

Producción de β -glucosidasas por cultivos de bacterias termófilas indígenas del altiplano boliviano

β -glucoside production by thermophilic bacteria indigenous the bolivian altiplano culture

*Esther Casablanca Alarcón**, *Neida Ríos Manríquez**, *Enrique Terrazas Siles**,
*Ma. Teresa Álvarez Aliaga**

Resumen

Las β -glucosidasas son enzimas que poseen actividad hidrolítica y transferasa o transglucosidasa. Tienen diversas aplicaciones; en la biosíntesis de oligosacáridos, producción de etanol utilizando residuos agrícolas y en la industria de vinos. La aplicación industrial, sin embargo, requiere estabilidad a temperaturas elevadas, por lo que los microorganismos termófilos tienen gran interés. El propósito de esta investigación es el de optimizar el medio de cultivo anaerobio de bacterias termófilas, para aumentar la producción de β -glucosidasas. Esta enzima es producida por tres aislados bacterianos: FT3, 2B y P5 los cuales fueron aislados de la región andina de Bolivia. El aislado bacteriano FT3 mostró una actividad β -glucosidasa de 0,35 [U/mL]. Se tomaron como variables dentro de la optimización del medio de cultivo las fuentes de nitrógeno y de carbono, y el pH. Así también se probaron dos sistemas de cultivo: células libres y encapsuladas. Empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno se obtuvo una actividad de 0,52 [U/mL]. En la optimización del pH del medio de cultivo se obtuvo una actividad de 0,81 [U/mL] a pH 5. Como fuente de carbono se eligieron los hidrolizados de paja de trigo y paja de quinoa llegándose a obtener actividades de 1,27 y 1,34 [U/mL] respectivamente. Se estableció que la localización celular de la enzima β -glucosidasa es extracelular y presenta estabilidad hasta una temperatura de 80 °C y un pH de 7.

Palabras clave: optimización, células inmobilizadas, bacterias extremófilas.

Abstract

The β -glucosidases possess hydrolytic and transferase activity or transglucosidase. They have various applications; such as biosynthesis of oligosaccharides, production of ethanol using agricultural residues and wine industry. However for industrial application, stability to high temperatures is needed. Therefore a great interesting in the thermophile microorganism study exist. The purpose of this research is to optimize the culture medium of thermophilic anaerobic bacteria to increase the production of β -glucosidase. This enzyme is produced by three isolate bacterial FT3, 2B and P5 which were isolated from the Andean region of Bolivia. FT3 isolate showed β -glucosidase activity of 0.35 [IU/mL]. In regards to the optimization of culture medium variables such as nitrogen source, carbon source and pH were taken into account and also the combination with free and encapsulated bacterial cells. Yeast extract was the selected source of nitrogen obtaining an activity of 0.52 [IU/ mL]. The optimal pH was 5 obtaining an activity of 0.81 [IU/mL]. The selected carbon source was the hydrolyzed wheat straw and quinoa straw obtaining activities of 1.27 and 1.34 [IU/mL], respectively. The cellular localization of β -glucosidase enzyme is extracellular and provides stability to temperature of 80 °C and stability at pH 7.

Key words: Optimization, immobilized cells, extremophile bacteria.

Recibido: marzo 25 de 2010

Aprobado: mayo 25 de 2011

* Área de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. materesa_alvarez@yahoo.com

Introducción

Las β -glucosidasas (β -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces glucosídicos β (1-4) de oligosacáridos, originando como producto final monómeros de glucosa. La afinidad de esta enzima disminuye al aumentar el grado de polimerización de los oligosacáridos, siendo inactivos sobre los polímeros. Las β -glucosidasas también disponen de actividad transferasa o transglucosidasas por lo que pueden generar productos de mayor tamaño que los oligosacáridos iniciales, lo cual determina su utilización en la biosíntesis de los mismos. También participan en la hidrólisis de compuestos glicosilados por lo que se utiliza en las industrias de zumos de frutas y derivados, siendo la más importante la industria vinera (hidrólisis de terpenoles glicosilados) potenciando el aroma (Palmeri et al., 2007). Otra aplicación es la producción de etanol a partir de residuos agrícolas (Sue et al., 2006). Las grandes posibilidades de aplicación de esta enzima promueven la investigación, el mejoramiento en la producción de las mismas y la contribución a la disminución de la contaminación.

