0,080
40	3	19	0,720	0,064
50	3	15	0,398	0,045
60	3	12	0,345	0,048
70	3	11	0,164	0,026
80	3	9	0,280	0,056
90	3	7	0,135	0,034
100	3	6	0,143	0,044
Control	3	100	0,521	0,009

*Nota.* N: número de réplicas

**Figura 14**

*Efecto de la glucosa en la actividad relativa de  $\beta$ -glucosidasa*

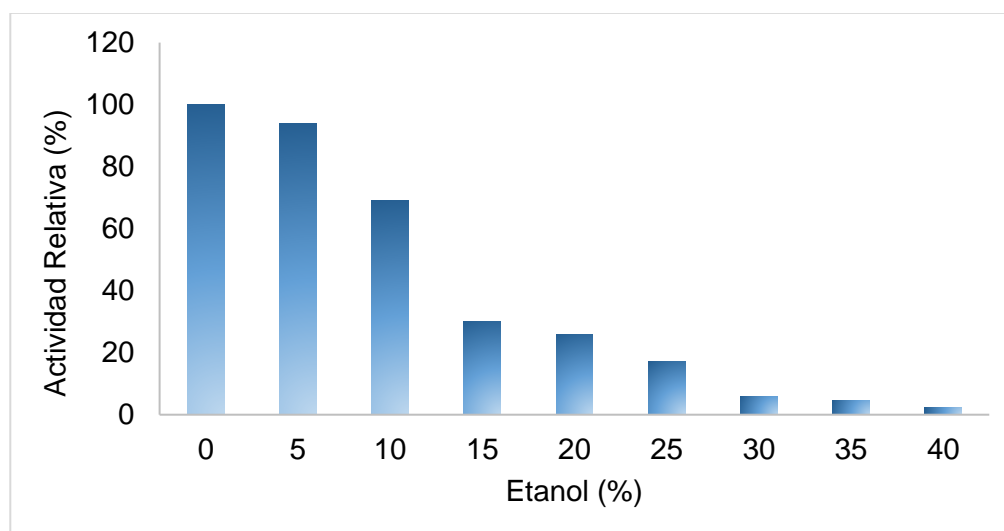


### **3.3.7 Determinación del efecto del etanol en la actividad $\beta$ -glucosidasa**

En la Tabla 18, se aprecian los valores de la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa, en diferentes concentraciones de etanol, y como se redujo progresivamente a medida que aumentó su concentración. Aunque, a un 5% de etanol, la actividad relativa fue del 94%, disminuyó notablemente hasta un 69% en un 10% de etanol. Esta tendencia decreciente se mantuvo, llegando al 30% y 26% de actividad relativa con 15% y 20% de etanol respectivamente. Finalmente, con una concentración de 40% de etanol, la actividad observada alcanzó su mínimo, siendo del 2%. Es así que estos resultados indicaron una inhibición considerable de la actividad enzimática en presencia de altos niveles de etanol (Figura 15).

**Tabla 18***Efecto del etanol sobre la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa*

Etanol (%)	N	Actividad Relativa (%)	Error Estándar	Coficiente de Variación
5	3	94	0,349	0,006
10	3	69	0,644	0,016
15	3	30	0,371	0,021
20	3	26	0,661	0,044
25	3	17	0,616	0,063
30	3	6	0,258	0,075
35	3	4	0,188	0,073
40	3	2	0,070	0,053
Control	3	100	0,047	0,001

*Nota.* N: número de réplicas**Figura 15***Efecto del etanol sobre la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa*

### 3.3.8 Determinación de los Parámetros Cinéticos $K_m$ y $V_{max}$ para la $\beta$ -glucosidasa

La Tabla 19, muestra los valores de la actividad específica de la  $\beta$ -glucosidasa, en diferentes concentraciones de p-NPG utilizado como sustrato. Observándose un incremento progresivo en la actividad específica desde 2 mM, hasta alcanzar un valor máximo de 1,62  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  en una concentración 16 mM. Lo cual sugiere que hay un punto máximo de saturación alcanzado por la  $\beta$ -glucosidasa, a partir del cual no se observa un aumento significativo en la actividad enzimática.

**Tabla 19**

*Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa*

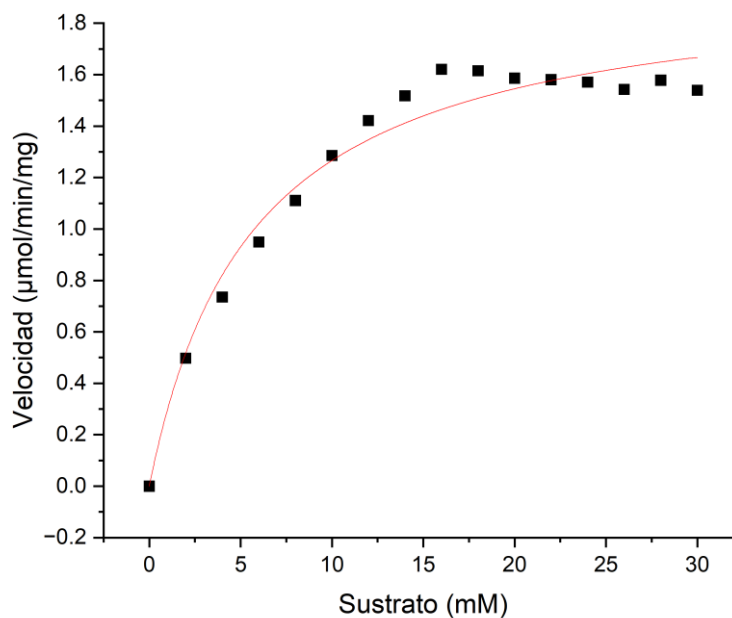
Sustrato (mM)	N	Actividad Específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Error Estándar	Coefficiente de Variación
0	3	0,00	0,000	0,000
2	3	0,50	0,002	0,005
4	3	0,73	0,017	0,040
6	3	0,95	0,009	0,017
8	3	1,11	0,002	0,004
10	3	1,29	0,012	0,016
12	3	1,42	0,015	0,018
14	3	1,52	0,008	0,009
16	3	1,62	0,027	0,028
18	3	1,62	0,025	0,027
20	3	1,59	0,005	0,006
22	3	1,58	0,016	0,017
24	3	1,57	0,009	0,010
26	3	1,54	0,014	0,016
28	3	1,58	0,007	0,008
30	3	1,54	0,009	0,011

*Nota.* N: número de réplicas

En la Tabla 20, se muestra como el modelo de Michaelis-Menten se ajusta a los datos, proporcionando una  $V_{\max}$  de 1,981 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) y un  $K_m$  de 5,646 mM. El R-Cuadrado ajustado de 0,971 indica un alto grado de ajuste del modelo a los datos experimentales. Estos resultados sugieren que la  $\beta$ -glucosidasa es altamente eficiente hasta una concentración de sustrato de aproximadamente 16 mM, después de lo cual no se observa un incremento significativo en la velocidad enzimática, indicando una saturación de la enzima a dicha concentración (Figura16).

### Figura 16

*Modelo no lineal ajustado del sustrato vs la velocidad de la  $\beta$ -glucosidasa*



**Tabla 20**

*Valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para la  $\beta$ -glucosidasa*

<b>Modelo</b>	<b>Michaelis y Menten</b>
Ecuación	$y = V_{max} * x / (K_m + x)$
$V_{max}$	$1,98094 \pm 0,08049$
$K_m$	$5,64585 \pm 0,82351$
R-Cuadrado Ajustado	0,97123

### **3.4 Evaluación del efecto de la $\beta$ -glucosidasa en la hidrólisis de celulosa**

La Tabla 21 muestra los valores de glucosa producidos por la acción de dos tratamientos en la degradación de bagazo de caña como fuente de celulosa, en diferentes intervalos de tiempo, el primero con solo una celulasa comercial ( $T_1$ ), y el segundo con la celulasa más la  $\beta$ -glucosidasa que se caracterizó en este trabajo ( $T_2$ ). A las 2 horas,  $T_2$  mostró una mayor eficacia inicial que  $T_1$  en la producción de glucosa. Esta tendencia se mantuvo a las 4 y 8 horas, con  $T_2$  produciendo significativamente más glucosa que  $T_1$ . A medida que avanza el tiempo, ambos tratamientos incrementan la producción de glucosa, alcanzando su máximo a las 24 horas, donde  $T_2$  sigue superando a  $T_1$  (Figura 17). Estos resultados indicaron que  $T_2$  es consistentemente más eficiente en la producción de glucosa que  $T_1$  en todos los puntos temporales. Aunque, la diferencia en la producción es más notoria en las primeras horas, destacando la eficacia de la combinación de celulasa y  $\beta$ -glucosidasa en la degradación del bagazo de caña pretratado.

