



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"**

INFLUENCIA DE DIFERENTES SUSTRATOS  
COMO INDUCTORES O REPRESORES DEL  
SISTEMA CELULOLITICO DE Cellulomonas flavigena

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

**ROMINA MA. DE LA PAZ RODRIGUEZ SANOJA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizo en el Laboratorio de Genética (42) del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, bajo la asesoria de la M. en C. Ma. Teresa Fonce Noyola.

## AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Ma. Teresa Ponce Noyola por su interes y paciencia en el asesoramiento y dirección de esta tesis.

A cada uno de los Sinodales que con sus valiosas opiniones y críticas contribuyeron a mejorar este trabajo.

A los biologos Angel Duran, Agustín Vargas y Elias Piedra por su apoyo en el uso de la computadora y los programas.

Indirectamente recibí ayuda y estímulo de muchas otras personas que sería imposible mencionar sin cometer alguna omisión, pero a todos ellos quiero hacer llegar mi agradecimiento.

## DEDICATORIA

A mis padres:

Quienes me dieron la oportunidad de ser.

A mis hermanos:

Rafael, Paty, Rene y Angel que me han dado confianza y apoyo, además de algo muy importante para mi, su presencia.

A mi abuelo:

Un gran hombre al que respeto y quiero mucho.

A Ranulfo:

Todo lo que he recibido de tí ha sido amor y apoyo.

A mis amigos:

Esther, Verónica, José, Gerardo y Héctor con los que compartí momentos especiales

## CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	5
MATERIALES Y METODOS	25
RESULTADOS	35
DISCUSION	57
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFIA	72

## RESUMEN

El sistema enzimático "celulasas" se encuentra sujeto a regulación metabólica. El conocer los mecanismos involucrados en su producción permitirá un mejor manejo y una mayor aplicación práctica de las mismas.

Los objetivos de este trabajo se centraron en la determinación del efecto inductor o represor que ejercen diferentes sustratos sobre la producción de enzimas con actividad sobre Carboximetil-celulosa (CMC), papel filtro (PF),  $\beta$ -glucosidasa y xilanasas en cultivos de *Cellulomonas flavigena*.

Las actividades enzimáticas mencionadas fueron medidas tanto en células intactas como en el ambiente externo.

La máxima actividad específica de celulasas y xilanasas fue encontrada sobre celobiosa a una concentración de 0.1% y la mínima se encontró en glicerol al 0.5%.

Los resultados mostraron que las endoglucanasas, exoglucanasas y xilanasas de *C. flavigena* son extracelulares mientras que la  $\beta$ -glucosidasa no se encontró en el sobrenadante ni en las células intactas. De los sustratos probados la mayor velocidad de crecimiento se encontró en glucosa, seguido por celobiosa, bagazo de caña, glicerol y lactosa.

## INTRODUCCION



De acuerdo con estudios realizados sobre la densidad demográfica se prevé que la población mundial pasará de 4 400 millones de habitantes en 1980 a unos 6 100 en el año 2 000. Con la aplicación de la tecnología moderna el mundo en conjunto tendría tierras cultivables suficientes para alimentar a una población superior a la que posiblemente tendrá jamás, sin embargo, los recursos de tierra están distribuidos de forma muy desigual en relación con la población (Wardle, 1985).

Esta situación plantea la necesidad de buscar alternativas alimenticias para el ser humano y los animales útiles para el mismo.

Un recurso importante que no ha sido totalmente aprovechado lo constituye la celulosa la cual al ser un producto de la fotosíntesis es una fuente renovable de energía (Zhu, Y. S., et al, 1982). La cantidad de carbono que se fija por esta vía se ha estimado en 100 billones de toneladas por año y la mitad de éstas corresponden a celulosa (Ryu, D. D. Y. & Mandels, M. 1980), este polímero es un desecho importante de las agroindustrias (pulpas, papel, etc.).

Muchos microorganismos pueden degradar la celulosa a productos solubles mediante un sistema enzimático conocido genéricamente con el nombre de celulasas. Sin embargo,

actualmente la conversión de este sustrato no es eficiente como para ser llevado a una escala industrial (De la Torre, 1985; Litchfield, 1983).