Esta enzima generalmente es sintetizada por variedades de bacterias aerobias como *Phanerochaete chrysosporium* (Li et al., 1998), *Streptomyces sp.* y hongos como *Aspergillus oryzae* (Riou et al., 1998), *Achatina áulica*, *Periconia sp.*, *Botryodiplodia theobromae*. En los últimos años se realizaron esfuerzos por buscar nuevas alternativas de fuentes de esta enzima que tengan estabilidad extrema y es así que se han descrito bacterias cuyo metabolismo es anaerobio termófilo como: *Clostridium thermocellum* (Gräbnitz et al., 1989), *Thermoanaerobacter brockii* (Breves et al., 1997), *Thermophilic ethanologenes* (Taylor et al., 2009).

La inmovilización bacteriana en perlas de alginato de calcio ha sido un método bastante desarrollado o utilizado con la finalidad de favorecer la producción de

ciertas enzimas tales como β -galactosidasa (Bressel et al., 2008), glucosa oxidasa, catalasa (Blandino et al., 2003) y otros metabolitos como el ácido láctico (Yoo et al., 1996). Por tanto, la inmovilización de bacterias podría significar un incremento en la producción de enzimas.

Es por ello que esta investigación se centró en incrementar la producción enzimática extracelular de las β -glucosidasas de bacterias anaerobias termófilas. El incremento de la producción está basado en la optimización de las condiciones físicas y químicas del cultivo, en sistemas inmovilizados y libres, para su posterior caracterización de la localización celular y estabilidad físico-química.

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron tres cultivos de bacterias termófilas anaerobias procedentes de lodo de aguas termales de la región altiplánica de Bolivia (tabla 1) obtenidos mediante técnicas de Roller-tubes (aislado 2B del consorcio 2B), de cultivo bifásico (aislado FT3 del consorcio FT3), y por encapsulación en alginato de calcio (aislado P5 del consorcio FT3) (Ríos et al., 2007).

Los aislados bacterianos FT3, 2B, P5 fueron cultivados en el medio base mineral 11 que tiene la siguiente composición por litro: 10 mL de solución A (NH_4Cl 200 g/L, NaCl 10 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L); 2ml de solución B ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 200 g/L); 1 mL de solución C ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L, HCl 25% 6,5 mL, H_3BO_3 60 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 120 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, ZnCl_2 70 mg/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L); 1 mL de solución D (Na_2SeO_3 3 mg/L, NaOH 0,5 g/L); 30 mL de solución E (NaHCO_3 8,5 g/100 mL); 0,1 mL de

Tabla 1. Origen de las cepas bacterianas

Cepa	Origen	Localización geográfica
FT3	Chaquí Potosí	S 19°37.46,0" W 65°34,302"
2B	Aguas termales Capachos	S 17°53.483" W 67°02,668"
P5	Chaquí Potosí	S 19°37.46,0" W 65°34,302"

solución F (Biotina 1 mg/L, PABA 5 mg/L, Vit. B₁₂ 5 mg/L, Tiamina 10 mg/L); 0,2 mL de solución reductora G (Na₂S*9H₂O 2%), y como fuente de carbono xilano 0,2% p/v (salvo otra fuente de carbono utilizada). El pH del medio fue 7,2 ± 0,2 (salvo otra modificación hecha en el trabajo).

Se estableció un sistema de anaerobiosis en los medios de cultivos a través de la gasificación con nitrógeno de los viales que contenían el medio de cultivo según la técnica de Hungate para cultivo de anaerobios (Miller y Wolin, 1974). Los cultivos fueron incubados a una temperatura de 60 °C por 7 días. A diferentes tiempos del cultivo se tomaron muestras con el fin de evaluar la evolución de la actividad enzimática y el crecimiento bacteriano. En este último caso, la cuantificación se realizó por medición de la densidad óptica a 560 nm en un espectrofotómetro.