**Tabla 21**

*Producción de glucosa en los tratamientos empleados para la degradación del bagazo de caña*

Horas	Trat.	N	Media de Glucosa (mg/dL)	Incremento Relativo (%)	Error Estándar	Coficiente de Variación
2	T1	3	174,202	19,066	1,802	0,018
	T2	3	207,417		1,860	0,016
4	T1	3	273,250	65,294	8,248	0,052
	T2	3	451,667		7,265	0,028
8	T1	3	328,012	56,803	6,299	0,033
	T2	3	514,333		12,333	0,042
16	T1	3	753,095	14,018	10,378	0,024
	T2	3	858,667		10,651	0,021
24	T1	3	872,143	6,279	6,299	0,013
	T2	3	926,905		4,124	0,008

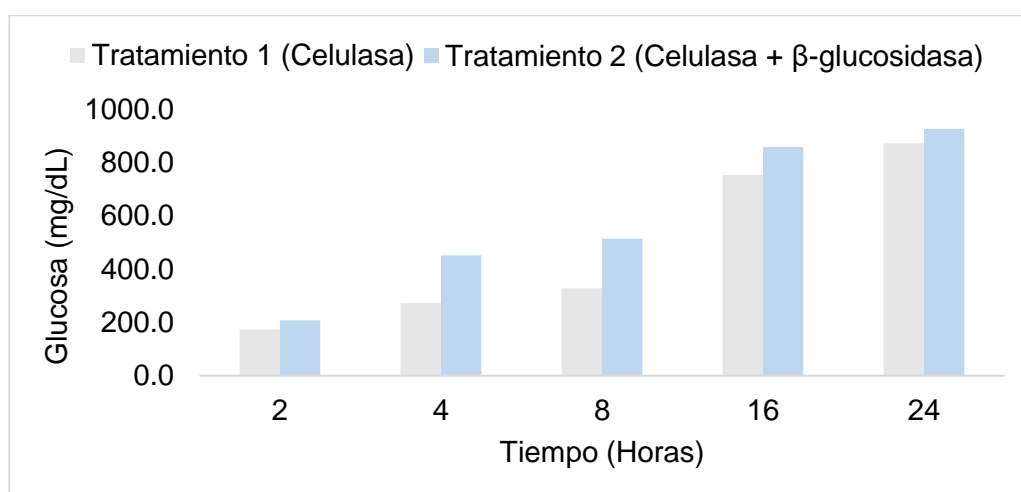
*Nota.* N: número de réplicas; Trat.: Tratamientos

En la Figura 18 se muestra el incremento relativo en la concentración de glucosa por parte del T<sub>2</sub> respecto al T<sub>1</sub>, en cada punto de tiempo. A las 2 horas, T<sub>2</sub> mostró un incremento relativo del 19% en la producción de glucosa en comparación con T<sub>1</sub>, indicando un efecto inicial positivo del tratamiento adicional. Esta tendencia se mantuvo y se amplió en los tiempos siguientes, alcanzando incrementos del 65% y 57% a las 4 y 8 horas, sin embargo, hubo una disminución considerable del 14% y 6% a las 16 y 24 horas

respectivamente. Dicha disminución del incremento relativo en las últimas horas, podría indicar una posible saturación de la enzima, o una limitación en los factores que influyen en la eficiencia del tratamiento.

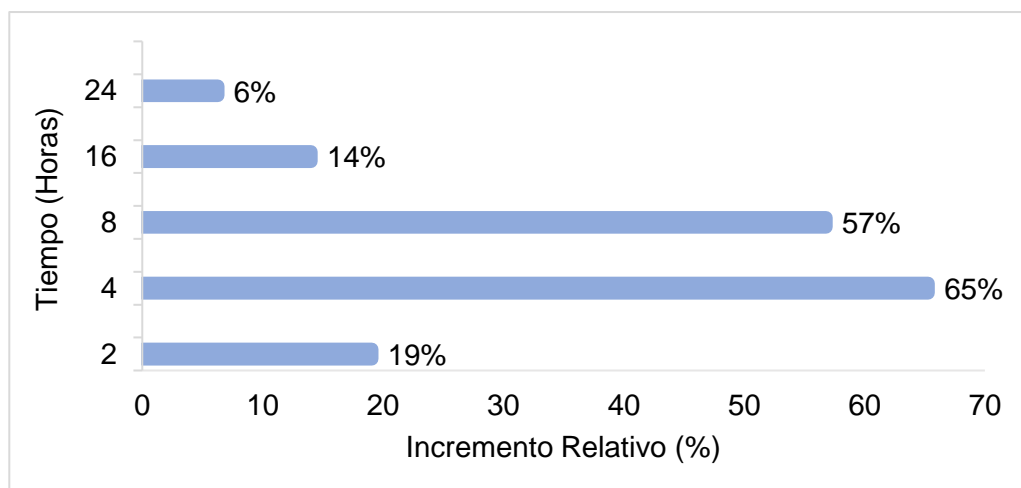
**Figura 17**

*Producción de glucosa por los tratamientos en diferentes tiempos*



**Figura 18**

*Incremento relativo del  $T_2$  en la producción de glucosa*



Se hizo un ANOVA mixto de factores intersujetos, (Anexo 18). Donde la variable tratamiento muestra una significancia muy alta ( $p < 0.05$ ), lo que indicó que existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos. El eta parcial al cuadrado de 0,997, indicó un efecto muy grande del tratamiento en la producción de glucosa, lo que significa que el 99,7% de la variabilidad en la producción de glucosa se puede atribuir al tratamiento. Además, la potencia observada de 1, indicó una muy alta probabilidad de detectar si es que existe un efecto del tratamiento en la liberación de glucosa. Todo esto permitió concluir de manera global, hay una diferencia estadísticamente significativa en la producción de glucosa entre el T<sub>1</sub> (control) y T<sub>2</sub> (experimental).

Adicionalmente, se hizo un ANOVA mixto de factores intrasujetos, con el fin de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de glucosa liberada para ambos tratamientos en los 5 tiempos evaluados (2, 4, 8, 16 y 24 horas) (Anexo 19). Dado que el P-valor para la interacción significativa entre el tiempo y los tratamientos fue  $< 0,05$ , se rechazó la hipótesis nula, y se aceptó la hipótesis alterna, la cual indicó que existe una interacción significativa entre el tiempo y el tipo de tratamiento en la producción de glucosa, es decir, la variación en la cantidad de glucosa liberada a lo largo del tiempo dependió del tipo de tratamiento empleado. Por otro lado, el eta parcial al cuadrado ( $\eta^2$  parcial = 0,899) indicó que una gran proporción de la variabilidad en la glucosa liberada se puede explicar por la interacción entre el tiempo y el tipo de tratamiento. Asimismo, la potencia observada de 1, implicó una alta capacidad para detectar el efecto entre la

interacción tiempo y tratamiento. De manera general, estos resultados demostraron que el  $T_2$ , no solo es diferente al  $T_1$ , sino que mantiene esa diferencia entre cada punto de tiempo medido.

## IV. DISCUSIÓN

### Producción de la $\beta$ -glucosidasa

Se evaluó la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa del hongo termófilo *Thermomyces dupontii* cepa FC-13, por medio de una medición diaria de la actividad enzimática en el sobrenadante del medio, habiéndose registrado valores de actividad de 0,029 U/ml a partir del día 2, y el mayor valor 1,179 U/ml en el día 17, posteriormente los valores de actividad cayeron hasta el día 22, pudiéndose deber a la desnaturalización de la enzima o al efecto acumulativo de la celobiosa (Mlaik et al., 2020). Estos resultados difieren a los obtenidos por otros trabajos, ya que por lo general el tiempo para alcanzar la máxima producción no es tan largo.

De acuerdo a Rosa et al. (2018), el aumento en la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se produce durante las etapas finales de la fermentación de hongos filamentosos, como en *Penicillium sp.* que a los 9 días se observaron sus niveles más altos de actividad (0,058 U/mL), y en el mismo periodo de tiempo la actividad enzimática de *Trichoderma reesei* QM9414 alcanzó su máximo de actividad (0,019 U/mL), este último teniendo el valor más bajo, debido a que su producción de  $\beta$ -glucosidasa es mínimo, y corresponde aproximadamente a solo el 1% del contenido total de sus proteínas secretadas. Para otros hongos como *Aspergillus fumigatus*, la actividad máxima de su  $\beta$ -glucosidasa (0,87 UI/mL) se observó después de 8 días de tiempo de incubación (Saroj et al., 2022). Asimismo, Pereira et al. (2015), reportaron que la  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo termófilo

*Thermomucor indicae-seudaticae* N31, registró su mayor actividad (4,18 U/mL) a los 8 días, así mismo Martins et al. (2019), reportaron que para este mismo hongo los días de mayor actividad se encontraban entre el día 5 y 11.