Desde la década de los 50's las enzimas celulolíticas han sido ampliamente estudiadas. La mayoría de los trabajos se han enfocado a producción y excreción, sin embargo, la comprensión de las cinéticas, el modo de acción, así como la regulación de la síntesis de celulasas son de especial importancia para la producción en gran escala de estas enzimas y la subsecuente obtención de azúcares fermentables.

En el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, IPN se han realizado estudios para la producción de proteína de origen bacteriano a partir de residuos agrícolas (bagazo de caña). El proceso se ha llevado a cabo con un cultivo mixto integrado por *Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas sp.*

Para apoyar y complementar los estudios anteriores se planteó el presente proyecto con los siguientes objetivos:

- 1) Conocer el efecto de diferentes fuentes de carbono como bagazo de caña, celobiosa y lactosa sobre la inducción del sistema celulolítico de *Cellulomonas flavigena*.
- 2) Determinar si glucosa y glicerol ejercen un efecto represor sobre el sistema celulolítico de la misma cepa.

**ANTECEDENTES**

## Microorganismo

Las enzimas celulolíticas son sintetizadas por un gran número de microorganismos, entre los cuales se incluyen hongos, actinomicetos, mixobacterias y eubacterias (Tabla 1). Sin embargo, son relativamente pocos los microorganismos que producen cantidades significativas de enzimas celulolíticas. Algunos de ellos excretan sólo endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasa y no son capaces de hidrolizar celulosa cristalina.

Algunos hongos han sido reportados como productores de enzimas capaces de degradar celulosa nativa (Tabla 1); de los cuales, *Trichoderma viride* y *Trichoderma reesei* parecen ser actualmente los microorganismos más promisorios (Litchfield, 1983; Ennari & Markkanen, 1977).

De los estudios realizados en procariones, la actividad celulolítica se ha encontrado tanto en bacterias mesófilas (*Bacillus*, *Cellulomonas*, etc) como en termófilas (*Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*) (Hagget, 1981); aerobias (*Pseudomonas*), anaerobios facultativos (*Bacillus*, *Cellulomonas*) y aerobios estrictos (*Clostridium*).

El microorganismo usado en el presente trabajo fué

Tabla 1. Microorganismos degradadores de celulosa.  
 (Tucker, et al, 1989; Bond, et al, 1989; Sanyal, et al, 1988;  
 Curskey, et al, 1983; Enari, 1983; Enari & Markkanen, 1977).

Hongos	Bacterias
<i>Trichoderma</i>	<b>Mixobacterias</b>
<i>Sporotrichum</i>	<i>Sporocytophaga</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Cytophaga</i>
<i>Polyporus</i>	<b>Actinomicetales</b>
<i>Myrothecium</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
<i>Irpex</i>	<i>Thermomonospora</i>
<i>Schizophyllum</i>	<i>Thermopolyspora</i>
<i>Sclerotium</i>	<b>Eubacterias</b>
<i>Talaromyces</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Thermoascus</i>	<i>Cellulomonas</i>
<i>Thielavia</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Neurospora</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Aerobasidium</i>	<i>Ruminococcus</i>
	<i>Acidothermus</i>
	<i>Erwinia</i>
	<i>Acetivibrio</i>

aislado de muestras de suelo por De la Torre (1981). Esta cepa se seleccionó por presentar mayor actividad en la degradación de celulosa y una velocidad de crecimiento más alta en comparación con las demás cepas aisladas.

Las bacterias del género *Cellulomonas* tienen la capacidad de utilizar la celulosa, produciendo ácido láctico y acético en concentraciones variables a partir de glucosa (Marschoun & Rapp, 1987); secretan tres tipos de enzimas relacionadas con la celulolisis: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasa y/o celobiosa fosforilasa (Stackebrandt & Kandler, 1979). Las endoglucanasas y exoglucanasas son liberadas al medio, mientras que la  $\beta$ -glucosidasa siempre se ha encontrado unida a la célula (Stoppok, et al, 1982).

En estudios realizados por De la Torre (1981) y Ponce-Noyola (1982), se ha observado que *Cellulomonas flavigena* mantiene una relación mutualista con *Xanthomonas sp.*, cuando se hacen crecer sobre bagazo de caña, donde ésta última proporciona vitaminas o precursores de las mismas y *C. flavigena* por su actividad celulolítica libera azúcares solubles y probablemente algunos factores de crecimiento.