Inmovilización en perlas de alginato

La inmovilización en polímeros de alginato de calcio se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Casablanca *et al.* (2009).

Las bacterias inmovilizadas en polímeros de alginato fueron trasvasadas a un medio de cultivo en condiciones anaerobias dentro de una cámara de anaerobiosis. Todo material y reactivo utilizado para este fin fue esterilizado por vapor a presión, excepto el alginato de sodio que fue irradiado con luz ultravioleta por 30 min.

Optimización del medio de cultivo

Para la optimización del medio de cultivo se realizaron variaciones de las fuentes de nitrógeno, carbono y pH.

Optimización de la fuente de nitrógeno. Se realizó un diseño factorial 4x2, con cuatro fuentes de nitrógeno (NaNO₃, extracto de levadura, NH₄Cl y urea) y dos sistemas de cultivos: células libres e inmovilizadas. La concentración de la fuente de nitrógeno se basó en el medio mineral 11, se realizó una variación del compuesto nitrogenado de la solución A, la cual fue utilizada como referencia de concentración para el cálculo de la cantidad de nitrógeno de los demás compuestos, de acuerdo con lo descrito por Casablanca *et al.* (2009).

Influencia del pH. Se realizó bajo el siguiente diseño factorial 6x2, con seis pH 10, 9, 8, 7, 6, 5 y dos sistemas de cultivos, células libres e inmovilizadas.

Optimización de la fuente carbono. Se realizó un diseño factorial de 5x2, con cinco fuentes de carbono y

dos sistemas de cultivos, células libres e inmovilizadas. Las fuentes de carbono fueron xilano e hidrolizados de paja de quinoa, cascarilla de arroz, paja de trigo y paja de soja. Las materias crudas fueron pretratadas por métodos químicos (hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida y por pretratamiento con amonio) y uno físico (hidrólisis térmica) de acuerdo con lo descrito por Casablanca *et al.* (2009). En todos los casos, la concentración de los hidrolizados para utilizar en el medio de cultivo se estimó a partir de la valoración de la demanda química de oxígeno (DQO), tomándose como valor de referencia el valor de DQO obtenido para el xilano 2% p/v, fuente de carbono del medio mineral 11 (Casablanca *et al.*, 2009).

Actividad β-glucosidasa

Cuantificación de la actividad

La cuantificación de la actividad β-glucosidasa se realizó por determinación de la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado desde el p-nitrofenol-glucósido (pNPG) usado como sustrato. La reacción se llevó a cabo adicionando 40 μL de la fuente enzimática (sobrenadante del cultivo, suspensión de bacterias sonicadas) en 0,46 mL de pNP-glucósido (2,8 mM) y 0,5 mL de buffer citrato (50 mM, pH 5), para un volumen final de 1 mL. La mezcla se incubó a 80 °C durante 30 min. Una vez finalizado el tiempo y enfriada a temperatura ambiente se realizó la lectura. El pNP liberado fue medido espectrofotométricamente a 405 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado para el pNP fue de 0,0002 μM cm⁻¹. La unidad de actividad enzimática [U] se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de pNP por minuto bajo las condiciones ensayadas. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Localización celular

La localización celular de la enzima se realizó por medición de actividades tanto intra como extracelulares de la enzima. La cuantificación de la actividad intracelular de la enzima se basó en la lisis de la bacteria mediante un método físico (sonicación). La amplitud de sonicación empleada fue de 20% durante 5 min.

Se cultivó el aislado bacteriano FT3 en medio mineral 11, en un cultivo *batch* con fuente de nitrógeno y fuente de carbono que fueron seleccionadas de la optimización del medio de cultivo, del cual se realizó una cinética enzimática tanto intracelular como extracelular total de la enzima. A diferentes tiempos del cultivo se tomaron 2 mL de muestras con el fin de realizar un seguimiento de la actividad enzimática, las cuales

fueron repartidas a 1 mL en distintos tubos. La primera muestra se centrifugó a 10.000 rpm teniendo dos fases de la cual se tomó el sobrenadante (enzimas extracelulares); la segunda muestra fue el pelet del centrifugado resuspendido en solución fisiológica en la misma cantidad que el sobrenadante para luego soncarlo a 5 min y 20% de amplitud, siendo esa muestra centrifugada a las mismas revoluciones (liberación de la enzima) rescatando el sobrenadante (enzimas intracelulares) y, por último, la tercera muestra se sonicó en las mismas condiciones para luego centrifugarla y obtener el sobrenadante (enzimas totales). En todos los casos, se realizó la medición de la actividad β -Glucosidasa.