Como se ha visto, el periodo de producción enzimática para llegar al máximo de actividad  $\beta$ -glucosidasa, así como la cantidad de  $\beta$ -glucosidasa producida, es diferente en cada hongo productor mencionado, lo cual puede atribuirse a las condiciones no optimizadas del cultivo, o las condiciones del inóculo (Maheshwari et al., 2000). Además, que la variación entre cepas de la misma especie puede generar estas diferencias, ejemplo de ello es el trabajo de Nisar et al. (2020), donde se optimizó la producción de  $\beta$ -glucosidasa para *Thermomyces dupontii* TK-19, habiéndose obtenido 26 U/mL a las 72 h de incubación, mediante variaciones en la concentración de sulfato de amonio al 0,25% y un inóculo de 1,25 mL. Por otra parte, la optimización de la producción enzimática, también se ha visto en hongos mesófilos como *Aspergillus niger*, donde por medio de la implementación de urea y macroalgas al medio fúngico como fuente de nitrógeno, se incrementó la actividad  $\beta$ -glucosidasa en el día 12, a 34,9 y 26,3 UI/mL, para cada fuente de nitrógeno respectivamente (Mlaik et al., 2020) . Asimismo, Singh et al. (2023), indicaron que *Aspergillus japonicus* mejoró su producción de  $\beta$ -glucosidasa de 0,4 a 10,13 U/mL en el sexto día, debido a una optimización con 1,75% de peptona de soja y 1,25% de salvado de trigo. Por lo tanto, la producción de  $\beta$ -glucosidasa que se aborda en este trabajo, se encuentra dentro de los valores normales para los hongos termófilos, sin embargo, es

posible que una optimización de las condiciones del cultivo, podrían mejorar la cantidad de  $\beta$ -glucosidasa generada, así como una reducción del tiempo de producción.

### **Purificación de la $\beta$ -glucosidasa**

Para la purificación de la enzima  $\beta$ -glucosidasa se utilizó el método de fraccionamiento de proteínas por sulfato de amonio, en donde la concentración del 50% de sulfato de amonio precipitó la mayor parte de la enzima contenida en el extraído crudo, con una recuperación del 46,72%. Asimismo, se observó un incremento del precipitado de  $\beta$ -glucosidasa entre el 60% y 70% de sulfato de amonio. En las concentraciones del 80% y 90% se hacía difícil la recuperación de la enzima, ya que no se observaba pellet porque se encontraba flotando, al igual como lo indica Burgess, (2009), que en altas concentraciones de sulfato de amonio, la densidad de dichas concentraciones se aproxima a la de los agregados de proteínas, y el pellet podría flotar en lugar de sedimentarse en el fondo del tubo durante la centrifugación. En consecuencia, se consideró a la concentración del 50% de sulfato de amonio, como adecuada para la purificación de la  $\beta$ -glucosidasa. Este resultado es consistente con el hallazgo de Ramani et al. (2012), quienes observaron que la precipitación con sulfato de amonio al 50% permitía la recuperación máxima de la  $\beta$ -glucosidasa de *Penicillium funiculosum*, con un 27,4% de recuperación. Sin embargo, estudios como los de Bai et al. (2013) y Xie et al. (2004), han reportado recuperaciones del 49,8% y 42,5% utilizando una concentración del 80% de sulfato de amonio para  $\beta$ -glucosidasas de

*Penicillium simplicissimum* y *Aspergillus niger*, respectivamente. En general, es evidente que la concentración de sulfato de amonio necesario para precipitar la  $\beta$ -glucosidasa puede variar, esto probablemente debido a que a menudo, las proteínas de bajo peso molecular necesitan más sal para precipitar que las proteínas de alto peso molecular, debido a su menor capacidad de interacción con las sales, y por el contrario, las proteínas de alto peso molecular, como los complejos multiprotéicos de celulasa, pueden precipitar con menos sal debido a su mayor capacidad de interacción y estabilidad estructural (Wingfield, 1998).

### **Determinación del Peso Molecular**

En el SDS-PAGE al 12%, se analizaron dos fracciones de la  $\beta$ -glucosidasa, precipitada con sulfato de amonio al 70% y al 50%. En ambas muestras se identificó la  $\beta$ -glucosidasa con un peso molecular de 120 kDa. Sin embargo, la muestra precipitada al 70% con sulfato de amonio mostró una mayor presencia de proteínas coprecipitadas con la  $\beta$ -glucosidasa, evidenciada por la aparición de varias bandas adicionales. En contraste, la muestra precipitada al 50% presentó menos bandas de proteínas coprecipitadas y una banda más definida de  $\beta$ -glucosidasa, indicando un mayor grado de pureza en esta concentración. Además, el análisis del zimograma confirmó la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, y a su vez la banda de actividad en el zimograma coincidió con la observada en el SDS-PAGE, corroborando así el peso molecular de 120 kDa de la  $\beta$ -glucosidasa. Lo cual va de acorde al análisis de la literatura, que mostró una amplia gama de pesos

moleculares de  $\beta$ -glucosidasa fúngicas, que van desde los 45 a 250 kDa (Maheshwari et al., 2000). Por mencionar ejemplos de especies de hongos relacionadas al de este trabajo, se tiene a la  $\beta$ -glucosidasa de *Thermomyces dupontii* descrita por Nisar et al. (2022), que tuvo un peso molecular de 66 kDa, que fue menos a lo descrito en este trabajo, probablemente debido a ser una cepa diferente. Además, la  $\beta$ -glucosidasa producida por *Talaromyces thermophilus*, presentó un peso molecular de 116 kDa (Fakhfakh y Belghith, 2016). También en otras especies de hongos se ha evidenciado un peso molecular parecido al de la  $\beta$ -glucosidasa de este trabajo. Tales como *Aspergillus sp.* DHE7, cuya  $\beta$ -glucosidasa presentó un peso molecular de 135 kDa (Ghonemy, 2021). De la misma manera Yan et al. (2016), reportaron un peso de 120 kDa para la  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus terreus*, y 126 kDa en el caso de *Penicillium simplicissimum* (Bai et al., 2013). Además, aunque son poco comunes, hay  $\beta$ -glucosidasas fúngicas que son proteínas multiméricas, como la  $\beta$ -glucosidasa de *Penicillium funiculosum*, que es un dímero formado por subunidades de 120 kDa, mientras que la enzima de *Aspergillus niger* es un trímero con subunidades de 110 kDa. (Ramani et al., 2012).

### **Efecto del pH**

Se determinó que la  $\beta$ -glucosidasa exhibió la mayor actividad enzimática a pH 5,0, pero disminuyó rápidamente por debajo de pH 5,0 y por encima de pH 7,0, coincidiendo con el rango de pH indicado por Magwaza et al. (2024).

Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado por Nisar et al. (2022), quienes determinaron un pH óptimo de 5,5 para *Thermomyces dupontii*. Además, la  $\beta$ -glucosidasa producida por diferentes especies de hongos termófilos como *Myceliophthora heterothallica* (Martins et al., 2020) , *Aspergillus terreus* (Yan et al., 2016) , *Aspergillus fumigatus* (Saroj et al., 2022), también presentaron un pH óptimo de 5,0. La  $\beta$ -glucosidasa de este estudio muestra una mayor actividad en valores de pH entre 5,0 y 6,0. Esta característica es ideal para la bioconversión de biomasa pretratada en condiciones ácidas y es compatible con celulasas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus*, que tienen actividades óptimas en rangos de pH similares, lo que permite que trabajen eficazmente juntas en procesos de bioconversión. (Santa et al., 2018).

### **Efecto de la temperatura**

La  $\beta$ -glucosidasa presentó una temperatura óptima de actividad a 70°C, que corresponde al rango de temperatura de la mayoría de enzimas termófilas, que oscila entre 50 a 80 °C (Bala y Singh, 2019).

La temperatura óptima determinada, coincide con la  $\beta$ -glucosidasa producida por otros hongos termófilos como *Thermomyces dupontii* (Nisar et al., 2022), y *Thermomucor indicae-seudaticae* (Martins et al., 2019). Y fue superior en comparación a la  $\beta$ -glucosidasa de otras especies de hongos como *Talaromyces thermophilus* (Mallek-Fakhfakh y Belghith, 2016), *Talaromyces leycettanus* (Li et al., 2018), *Thermomyces lanuginosus* (Lin et

al., 1999) y *Thermoascus crustaceus* (Garbin et al., 2021), que tienen temperaturas óptimas alrededor de los 65°C. También fue superior a la  $\beta$ -glucosidasa de especies como *Penicillium occitanis*, *Penicillium funicolosum*, *Thermoascus aurantiacus* (Ramani et al., 2012) y *Myceliophthora heterothallica* (Martins et al., 2020), cuyas temperaturas óptimas fueron de 60°C.

Se observó también que la  $\beta$ -glucosidasa conservaba una alta actividad relativa incluso a temperaturas más altas, manteniendo un 92% de actividad a 80°C. En contraste, a temperaturas relativamente más bajas, la actividad disminuyó, con un 75% de actividad a 60°C, un 47% a 50°C, y un descenso significativo a temperaturas extremas de 40°C con un 27% y 90°C con un 28%. Tal efecto, puede atribuirse a la sensibilidad de los cambios de temperatura, ya que cada enzima tiene una temperatura óptima a la que su actividad es máxima, y si la enzima se somete a una temperatura que está fuera del rango de su actividad, puede causar cambios en la naturaleza de la enzima o descomposiciones (enlaces intermoleculares se ven afectados), lo que conllevaría a una disminución de su actividad (Bala y Singh, 2019). En general, se puede decir que la  $\beta$ -glucosidasa de este trabajo, tiene la capacidad de poder llevar a cabo reacciones a altas temperaturas. Lo cual resulta, altamente atractivo en la industria, ya que tales condiciones de temperatura, permite fortalecer las interacciones enzima-sustrato, reducir la viscosidad del sustrato, mejorar la transferencia de masa, reducir el riesgo de

contaminación, y a menudo mejorar los rendimientos (Ratuchne y Knob, 2021).