#### Sustrato

La celulosa es el recurso renovable más abundante; sin

embargo no se encuentra puro en ninguna fuente natural. Aun las fibras de algodón, la forma más pura de celulosa disponible en la naturaleza contienen alrededor del 6% en peso de polisacáridos no celulósicos, proteínas y minerales. Los polisacáridos no celulósicos corresponden a almidón, pectina y una gran variedad de hemicelulosas. Estas hemicelulosas incluyen polímeros o heteropolímeros de galactosa, manosa, xilosa, arabinosa y sus ácidos urónicos. Además la celulosa se encuentra en íntima relación con la lignina, un complejo tridimensional formado por unidades de fenil-propano (Cowling & Kirk, 1976).

El bagazo de caña, la fuente de celulosa utilizada, contiene un 48.63% de celulosa en estado nativo y 75.36% después de haber sido sometido a un tratamiento alcalino (De la Torre, 1981). (Tabla 2). Es un residuo de la industria azucarera y representa una considerable reserva mal valorada de azúcares para fermentación.

La celulosa es un polímero lineal de más de 14 000 residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1-4. La unidad básica repetible es la celobiosa. Las cadenas de celulosa orientadas en paralelo con respecto a su compañera, se asocian para formar fibrillas insolubles en las cuales las cadenas se unen por puentes de hidrógeno, que ayudan a mantener la rigidez de la celulosa. Dentro de las fibras de celulosa existen zonas de completo orden o áreas cristalinas y zonas de poco orden o regiones amorfas donde

Tabla 2. Analisis químico del bagazo de caña  
(De la Torre, 1981).

	Bagazo de caña	Bagazo de caña tratado
	%	%
Proteína	1.26	1.60
Extracto etereo	3.05	1.91
Celulosa	48.63	75.36
Lignina	24.81	12.11
Cenizas	5.25	2.33
Extracto no nitrogenado	17.00	6.69



los enlaces hidrógeno-hidrógeno han sido rotos. El grado de cristalinidad varía según la fuente y el tratamiento al cual la celulosa ha sido sujeta (Coughlan, 1985). (Fig. 1).

Las características estructurales del material celulósico que determinan su susceptibilidad a degradación enzimática incluyen: 1) el grado de hinchazón por agua, 2) la cristalinidad, 3) el arreglo molecular 4) el contenido de materiales asociados como la lignina y 5) la estructura capilar de las fibras. Siendo la cristalinidad el parámetro estructural que más afecta la hidrólisis enzimática del material (Fan, et al, 1980).

### Sistema enzimático

Es bien sabido que la rápida hidrólisis de la celulosa nativa requiere la independiente y cooperativa acción de una mezcla de enzimas. Las actividades presentes en esta mezcla han sido identificadas pero aún no se conoce bien el número de enzimas que intervienen y como se interrelacionan entre sí.

Reese y col (1950) propusieron un modelo para la acción de las celulasas sobre celulosa cristalina. Un factor llamado  $C_1$ , el cual producía moléculas lineales a partir de celulosa cristalina. De la celulosa amorfa se obtenían azúcares solubles