Caracterización de la estabilidad de la enzima

La caracterización de la estabilidad de la enzima a temperatura y pH del medio de reacción se realizó en los extractos enzimáticos obtenidos del aislado bacteriano FT3 por métodos ya descritos anteriormente.

La influencia de la temperatura en la actividad enzimática se determinó en un rango de 30 °C a 90 °C por medición del producto de la reacción. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se estudió incubando 40 μ L extracto enzimático con 460 μ L de sustrato pNPG (2.8 mM) y 500 μ L buffer citrato (50 mM, pH 5); la mezcla homogénea se incubó a distintas temperaturas 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C por un espacio de 30 min.

El efecto del pH en la actividad enzimática se estudió a 80 °C, realizando variaciones del pH del medio de reacción desde 3 hasta 10 consecutivamente; la influencia del pH en la estabilidad de la enzima fue estudiada por la exposición del extracto enzimático a distintos valores de pH como son: 3 (buffer citrato de sodio 0,05 M), 4, 5 (buffer acetato de sodio 0,05 M), 6, 7, 8 (buffer fosfato de sodio 0,05 M), 9 (buffer cloruro de amonio 0,05 M) y 10 (buffer carbonato de sodio 0,05 M) todos en una cantidad de 500 μ L con 460 μ L de sustrato pNPG (2,8 mM) y 40 μ L de extracto enzimático, para un volumen final de 1 mL. Todas las mezclas homogéneas fueron sometidas a 80 °C durante 30 min; una vez finalizado el tiempo y enfriada a temperatura ambiente se realizó la lectura.

Resultados

Los aislados bacterianos FT3, 2B y P5 procedentes de muestras de lodos de aguas termales del altiplano Boliviano fueron sometidos a una selección con base en dos criterios: el crecimiento en medio sólido y la capacidad hidrolítica o actividad β -glucosidasa. La cepa FT3 mostró capacidad de crecer en medio sólido

(formación de colonias) y una actividad hidrolítica de aproximadamente $0,35 \pm 0,03$ [UI/mL], siendo esta actividad superior a los aislados bacterianos 2B y P5 que mostraron actividades de $0,23 \pm 0,08$ y $0,29 \pm 0,05$ [UI/mL] respectivamente.

El aislado FT3, fue inmovilizado y cultivado en medio mineral 11 con xilano como fuente de carbono y realizando la variación de la fuente de nitrógeno (NH_4Cl) por compuestos de distinta naturaleza como son: extracto de levadura, urea y nitrato de sodio; las actividades β -glucosidasas presentadas son $0,52 \pm 0,07$; $0,40 \pm 0,04$; $0,29 \pm 0,1$ [UI/mL] respectivamente (figura 1), mostrando una actividad superior con el extracto de levadura por lo que es seleccionado para los siguientes experimentos.

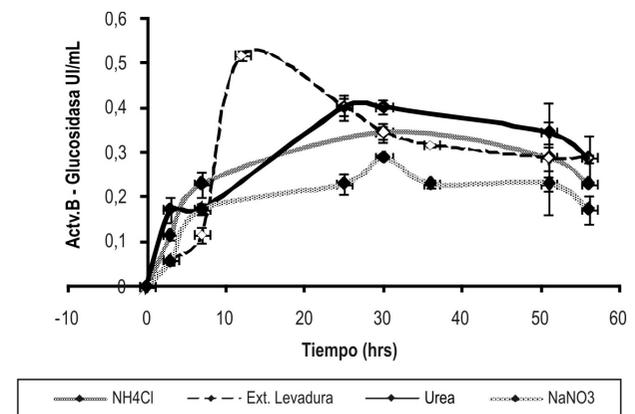


Figura 1. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática.