### **Determinación de Termoestabilidad**

La  $\beta$ -glucosidasa estudiada mantuvo una actividad residual mayor al 90% luego de 5 horas de incubación en temperaturas de 40, 50, y 60°C, pero solo el 10% después de 30 minutos a 70°C. Similar a lo reportado por Mlaik et al. (2020), quienes indicaron que la  $\beta$ -glucosidasa de su estudio, mantuvo solo el 10% de su actividad residual luego de incubarse a 70°C por 15 minutos. En contraste, los hallazgos de Nisar et al. (2022), señalaron que la  $\beta$ -glucosidasa producida por una cepa de *Thermomyces dupontii*, mantuvo el 100 % de actividad residual después de 5 horas de incubación a 70°C, y un 65% tras una incubación por 10 horas a 60°C. En comparación, la  $\beta$ -glucosidasa de este estudio requirió una incubación de 48 horas a 60°C para obtener un 67% de actividad residual, lo cual indica una aparente una aparente termoestabilidad superior, en un periodo mayor de tiempo a dicha temperatura. Los resultados obtenidos, solo corroboran la alta termoestabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa estudiada, además de la producida por otras especies de hongos termófilos. Como *Aspergillus terreus*, que mantuvo el 90% y 65% después de la incubación a 50 y 60°C durante 1 hora respectivamente (Yan et al., 2016). También, la  $\beta$ -glucosidasa de *Penicillium funiculosum* mantuvo una actividad residual del 79% tras incubarse a 50°C durante 5 horas, y del 87 % después de 1 hora a 60°C. Sin embargo, la enzima perdió toda actividad residual después de ser expuesta a 80°C durante 15

minutos (Ramani et al., 2012). Además, en el caso de *Thermomucor indicae-seudaticae*, su  $\beta$ -glucosidasa mantuvo entre el 70% y 75% de actividad residual cuando se incubó durante 1 hora a 50, 60 y 70°C (Pereira et al., 2015). Como se ha observado, las enzimas de microorganismos termófilos tienen una notable estabilidad estructural, permitiéndoles resistir altas temperaturas durante períodos prolongados de tiempo. Según Rigoldi et al. (2018), esta estabilidad estructural se debe a la abundancia de puentes disulfuro, enlaces de hidrógeno y puentes salinos. También, se cree que se puede atribuir a un mayor número de residuos de prolina, moléculas de agua internas, así como a una unión de más subunidades en la estructura cuaternaria en comparación con muchas enzimas mesófilas (Cairns y Esen, 2010).

De manera general, se puede decir que la  $\beta$ -glucosidasa de este trabajo es bastante termoestable, ya que incluso tras 96 horas mantuvo un 57% y 36% de actividad residual, cuando se incubó a 50 y 60°C respectivamente. En ese contexto, su termoestabilidad es una característica muy atractiva para aplicaciones industriales, ya que le permite mantener su actividad a altas temperaturas por más tiempo sin descomponerse, facilitando su reutilización y reduciendo costos. Además, de tener un mayor potencial evolutivo en ingeniería de proteínas, ya que podría aceptar una gama más amplia de mutaciones beneficiosas sin perder su estructura nativa (Xu et al., 2020).

### Efecto de Iones metálicos

Se probó el efecto iones metálicos como:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , en concentraciones de 1, 5 y 10 mM, sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa. Observándose un incremento en la actividad relativa de la enzima, entre 126% y 150% al agregar iones metálicos en concentraciones de 1 y 5 mM. Sin embargo, a una concentración de 10 mM, se evidenció un efecto inhibitorio aparente, reduciendo la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa entre 68% y 97% para todos los iones. Este fenómeno destaca cómo los iones metálicos pueden tener un doble efecto (activador o inhibidor) sobre la actividad enzimática, dependiendo de su concentración y las características específicas de la enzima, reflejando la complejidad de su interacción (Medyantseva et al., 1998). En ese contexto, Pereira et al. (2017) señalaron que el radio del ion tiene una gran influencia en la actividad y estabilidad de la enzima, ya que un radio más grande ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) tiene menos influencia en los aminoácidos catalíticos, mientras que un radio más pequeño ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) puede atraer más intensamente a los aminoácidos cargados, cambiando la conformación general de la enzima y dañando el sitio catalítico. Por otro lado, Pereira et al. (2017), sugieren que el incremento en la actividad enzimática puede ser resultado de la modulación ejercida por iones metálicos, al interactuar con grupos amino o carboxilo de los aminoácidos. Un ejemplo es la  $\beta$ -glucosidasa de *Myceliophthora thermophila*, que presentó un incremento de su actividad de 149% con  $\text{Zn}^{2+}$ , 103% con  $\text{K}^+$  y 110% con  $\text{Mg}^{2+}$  en una concentración de 10 mM, pero una leve disminución al 94% con  $\text{Ca}^{2+}$

(Karnaouri et al., 2013). En contraste, Nisar et al. (2022), reportó que para la  $\beta$ -glucosidasa de *Thermomyces dupontii*, el  $Zn^{2+}$  aparentemente inhibió la actividad enzimática hasta un 55% en una concentración 10 mM, lo cual puede atribuirse a su capacidad para oxidar la cisteína del sitio activo de la enzima, formando enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares, o para reorganizar estos enlaces y generar ácido sulfénico, lo que puede resultar en una reducción de la actividad enzimática (Neves et al., 2022). Sin embargo, el  $Zn^{2+}$  también puede proporcionar cierta estabilidad, mediante la quelación de este ión entre los grupos químicos de la  $\beta$ -glucosidasa, como lo observado en la  $\beta$ -glucosidasa de *Penicillium funiculosum*, que tuvo un incremento del 156% con el  $Zn^{2+}$ , también con  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  pero con un menor valor en comparación (Ramani et al., 2012). En este estudio, se observaron resultados similares con los mismos iones, donde el  $Zn^{2+}$  produjo uno de los mayores incrementos en la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa, elevándola en un 150%. En resumen, los resultados resaltan cómo los iones metálicos actúan de manera dual al regular la actividad enzimática, lo cual varía según su concentración. Estos hallazgos sugieren posibles estrategias para mejorar las condiciones de aplicación de la  $\beta$ -glucosidasa en distintos procesos industriales.

### **Efecto de la Glucosa**

La glucosa demostró ser un fuerte inhibidor de la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, ya que la actividad relativa se redujo hasta un 6% en una concentración 100 mM de glucosa. No obstante, tal efecto es bastante común

con la mayoría de  $\beta$ -glucosidasas fúngicas, ya que son fuertemente inhibidas por la glucosa, en concentraciones de 0,5 mM a 100 mM (Srivastava et al., 2019). Según Garbin et al. (2021), la  $\beta$ -glucosidasa de *Thermoascus crustaceus*, solo mantuvo el 30% de actividad relativa en una concentración de 100 mM de glucosa. De la misma forma Garcia et al. (2018) reportaron que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa de *Lichtheimia ramosa* fue afectada por la presencia de glucosa, manteniendo el 50% de su actividad inicial en soluciones que contenían 50 mM de glucosa. También las  $\beta$ -glucosidasas de *Lichtheimia corymbifera* y *Byssochlamys spectabilis* fueron significativamente inhibidas por la presencia de glucosa, manteniendo solo alrededor del 50% de su actividad con concentraciones de glucosa de 50 mM y 30 mM respectivamente (Morais et al., 2018). Asimismo, la presencia de glucosa en una concentración 100 mM, inhibió hasta un 38% de la actividad original de la  $\beta$ -glucosidasa producida por *Thermomucor indicae-seudaticae* (Pereira et al., 2015). En general, se ha demostrado que la  $\beta$ -glucosidasa de este trabajo es particularmente más sensible a la inhibición por glucosa 100 mM, lo que supone un desafío a superar, en aplicaciones industriales específicas.