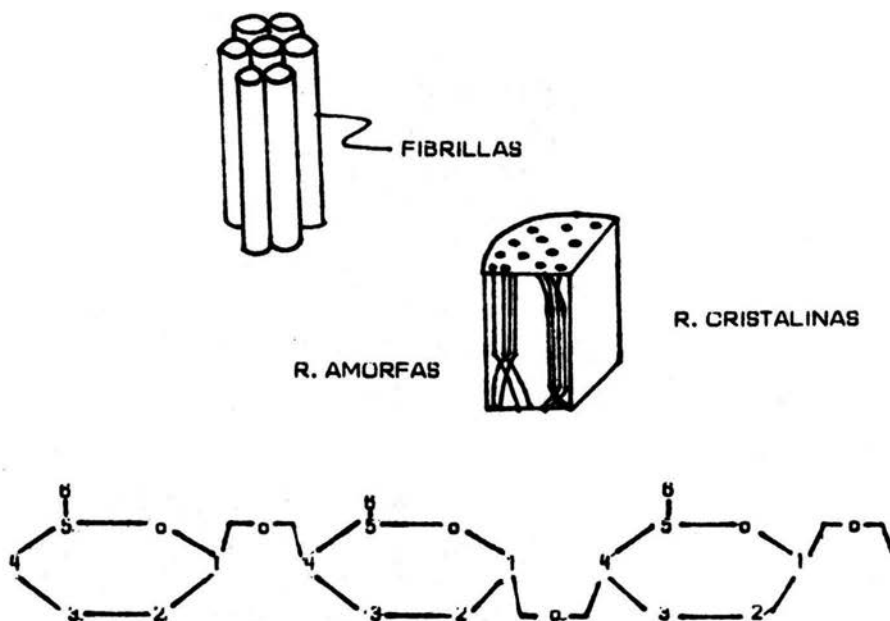
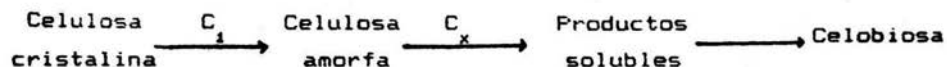


FIG. 1. Características estructurales y moleculares de la celulosa.

por la acción del factor  $C_x$ , el cual no podía actuar sobre celulosa nativa.



Actualmente el concepto de "Complejo celulolítico" incluye tres tipos de enzimas:

- 1) Endo- $\beta$ -1,4-D-glucan 4 glucanohidrolasa. (E.C.3.2.1.4), comúnmente conocida como  $C_x$ , carboximetil-celulasa o endoglucanasa.
- 2) 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasa. (E.C.3.2.1.91), conocida como avicelasa, exoglucanasa o  $C_1$ .
- 3)  $\beta$ -D-1,4 glucosidasa. (E.C.3.2.1.21), también llamada celobiasa.

ENDOGLUCANASA. Probablemente sea la enzima más estudiada del sistema y a pesar de esto de las menos entendidas, debido probablemente a la multiplicidad de formas en que se presenta esta enzima. Para *Cellulomonas* han sido reportadas desde una endoglucanasa de peso molecular de 40 000 daltons (Thayer, 1984), hasta 6 isoenzimas con pesos desde 62 944 a 120 572 daltons. (Prasertsan, et al, 1986).

Todos los microorganismos celulolíticos son capaces de producir ésta enzima. El método más frecuentemente usado para su determinación es la cuantificación de azúcares reductores liberados por acción de la enzima sobre carboximetil-celulosa (Mandels, 1976), aunque también se puede usar hidroxietil-celulosa (Enari, 1983).

La endoglucanasa actúa sobre celulosa amorfa en forma azarosa, resultando en un rápido decremento de la longitud de la cadena y un lento incremento de grupos reductores. Los productos intermedios son oligosacáridos solubles, posteriormente hidrolizados a celobiosa y glucosa. Las endoglucanasas aisladas aparentemente muestran poca capacidad para hidrolizar a la celulosa cristalina (Wood, 1985). Saharabudh y col (1987) reportan que la CMC'asa de *Penicillium funiculosum* hidroliza no sólo enlaces  $\beta$ -1,4; sino también enlaces  $\beta$ -1,3;  $\beta$ -1,6;  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6.

2) CELOBIOHIDROLASA. Esta celulasa se presenta como el mayor constituyente de los sistemas celulolíticos fúngicos (Wood, 1985). Algunos autores sugieren que sólo se encuentra en hongos, ya que las bacterias exhiben una actividad hidrolítica muy limitada sobre celulosa cristalina (Gong, 1979). Sin embargo O'Neill y col (1986) reportan para *Cellulomonas fimi* la presencia de un gene que codifica para una exoglucanasa.

Esta enzima degrada celulosa liberando unidades de celobiosa a partir de los extremos no reductores de la cadena (Wood, 1985), no ataca celulosa substituida lo que refleja un alto grado de especificidad. La celobiohidrolasa hidroliza celodextrinas pero no celobiosa (Enari, 1983).

3)  $\beta$ -GLUCOSIDASA. Es la única enzima de este sistema cuyo sustrato específico está disponible. Celobiosa, salicina y p-nitrofenil-D- $\beta$ -glucosido se utilizan para determinar su actividad (Mandels, et al, 1976).