Así también se evidenció la biomasa del aislado FT3 en las perlas de alginato de calcio, por el cambio de coloración de las perlas que pasaron de incoloras a blanquecinas (figura 2). Dentro de un determinado tiempo las perlas de alginato que contenían a las bacterias llegaron a sobresaturarse y tendieron a salirse; la cantidad de bacterias en las perlas se evidenció por el tamaño del color de la misma, así también la sobreesaturación, siendo las perlas aproximadamente de un solo tamaño.

Las β -glucosidasas en sistemas de cultivos libres no presentaron actividades superiores a los cultivos de bacterias inmovilizadas (tabla 2), pero los resultados también indican que el extracto de levadura en ambos casos indujo a la producción de β -glucosidasas.

El crecimiento bacteriano de células inmovilizadas depende de la estabilidad de las perlas en el medio de



Figura 2. Diferencia del crecimiento de bacterias inmovilizadas

cultivo, por lo que se realizó una optimización de la influencia del pH en la producción enzimática y estabilidad de la perla. A pH alcalino las perlas de alginato no fueron estables llegando a desintegrarse en el lapso de 2 días, siendo las actividades enzimáticas de $0,58 \pm 0,1$; $0,50 \pm 0,12$ y $0,40 \pm 0,08$ [UI/mL] a pH de 10, 9 y 8 respectivamente (figura 3).

Las bacterias inmovilizadas en perlas fueron consistentes y estables cuando se trabajó a pH ácidos. Las actividades enzimáticas del aislado FT3 fueron de $0,46 \pm 0,1$ y $0,81 \pm 0,05$ [UI/mL] a pH 6 y 5 respectivamente. Teniendo una óptima actividad a pH 5. En los sistemas de cultivos de células libres las actividades enzimáticas se vieron afectadas presumiblemente porque existe un

contacto directo del medio de cultivo con las bacterias, siendo las enzimas inestables a pH extremos.

El aislado FT3 mostró una actividad hidrolítica sobre los residuos agrícolas (hidrolizados) utilizados como fuente de carbono. Presentando una actividad aproximada de $1,34 \pm 0,03$ [UI/mL] con hidrolizado de paja de quinoa y $1,27 \pm 0,07$ [UI/mL] con hidrolizados de paja de trigo (Bernadette *et al.*, 2003); estas actividades fueron superiores en comparación con las otras fuentes carbonadas del hidrolizado de cascarilla de arroz con una actividad de $0,63 \pm 0,09$ [UI/mL] y $0,40 \pm 0,1$ [UI/mL] con hidrolizado de paja de soja (figura 4). Siendo estas actividades la suma de la optimización de la fuente de nitrógeno y carbono.

Tabla 2. Comparación entre sistemas de cultivos

	Cel. Inmovilizadas		Cel. Libres	
	Actv.	Desv. Estándar	Actv.	Desv. Estándar
NH ₄ Cl	0,35 [UI/mL]	0,02	0,34 [UI/mL]	0,01
Ext. Lev	0,52 [UI/mL]	0,07	0,38 [UI/mL]	0,02
NaNO ₃	0,29 [UI/mL]	0,1	0,30 [UI/mL]	0,08
Urea	0,4 [UI/mL]	0,04	0,32 [UI/mL]	0,01