### **Efecto del Etanol**

La  $\beta$ -glucosidasa mantuvo una actividad relativa del 94% en concentraciones de etanol al 5% (v/v), y un 66% en concentraciones de etanol al 10% (v/v), sin embargo, la actividad disminuyó por debajo del 50%, en concentraciones de etanol al 15, 20, 25, 30, 35 y 40% (v/v). Resultados similares fueron obtenidos en la  $\beta$ -glucosidasa producida por *Thermomucor*

*indicae-seudaticae*, la cual mostró una actividad relativa del 94,1%, 76,4% y 62,7% a concentraciones de etanol del 5%, 10% y 15% (v/v) respectivamente, pero se observó una reducción hasta un 21,5%, al aumentar la concentración de etanol al 20% (Martins et al., 2019). La importancia de estos hallazgos, radica en la búsqueda de  $\beta$ -glucosidasas tolerantes al etanol, ya que uno de los desafíos en la aplicación industrial de la  $\beta$ -glucosidasa, es su marcada inhibición por la glucosa, lo que ha generado la alternativa de asociar la hidrólisis enzimática de la celulosa, a la fermentación alcohólica, donde la glucosa liberada se convierte en etanol (Pereira et al., 2015). Tales fermentaciones se dan por medio de *Saccharomyces cerevisiae*, en concentraciones de etanol no superiores al 10%, ya que pueden resultar dañinas para la levadura fermentadora (Garbin et al., 2021). En ese sentido, dado que la actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa de este trabajo se mantiene por encima del 50% en concentraciones de etanol al 10%, se puede decir que tolera relativamente bien las concentraciones de etanol, lo que supondría una característica atractiva para superar su sensibilidad a la inhibición por glucosa.

#### **Determinación de $K_m$ y $V_{max}$**

Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron obtenidos utilizando p-NPG como sustrato a 70°C y a pH 5,0, resultando 5,645 mM y de 1,981 (U/mg) respectivamente. Aunque es difícil comparar los valores cinéticos de  $\beta$ -glucosidasas obtenidas en otros trabajos, debido a las diferentes condiciones de ensayo, necesariamente deben utilizar el mismo sustrato (p-NPG), en ese

contexto según Park et al. (2012), los valores de  $K_m$  para las  $\beta$ -glucosidasas producidas por hongos oscilarían entre 0,09 y 21,7 mM, por lo que el valor obtenido en este trabajo estaría dentro del rango. No obstante, el valor de  $K_m$  es comparable a lo reportado por Jeya et al. (2010), en relación a la  $\beta$ -glucosidasa producida por el hongo *Penicillium purpurogenum*, obteniéndose valores de  $V_{max}$  (934 U/mg) y  $K_m$  (5,1 mM) siendo este último un valor similar, lo cual indica una mejoría en la afinidad de la enzima por el sustrato, respecto a la enzima de este estudio. En ese sentido, Ramani et al. (2012), determinaron valores de  $K_m$  (0,057 mM) y  $V_{max}$  (1920 U/mg) para la  $\beta$ -glucosidasa de *Penicillium funiculosum*, siendo este un valor muy inferior de  $K_m$  a comparación de los otros valores mencionados, lo que indicaría la alta afinidad de la enzima por el sustrato, sin embargo, también es un indicador de la baja concentración de sustrato necesario para saturar a la enzima.

### **Efecto de la $\beta$ -glucosidasa en la degradación de celulosa**

Para evaluar el efecto de la  $\beta$ -glucosidasa en la sacarificación de bagazo de caña pretratado, se utilizó una celulasa comercial como el grupo de control, y la  $\beta$ -glucosidasa junto a la celulasa comercial como el grupo experimental, de modo que se obtuvo a las 4 horas un incremento relativo de glucosa del 65%, en el grupo experimental respecto a la glucosa liberada en el grupo control. Y a las 8 horas dicho incremento relativo fue de un 57%, superando el 20% como lo indica Karnaouri et al. (2013), sin embargo, esta diferencia se vio reducida a un 13% y 6% en las 16 y 24 horas respectivamente. Aun así, estos resultados fueron superiores en comparación

a los obtenidos por Sun et al. (2022), que evaluaron la suplementación de una  $\beta$ -glucosidasa recombinante de *Trichoderma harzianum* junto a la celulasa comercial (Celluclast), en la sacarificación de bagazo como materia prima, obteniendo un 35% más de glucosa a las 96 horas, respecto al grupo control. En otro trabajo, Ramani et al. (2012), utilizaron la  $\beta$ -glucosidasa de *Penicillium funiculosum* NCL1 para suplementar una preparación de celulasa comercial de *Trichoderma reesei*, en la sacarificación de celulosa en polvo, obteniendo entre un 60% a 70% de aumento de glucosa a las 36 horas, que se asemejó mucho al incremento de glucosa observado a las 8 horas en el presente trabajo. La disminución significativa en la producción de glucosa a las 16 y 24 horas probablemente se deba a la inhibición por glucosa, ya que la  $\beta$ -glucosidasa utilizada no es tolerante a altos niveles de glucosa, como se determinó anteriormente. Esto sugiere que, aunque la suplementación con  $\beta$ -glucosidasa puede mejorar inicialmente la sacarificación, la acumulación de glucosa libre puede inhibir la actividad enzimática en etapas posteriores del proceso (Srivastava et al., 2019). No obstante, según Garcia et al. (2018), un aumento en la concentración de glucosa en el medio de reacción favorece la síntesis de celobiosa por la  $\beta$ -glucosidasa (actividad de transglicosilación), lo que podría explicar también la disminución de la producción de glucosa a las 16 y 24 horas en este trabajo.

## CONCLUSIONES

- Para el Hongo Termófilo Cepa FC-13, se alcanzó la mayor producción de  $\beta$ -glucosidasa (1,179 U/mL) en el día 17, empleando el medio de producción Mandels-Weber suplementado con perejil en polvo.
- El fraccionamiento con sulfato de amonio demostró ser un método adecuado para la purificación de la enzima sin perjuicio de su actividad.
- Las características de la  $\beta$ -glucosidasa destacan su potencial aplicación en procesos de hidrólisis requeridos por la industria.
- La adición de  $\beta$ -glucosidasa permite una mayor liberación de glucosa por efecto sinérgico con la celulasa comercial en la hidrólisis de celulosa.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda a los investigadores cuyo interés es maximizar y reducir los tiempos para la producción de  $\beta$ -glucosidasa, deban realizar una optimización del medio de cultivo, así como del inóculo.
- Para aumentar el grado de pureza de la  $\beta$ -glucosidasa, se recomienda utilizar etapas adicionales de purificación, tales como la cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de filtración en gel.
- Se recomienda evaluar la actividad  $\beta$ -glucosidasa en sustratos diferentes al p-NPG, como celobiosa, laminaribiosa, gentiobiosa, salicina, y otros. Ya que podría proporcionar una visión más amplia de la especificidad y versatilidad de la enzima.
- Si el objetivo del investigador es maximizar la hidrólisis de celulosa al emplear la  $\beta$ -glucosidasa junto a una celulasa comercial, se recomienda realizar un diseño experimental de superficie de respuesta para determinar las cantidades óptimas de enzimas que maximicen la eficiencia del proceso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdeljalil, S., Borgi, I., Carvalho, S., Jmal-Hammami, L., & Gargouri, A. (2019). Molecular and bioinformatics analyses reveal two differentially expressed intracellular GH1  $\beta$ -glucosidases from the rare alkalophilic fungus *Stachybotrys microspora*. *Gene*, 703(April), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.007>
- Ahmed, A., Nasim, F. U.-H., Batool, K., & Bibi, A. (2017). Microbial  $\beta$ -Glucosidase: Sources, Production and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 31–46. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-4>
- Ahmed, S. S., Akhter, M., Sajjad, M., Gul, R., & Khurshid, S. (2019). Soluble Production, Characterization, and Structural Aesthetics of an Industrially Important Thermostable  $\beta$ -Glucosidase from *Clostridium thermocellum* in *Escherichia coli*. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9308593>
- Ariaeenejad, S., Nooshi-Nedamani, S., Rahban, M., Kavousi, K., Pirbalooti, A. G., Mirghaderi, S. S., Mohammadi, M., Mirzaei, M., & Salekdeh, G. H. (2020). A Novel High Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase: Targeted Computational Approach for Metagenomic Screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00813>

- 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. *EXCLI Journal*, 12. <https://doi.org/10.17877/DE290R-7346>
- Bala, A., & Singh, B. (2019). Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renewable Energy*, 136, 1231–1244. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2018.09.100>
- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (2002). *Microbial  $\beta$ -Glucosidases :Cloning ,Properties. and Applications*. 22(4),375–407. <https://doi.org/10.1080/07388550290789568>
- Bonfá, E. C., de Souza Moretti, M. M., Gomes, E., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2018). Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.008>

- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. *Methods in Enzymology*, 463(C), 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63020-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63020-2)
- Cairns, J. R. K., & Esen, A. (2010).  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010 67:20, 67(20), 3389–3405. <https://doi.org/10.1007/S00018-010-0399-2>
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., & Ferreira, N. L. (2010). Comparative kinetic analysis of two fungal  $\beta$ -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-3/FIGURES/4>
- Costa, S. G., Pereira, O. L., Teixeira-Ferreira, A., Valente, R. H., De Rezende, S. T., Guimarães, V. M., & Genta, F. A. (2018). *Penicillium citrinum* UFV1  $\beta$ -glucosidases: Purification, characterization, and application for biomass saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1226-5>
- Neves, C. A., de Menezes, L. H. S., Soares, G. A., dos Santos Reis, N., Tavares, I. M. C., Franco, M., & de Oliveira, J. R. (2022). Production and biochemical characterization of halotolerant  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC

10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(8), 3133–3144. <https://doi.org/10.1007/S13399-020-00930-8/METRICS>

Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)

Cassia Pereira, J., Leite, R. S. R., do Prado, H. F. A., Bocchini Martins, D. A., 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(2), 723–732. <https://doi.org/10.1007/S12010-014-1332-1/METRICS>

Dikshit, R., & Tallapragada, P. (2014). Partial Purification and Characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Monascus sanguineus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 185–191. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400040>

Ghonemy, D. H. (2021). Optimization of extracellular ethanol-tolerant  $\beta$ -glucosidase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 via solid state fermentation using jojoba meal as substrate: purification and biochemical characterization for biofuel preparation. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S43141-021-00144-Z>

- Fatani, S., Saito, Y., Alarawi, M., Gojobori, T., & Mineta, K. (2021). Genome sequencing and identification of cellulase genes in *Bacillus paralicheniformis* strains from the Red Sea. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02316-w>
- Festucci, R. A. B., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202007000100001>
- Frassatto, P. A. C., Casciatori, F. P., Thoméo, J. C., Gomes, E., Boscolo, M., & da Silva, R. (2021).  $\beta$ -Glucosidase production by *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* by solid state cultivation and application of enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane bagasse. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(2), 503–513. <https://doi.org/10.1007/S13399-020-00608-1>
- Garbin, A. P., Garcia, N. F. L., Cavalheiro, G. F., Silvestre, M. A., Rodrigues, A., DA PAZ, M. F., Fonseca, G. G., & Leite, R. S. R. (2021).  $\beta$ -glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus crustaceus*: production and industrial potential. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93(1), e20191349. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191349>
- Garcia, N. F. L., Santos, F. R. da S., Bocchini, D. A., Paz, M. F. da, Fonseca, G. G., & Leite, R. S. R. (2018a). Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane

bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products*, 122, 49–56.  
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.05.049>

He, S., Jiang, B., Chakraborty, A., & Yu, G. (2022). The Evolution of Glycoside Hydrolase Family 1 in Insects Related to Their Adaptation to Plant Utilization. *Insects*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/insects13090786>

Heinze, T. (2015). Cellulose: Structure and properties. *Advances in Polymer Science*, 271, 1–52. [https://doi.org/10.1007/12\\_2015\\_319](https://doi.org/10.1007/12_2015_319)

Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. *Cellulose*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>

Jeya, M., Joo, A. R., Lee, K. M., Tiwari, M. K., Lee, K. M., Kim, S. H., & Lee, J. K. (2010). Characterization of beta-glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1473–1484. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-2395-8>

Kang, Q., Appels, L., Tan, T., & Dewil, R. (2014). Bioethanol from lignocellulosic biomass: current findings determine research priorities. *TheScientificWorldJournal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/298153>

Karnaouri, A., Topakas, E., Paschos, T., Taouki, I., & Christakopoulos, P. (2013). Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *PeerJ*, 1(1). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.46>

- Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A. J. S., Reynolds, C. D., & Sihanonth, P. (2007). Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 162–170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00662.x>
- Laemmli, U. K. (1970). © Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 227, 680–685.
- Li, H., Yi, S., Bell, E. W., Huang, Q., & Zhao, X. (2020). Recombinant *Penicillium oxalicum* 16  $\beta$ -Glucosidase 1 Displays Comprehensive Inhibitory Resistance to Several Lignocellulose Pretreatment Products, Ethanol, and Salt. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(2), 772–784. <https://doi.org/10.1007/S12010-019-03183-Y>
- Li, X., Xia, W., Bai, Y., Ma, R., Yang, H., Luo, H., & Shi, P. (2018). A Novel Thermostable GH3  $\beta$ -Glucosidase from *Talaromyce leycettanus* with Broad Substrate Specificity and Significant Soybean Isoflavone Glycosides-Hydrolyzing Capability. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4794690>
- Lin, J., Pillay, B., & Singh, S. (1999). Purification and biochemical characteristics of  $\beta$ -D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30(1), 81–87. <https://doi.org/10.1111/J.1470-8744.1999.TB01163.X>

- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y., & Shen, Q. (2012). Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-25>
- Liu, S., Zhang, M., Hong, D., Fang, Z., Xiao, Y., Fang, W., & Zhang, X. (2023). Improving the cellobiose hydrolysis activity of glucose-stimulating  $\beta$ -glucosidase Bgl2A. *Enzyme and Microbial Technology*, 169(July), 110289. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110289>
- Magwaza, B., Amobonye, A., Bhagwat, P., & Pillai, S. (2024). Biochemical and in silico structural properties of a thermo-acid stable  $\beta$ -glucosidase from *Beauveria bassiana*. *Heliyon*, 10(7). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E28667>
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 461–488. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.3.461-488.2000>
- Mallek-Fakhfakh, H., & Belghith, H. (2016). Physicochemical properties of thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 419, 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2015.10.014>

- Mandels, M., & Weber, J. (1969). The Production of Cellulases. *Food Microbiology Division*, 391–414. <https://doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023>
- Martínez, M. J., & Prieto, A. (2021). Biotecnología para el aprovechamiento de la celulosa y hemicelulosa de los residuos vegetales. *Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas*, 3, 19–21. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx455.4>.
- Martins, E. da S., Gomes, E., da Silva, R., & Junior, R. B. (2019). Production of cellulases by *Thermomucor indicae-seudaticae*: characterization of a thermophilic  $\beta$ -glucosidase. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(8), 830–836. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1625060>
- Martins, M. E. da M., Martins, E. da S., & Martins, H. L. (2020). Production and characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora heterothallica*. *Bioscience Journal*, 36(1), 212–222. <https://doi.org/10.14393/BJ-V36N1A2020-47758>
- Medyantseva, E. P., Vertlib, M. G., & Budnikov, G. K. (1998). Metal ions as enzyme effectors. *Russian Chemical Reviews*, 67(3), 225–232. <https://doi.org/10.1070/RC1998V067N03ABEH000228/XML>
- Mlaik, N., Sayadi, S., Hamza, M., & Khoufi, S. (2020). Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* fermentation: Application for organic fraction of municipal solid waste hydrolysis and methane enhancement. *Biotechnology Progress*, 36(1), e2902. <https://doi.org/10.1002/BTPR.2902>

- Mohammad, I. E., Syed, S., Darukamalli, M. R., & Alapati, K. S. (2023). Review on Thermozyymes Produced by Thermophilic Fungi: A Gold Mine for Industrial Applications. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.24018/EJBIO.2023.4.1.438>
- Mohsin, I., Poudel, N., Li, D. C., & Papageorgiou, A. C. (2019). Crystal structure of a GH3  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20235962>
- Morais, T. P. de, Barbosa, P. M. G., Garcia, N. F. L., Rosa-Garzon, N. G. da, Fonseca, G. G., Paz, M. F. da, Cabral, H., & Leite, R. S. R. (2018). Catalytic and thermodynamic properties of  $\beta$ -glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssosclamyces spectabilis*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(9), 777–786. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1509083>
- Nascimento, A. G. C. R. do, Paula, A. M. de, Busato, J. G., Silva, S. G. da, & Texeira Neto, A. R. (2023). Prospection of Cellulolytic Fungi from Composted Samples of Saturated Horse Litter. *Agriculture 2023*, Vol. 13, Page 1308, 13(7), 1308. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE13071308>
- Nasir, H. M. I., Ahmed, I., Zia, M. A., & Irfan, M. (2011). Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility.

*Advances in Bioscience and Biotechnology*, 02(03), 149–156.  
<https://doi.org/10.4236/abb.2011.23024>

Nisar, K., Abdullah, R., Kaleem, A., Iqtedar, M., Aftab, M., & Saleem, F. (2022). Purification, characterization and thermodynamic analysis of cellulases produced from *Thermomyces dupontii* and its industrial applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(12), 103483.  
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2022.103483>

Nisar, K., Abdullah, R., Kaleem, A., Iqtedar, M., Saleem, F., Iftikhar, T., & Aslam, F. (2020). Application of plackett burman and box behnken design for the optimization of  $\beta$ -glucosidase production by thermophilic *Thermomyces dupontii*. *Revista de Chimie*, 70(9), 32–38. <https://doi.org/10.37358/RC.20.9.8314>

Park, A. R., Hong, J. H., Kim, J. J., & Yoon, J. J. (2012). Biochemical Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten Citrus Peel. *Mycobiology*, 40(3), 173. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.3.173>

Pereira, J. de C., Giese, E. C., Moretti, M. M. de S., Gomes, A. C. dos S., Perrone, O. M., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E., & Martins, D. A. B. (2017). Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities. *Enzyme Inhibitors and Activators*. <https://doi.org/10.5772/65934>