Muchos autores no la consideran una celulasa, ya que esta enzima no puede actuar sobre celulosa; como menciona Wood (1985) el papel de la  $\beta$ -glucosidasa es el de remover el efecto inhibidor de la celobiosa, que es el principal producto de las otras dos enzimas.

La  $\beta$ -glucosidasa de *Trichoderma reesei* es fuertemente inhibida por gluconolactona. Hidroliza enlaces  $\beta(1-1)$ ,  $\beta(1-2)$  y  $\beta(1-6)$  tan bien como enlaces  $\beta(1-4)$  (Yong-Hyum, et al, 1980).

*Cellulomonas fimi* contiene 2  $\beta$ -glucosidasas. La primera es activa en PNGP pero no en celobiosa, siendo por lo tanto una aril- $\beta$ -D-glucosidasa y la segunda es activa en celobiosa, una  $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasa (celobiasa verdadera). Estas actividades solo se observaron en extractos celulares y no

solubles (Wakarchuk, et al, 1984).

Las diferencias reportadas en especificidad de sustrato para estas actividades se resumen en la Tabla 3.

El modelo comunmente aceptado para la hidrólisis de la celulosa muestra un mecanismo en el cual la endoglucanasa actúa en las regiones amorfas de las fibras de celulosa formando extremos libres no reducidos donde la celobiohidrolasa remueve unidades de celobiosa. La  $\beta$ -glucosidasa completa la hidrólisis removiendo la celobiosa, que es el inhibidor por producto final de la celobiohidrolasa y la endoglucanasa. En este modelo, la endoglucanasa parece ser la que limita la tasa de actividad (Enari, 1983). (Fig. 2).

Por incubación de la celulosa con enzimas purificadas del hongo *Trichoderma reesei* se ha demostrado que la celobiohidrolasa y la endoglucanasa actúan sinérgicamente, por lo que para una hidrólisis completa de la celulosa es necesario que ambas enzimas estén presentes (Enari, 1983).

Wood (1985) sugirió que no se requiere la interacción endo-exo para la celulolisis bacteriana y que la degradación puede ser por:

1) Una alta concentración de endoglucanasa protegida en un

Tabla 3. Hidrólisis de diferentes sustratos por enzimas celulolíticas

(Tomado de Enari, 1983).

Enzima	Sustrato				
	Celulosa cristalina	CMC	Celulosa amorfa	Celote- traosa	Celobiosa
Endoglucanasa	-	+	+	+	-
Celobiohidrolasa	+	-	+	+	-
$\beta$ -glucosidasa	-	-	-	+	+