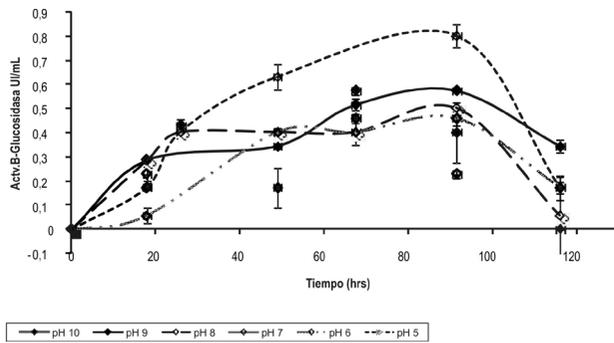


Figura 3. Influencia del pH en la actividad enzimática

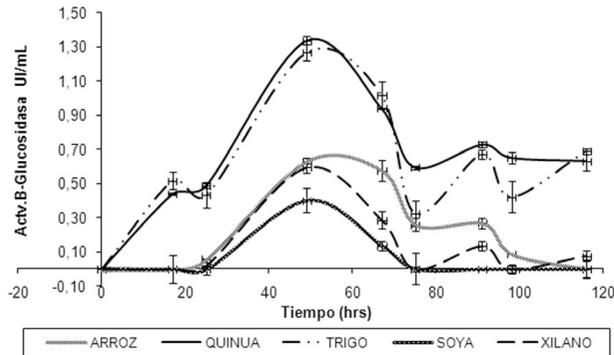


Figura 4. Influencia de la fuente carbonada sobre la actividad enzimática.

En cuanto a la localización celular de la enzima se obtuvo que es extracelular (figura 5) mostrando una actividad superior con respecto a la actividad β -glucosidasa intracelular.

La actividad óptima para la liberación de la glucosa del pNPG es a 80 °C (Ying *et al.*, 2007), disminuyendo la actividad a temperaturas más elevadas (figura 6). Se

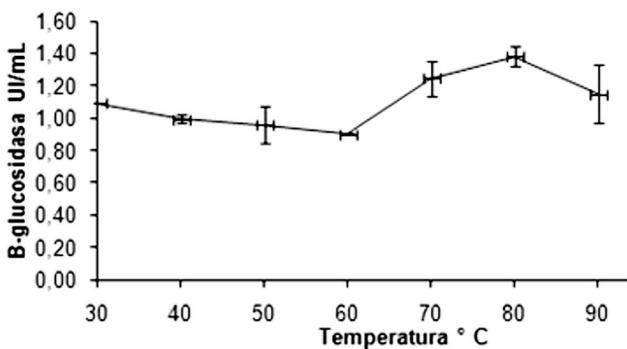


Figura 6. Caracterización de la estabilidad de la enzima β -glucosidasa.

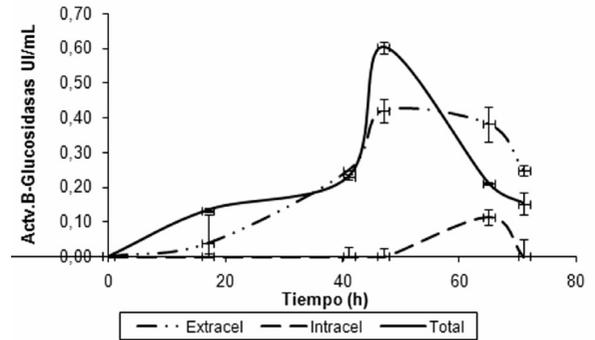


Figura 5. Actividades intracelulares y extracelulares.

obtuvo una mayor actividad a pH 7. Se han reportado datos similares (Parry *et al.*, 2001).

Discusión

Nuestros resultados muestran que el aislado bacteriano termófilo FT3 es productor de la enzima β -glucosidasa con una actividad de 0,35 [UI/mL], una actividad muy similar a la reportada por *Piromyces sp* (Bernadette *et al.*, 2003).

La inmovilización realizada incrementa la producción extracelular de las β -glucosidasas siendo estas excretadas al medio de cultivo. Distintos estudios indican que la inmovilización es una barrera de protección que evita el contacto directo con el medio de cultivo, siendo una forma para que las bacterias produzcan enzimas extracelulares (Ivanova *et al.*, 2000), la porosidad de la perla también es un factor predisponente (Ingar *et al.*, 2005).

Cuando se sometió al aislado bacteriano FT3 a un cambio de fuente de nitrógeno utilizando extracto de

levadura, el nivel de actividad enzimática se incrementó a un 50% de la actividad inicial.

Aunque cultivos en *batch* en extracto de levadura mostraron un incremento notable del nivel de actividad β -glucosidasa, el cambio de fuente de carbono dio un incremento de hasta tres veces.

Para experimentos posteriores será necesario definir con mayor precisión las condiciones óptimas de la inmovilización, hablando tanto de la porosidad como del tamaño de cada perla para la producción de enzimas extracelulares.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo económico de ASDI/Sarec – Suecia, en el desarrollo del Proyecto Biodiversidad Microbiana del lago Poopo y río Desaguadero.