- Piccinni, F. E. (2019). *Caracterización de enzimas activas sobre carbohidratos de un aislamiento de Cellulomonas sp. para degradación de biomasa lignocelulósica.*
- Prejanò, M., Alberto, M. E., Russo, N., Toscano, M., & Marino, T. (2020). The Effects of the Metal Ion Substitution into the Active Site of Metalloenzymes: A Theoretical Insight on Some Selected Cases. *Catalysts 2020, Vol. 10, Page 1038, 10(9), 1038.* <https://doi.org/10.3390/CATAL10091038>
- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rao, M., & Gunasekaran, P. (2012a). Production, purification, and characterization of a  $\beta$ -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 167(5), 959–972.* <https://doi.org/10.1007/S12010-012-9645-4>
- Ratuchne, A., & Knob, A. (2021). A new and unusual  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*: Catalytic activity at high temperatures and glucose tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 35, 102064.* <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.102064>
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., & Mohammadi, A. A. (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy, 199, 117457.* <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2020.117457>

- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2(1). <https://doi.org/10.1063/1.4997367>
- Salgado, J. C. S., Meleiro, L. P., Carli, S., & Ward, R. J. (2018). Glucose tolerant and glucose stimulated  $\beta$ -glucosidases - A review. *Bioresource Technology*, 267, 704–713. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.07.137>
- Rosa, P. S., Souza, A. L., Roque, R. A., Andrade, E. V., Astolfi-Filho, S., Mota, A. J., & Nunes-Silva, C. G. (2018). Production of thermostable  $\beta$ -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 84–92. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2017.11.005>
- Saroj, P., Manasa, P., & Narasimhulu, K. (2022). Biochemical Characterization of Thermostable Carboxymethyl Cellulase and  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(6), 2503–2527. <https://doi.org/10.1007/S12010-022-03839-2>
- Seddiqi, H., Oliaei, E., Honarkar, H., Jin, J., Geonzon, L. C., Bacabac, R. G., & Klein-Nulend, J. (2021). Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. In *Springer* (Vol. 28, Issue 4). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03674-w>
- Sharma, B., Larroche, C., & Dussap, C. G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource Technology*, 313, 1–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>

- Singh, G., Verma, A. K., & Kumar, V. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. *3 Biotech*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>
- Singh, N., Sithole, B. B., & Govinden, R. (2023). Optimisation of  $\beta$ -Glucosidase Production in a Crude *Aspergillus japonicus* VIT-SB1 Cellulase Cocktail Using One Variable at a Time and Statistical Methods and its Application in Cellulose Hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS24129928>
- Sørensen, A., Ahring, B. K., Lübeck, M., Ubhayasekera, W., Bruno, K. S., Culley, D. E., & Lübeck, P. S. (2012). Identifying and characterizing the most significant  $\beta$ -glucosidase of the novel species *Aspergillus saccharolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, *58*(9), 1035–1046. <https://doi.org/10.1139/w2012-076>
- Srivastava, N., Mishra, P. K., & Upadhyay, S. N. (2020).  $\beta$ -Glucosidase enzyme: as a key enzyme for glucose production from cellulosic biomass. *Industrial Enzymes for Biofuels Production*, 81–100. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821010-9.00005-x>
- Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V. K., Sengar, R. S., Gupta, V. K., Mazumder, P. B., Khan, A. F., & Mishra, P. K. (2019). Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversation for Biofuels Application. *Biomolecules 2019, Vol. 9, Page 220*, *9*(6), 220. <https://doi.org/10.3390/BIOM9060220>

- Sternberg, D. (1976).  $\beta$  Glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(5), 648–654. <https://doi.org/10.1128/aem.31.5.648-654.1976>
- Sun, N., Liu, X., Zhang, B., Wang, X., Na, W., Tan, Z., Li, X., & Guan, Q. (2022). Characterization of a novel recombinant halophilic  $\beta$ -glucosidase of *Trichoderma harzianum* derived from Hainan mangrove. *BMC Microbiology*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02596-w>
- McNamara, J., L.W. Morgan, J., & Zimmer, J. (2015). A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. *Annu Rev Biochemistry*, 84, 895–921. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930.A>
- Uversky, V. N., & Kataeva, I. A. (2006). *Cellulosome*. 317.
- Wingfield, P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 13(1), A.3F.1-A.3F.8. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA03FS13>
- Xia, W., Bai, Y., Cui, Y., Xu, X., Qian, L., Shi, P., Zhang, W., Luo, H., Zhan, X., & Yao, B. (2016). Functional diversity of family 3  $\beta$ -glucosidases from thermophilic cellulolytic fungus *Humicola insolens* Y1. *Scientific Reports*, 6(May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep27062>
- Xie, Y., Gao, Y., & Chen, Z. (2004). Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase with high transglucosylation activity and stability

- from *Aspergillus niger* No. 5.1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 119(3), 229–240. <https://doi.org/10.1007/S12010-004-0004-Y>
- Xu, Z., Cen, Y. K., Zou, S. P., Xue, Y. P., & Zheng, Y. G. (2020). Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(1), 83–98. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1682963>
- Yan, F., Xia, W., Zhang, X., Chen, S., Nie, X., & Qian, L. (2016). Characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. *Journal of Zhejiang University: Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 17(6), 455–464. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500317>
- Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie, R. I., & Cann, I. K. O. (2010). Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 70, Issue 10). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70001-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70001-0)
- Yin, B., Gu, H., Mo, X., Xu, Y., Yan, B., Li, Q., Ou, Q., Wu, B., Guo, C., & Jiang, C. (2019). Identification and molecular characterization of a psychrophilic GH1  $\beta$ -glucosidase from the subtropical soil microorganism *Exiguobacterium sp.* GXG2. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0873-7>
- Yousef, N. M. H., & Mawad, A. M. M. (2023). Characterization of thermo/halo stable cellulase produced from halophilic *Virgibacillus salarius* BM-02 using non-

pretreated biomass. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03446-7>

Zahoor, S., Javed, M. M., Aftab, S., Latif, F., & Ikram-ul-Haq. (2011). Metabolic engineering and thermodynamic characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase produced by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, 10(41), 8107–8116. <https://doi.org/10.5897/ajb11.186>

Zang, X., Liu, M., Fan, Y., Xu, J., Xu, X., & Li, H. (2018). The structural and functional contributions of  $\beta$ -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1045-8>

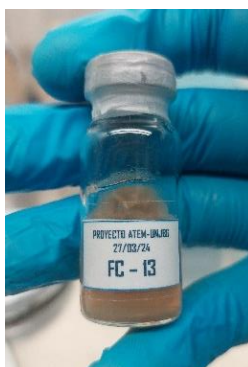
Zanphorlin, L. M., De Giuseppe, P. O., Honorato, R. V., Tonoli, C. C. C., Fattori, J., Crespim, E., De Oliveira, P. S. L., Ruller, R., & Murakami, M. T. (2016). Oligomerization as a strategy for cold adaptation: Structure and dynamics of the GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep23776>

Zhao, L., Xie, J., Zhang, X., Cao, F., & Pei, J. (2013). Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069T with high catalytic efficiency of ginsenoside Rb1 to Rd. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 95, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.05.027>

Zuliani, L., Serpico, A., De Simone, M., Frison, N., & Fusco, S. (2021). Biorefinery Gets Hot: Thermophilic Enzymes and Microorganisms for Second-Generation Bioethanol Production. *Processes* 2021, Vol. 9, Page 1583, 9(9), 1583. <https://doi.org/10.3390/PR9091583>

## ANEXOS

### ANEXO 1. Stock del hongo termófilo cepa FC-13



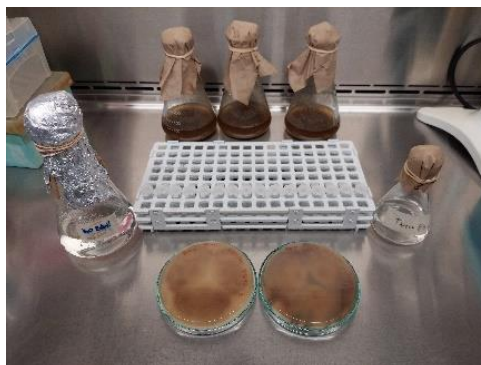
### ANEXO 2. Crecimiento a los 5 días del hongo termófilo cepa FC-13



### ANEXO 3. Colonias maduras formadas por el hongo termófilo cepa FC-13



**ANEXO 4.** Preparación para inóculo de esporas del hongo termófilo cepa FC-13 en medio de producción



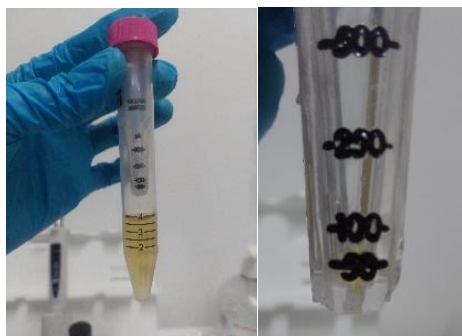
**ANEXO 5.** Pasos de la purificación por sulfato de amonio del extracto crudo