Referencias bibliográficas

- Bernadette, K., Clem, K., Geoffrey, L. R., Gordon M. W. 2003. Production of β -glucosidase using immobilised *Piromyces* sp. KSX1 and *Orpinomyces* sp. 478P1 in repeat-batch culture. *Microbiology Biotechnology* 30: 205-209.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D. 2003. Calcium Alginate gel as encapsulation matrix for coimmobilized enzyme systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 110: 53-60.
- Bressel, A. B., Paz, A. H., Baldo, G., Lima, E., Matte, U., Saraiva, Ma, L. 2008. An effective device for generating alginate microcapsules. *Genetics and Molecular Biology* 31: 136-140.
- Breves, R., Bronnenmeier, K., Wild, N., Lottspeich, F., Staudenbauer, W. L., Hofemeister, J. 1997. Genes encoding two different beta-glucosidases of *Thermoanaerobacter brockii* are clustered in a common operon. *Applied and environmental microbiology* 63 (10): 3902-3910.
- Casablanca, E., Ríos, N., Álvarez, M. T., Terrazas, L. E. 2009. Optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas con cepas bacterianas encapsuladas y libres. *Biofarbo* 17 (2): 51-59.
- Gräbnitz, F., Rücknagel, K. P., Seiss, M., Staudenbauer, W. L. 1989. Nucleotide sequence of the *Clostridium thermocellum* bglB gene encoding thermostable beta-glucosidase B: homology to fungal beta-glucosidases. *Molecular & general genetics* 217 (1): 70-76.
- Hong, M. R., Kim, Y. S., Park, C. S., Lee, J. K., Kim, Y. S., Oh, D. K. 2009. Characterization of a recombinant β -glucosidase from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Bioscience and Bioengineering* 17 (1): 36-40.
- Ingar, K., Smidsrod, O., Skjåk-Braek, G. 2005. Algionates from Algae. *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry*.
- Ivanova, E., Chipeva, V., Ivanova, I., Dousset, X., Poncelet, D. 2000-2002. Encapsulation of Lactic acid bacteria in calcium alginate beds for bacteriocin production. *Culture collections* 3: 53-58.
- Li, B., Renganathan, V. 1998. Gene cloning and characterization of a novel cellulose-binding β -glucosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology* 64 (7): 2748-2754.
- Miller, T. L. y Wolin, M. J. 1974. A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. *Applied Microbiology* 27 (5): 985-987.
- Palmeri, R., Spagna, G. 2007. β -glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb Technol* 40: 382-9.
- Parry, N., Beever, E., Owen, Vandenberghe, I., Vanbeeumen, J. 2001. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemical Society* 353: 117-127.
- Ríos, N., Crespo, C. F., Terrazas, L. E., Álvarez, M. T. 2007. Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas en la producción de Bioetanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales. *Biofarbo* 15 (1): 43-50.
- Riou, C., Salmon, J., Vallier, M., Gunata, Z., Barrei, P. 1998. Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10): 3607-3614.
- Sue, M., Yamazaki Kana, Yajima Shunsuke, Nomura Taiji, Matsukawa Tetsuya, Iwamura Hajime, Miyamoto Toru. 2006. Molecular and Structural Characterization of Hexameric β -D-Glucosidases. *Wheat and Rye Plant Physiology* 141: 1237-1247.
- Taylor, M. P., Eley, K. L., Martin, S., Tuffin, M. I., Burton, S. G., Cowan, D. A. 2009. Thermophilic ethanologenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in Biotechnology* 27 (7): 398-405.
- Ying, H., Hongwei, L., Dacheng, H., Hongbin, X., Shengli, Y., Ling, Y. 2007. Purification and characterization of a novel ginsenoside-hydrolyzing β -D-glucosidase from the China white jade snail (*Achatina fulica*). *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1358-1366.
- Yoo, I. K., Seong, G. H., Chang, H. N., Park, J. K. 1996. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme Microbial Technology* 19: 428-433.