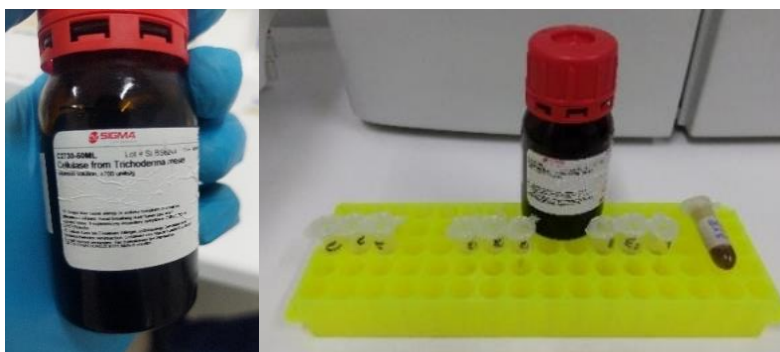
**ANEXO 8.** Obtención de la fracción purificada con sulfato de amonio

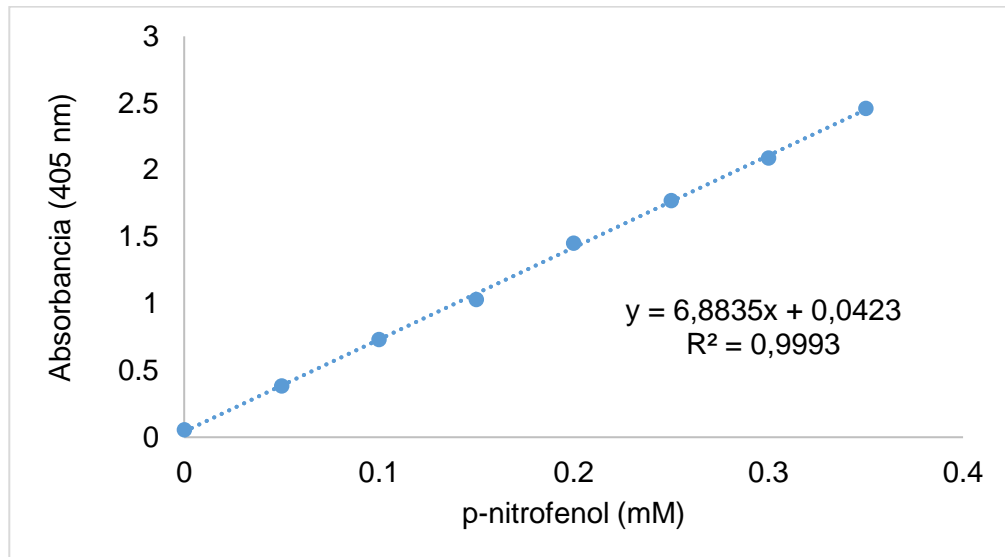
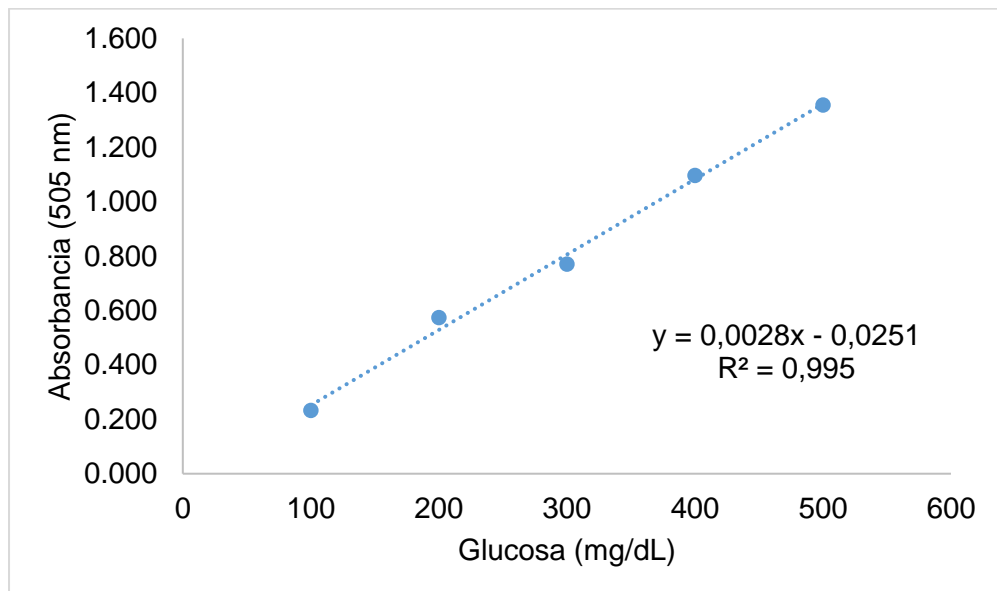


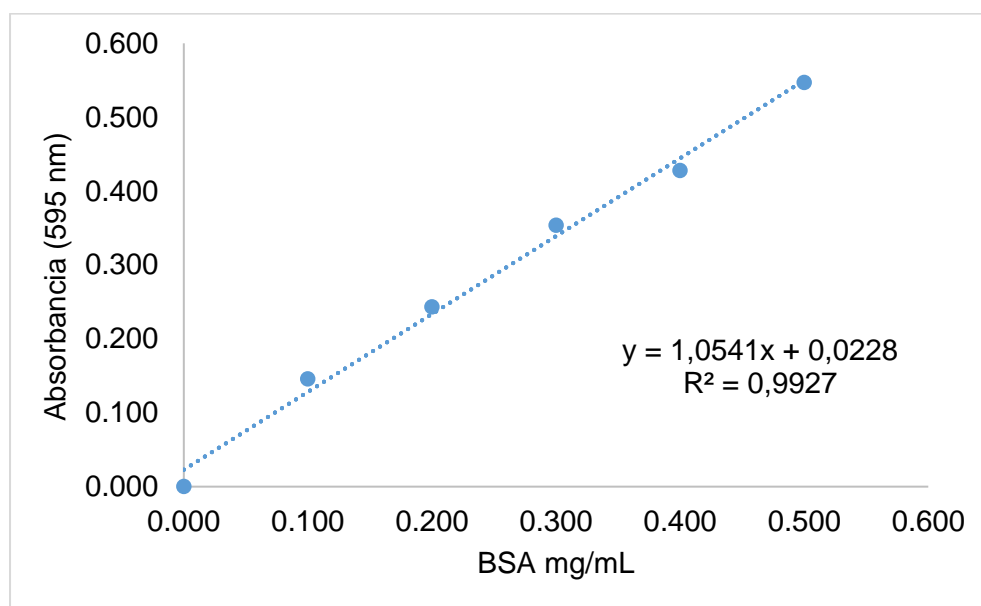
**ANEXO 9.** Lavados con centricon de la fracción purificada con sulfato de amonio



**ANEXO 10.** Celulasa comercial empleada en la hidrólisis de celulosa con  $\beta$ -glucosidasa



**ANEXO 11.** Curva de calibración de p-nitrofenol**ANEXO 12.** Curva de calibración de glucosa

**ANEXO 13.** Curva de calibración de proteínas totales con BSA**ANEXO 14.** Análisis de varianza para la actividad  $\beta$ -glucosidasa en diferentes valores de pH

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
Entre grupos	143,443000	7	20,491800	108374,41	< 0,0001
Intra grupos	0,003025	16	0,000189		
Total	143,446000	23			

**ANEXO 15.** Comparación múltiple de medias de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en diferentes valores de pH

pH	N	Media (UI/mL)	Grupos Homogéneos
3	3	0,000	X
10	3	0,000	X
9	3	0,572	X
8	3	1,369	X
4	3	2,474	X
7	3	4,129	X
6	3	5,916	X
5	3	6,514	X

*Nota.* N: número de réplicas; Medias con una "X" que compartan una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**ANEXO 16.** Análisis de varianza para la actividad  $\beta$ -glucosidasa en diferentes temperaturas

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P
Entre grupos	51,897900	5	10,379600	5603,52	< 0,0001
Intra grupos	0,022228	12	0,001852		
Total	51,920100	17			

**ANEXO 17.** Comparación múltiple de medias de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en diferentes valores de temperatura

T°C	Casos	Media	Grupos Homogéneos
40	3	1,596	X
90	3	1,649	X
50	3	2,720	X
60	3	4,402	X
80	3	5,351	X
70	3	5,834	X

*Nota.* N: número de réplicas; Medias con una "X" que compartan una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**ANEXO 18.** ANOVA mixto de factores intersujetos (Tratamientos)

Fuente	GI	F	Valor-P	Eta parcial al cuadrado	Potencia observada <sup>a</sup>
Intersección	1	110356,98	< 0,0001	1,000	1,000
Tratamiento	1	1196,02	< 0,0001	0,997	1,000
Error	4				

**ANEXO 19.** ANOVA mixto de factores intrasujetos (Interacción tiempo y tratamientos)

Fuente	GI	F	Valor-P	Eta parcial al cuadrado	Potencia observada <sup>a</sup>
Tiempo * Tratamiento	4	35,55	< 0,0001	0,899	1,000