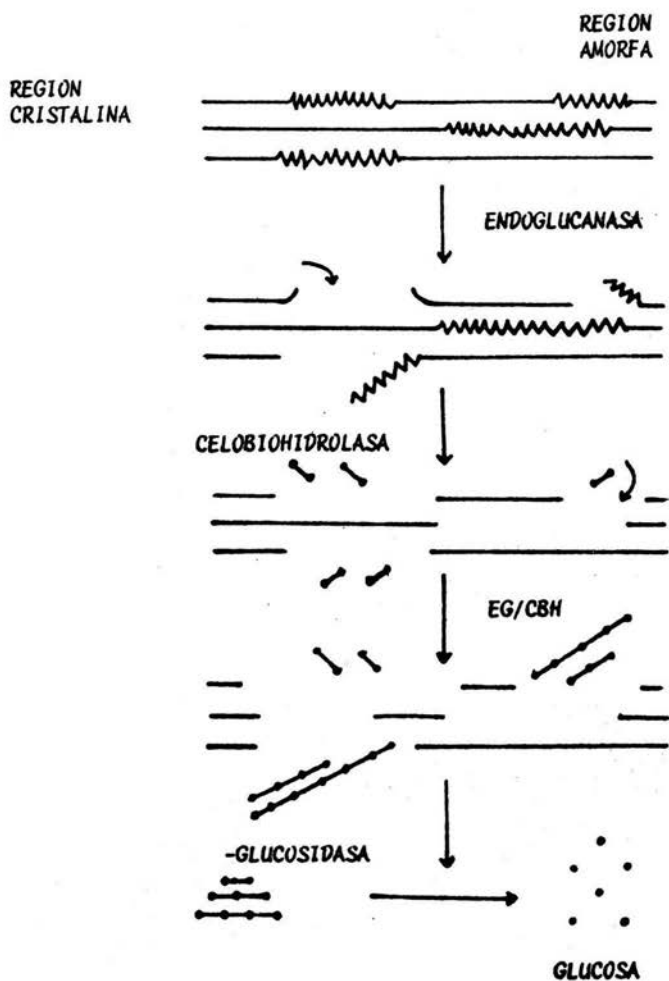


FIG. 2. Representación esquemática de los estados secuenciales de la hidrólisis enzimática de la celulosa (Enari, 1983).



ambiente especial en la vecindad inmediata de la célula bacteriana.

- 2) Una endoglucanasa mantenida por la bacteria en la correcta configuración de la celulosa cristalina.

### Biosíntesis de celulasas

La utilización de la celulosa por microorganismos celulolíticos es un proceso biológico muy lento. La naturaleza macromolecular e insoluble de la celulosa requiere que la inducción de las celulasas ocurra sin la interacción directa entre el sustrato y las moléculas efectoras intracelulares. (Beguin, et al, 1977) Esto puede operar por:

- 1) Inducción por contacto directo con la celulosa, donde la celulosa interactúa con el mecanismo de formación de celulasas vía receptores localizados en la cara externa de la célula.
- 2) Inducción por productos de degradación de la celulosa, bajo la idea de que pequeños niveles de celulasas producirían bajas cantidades de productos degradados que podrían actuar como clásicos inductores.

La respuesta de las células a diferentes inductores

varía dependiendo tanto de la concentración como del tipo de inductor, pero en general se acepta que la síntesis de las celulasas por los microorganismos está regulada por un mecanismo de inducción-represión.

Los inductores conocidos de este sistema tienen doble función. Pueden utilizarse como fuente de carbono para el crecimiento celular y promover la síntesis de las celulasas. Idealmente el papel de un inductor se debe limitar a disparar la síntesis enzimática, los inductores no deberían ser hidrolizados para no sufrir modificación química una vez dentro de la célula. Los llamados "inductores gratuitos" serían excelentes para el estudio de la síntesis de celulasas, desafortunadamente no se han encontrado para estos sistemas. En hongos del género *Trichoderma* se ha sugerido que la soforosa actúa como tal.

Como se mencionó anteriormente, se acepta que las celulasas son enzimas inducibles y reprimibles. En la tabla 4 se muestran algunos sustratos que han sido reportados como inductores y represores en algunos sistemas fúngicos.

No todos los organismos se comportan de la misma manera, Kawamori y col (1987) encuentran que el sistema celulolítico de *Thermoascus aurantiacus* es constitutivo.

Es por mucho, menos lo que se conoce de las celulasas

Tabla 4. Sustratos inductores (obviando celulosa) y represores de sistemas celulolíticos fúngicos.

Especie	Sustrato	Actividad	Referencia
<i>Trichoderma reesei</i>	Lactosa	+	Farkas, et al, 1987
<i>Trichoderma reesei</i>	Celobiosa	trazas	
	Lactosa	+	
	Xilana	-	
	Almidón	-	
	Maltosa	-	
	Sacarosa	-	
	Glucosa	-	
	Xilosa	-	Kawamori, et al 1987
	Arabinosa	-	
<i>Trichoderma reesei</i>	Glicerol	-	Curskey, et al, 1983
<i>Trichoderma harzanium</i>	Lactosa	+	Mes-Hartre, et al, 1988
<i>Trichoderma harzanium</i>	Glicerol	-	Kalra, et al, 1984
<i>Trichoderma pseudokoingii</i>	Soforosa	+	
	Celobiosa	+	
	Manosa	+	
	actosa	+	
	Sacarosa	-	
	Manosa	-	
	Glucosa	-	
	Fructosa	-	Zhu, et al 1982
<i>Trichoderma curvata</i>	Celobiosa	+	Stutzenberger, 1985
	Glucosa	-	
<i>Apergillus nidulans</i>	Glicerol	-	Bagga, et al, 1989
	Glucosa	-	
<i>Evernia prunostri</i> (liquen)	Celobiosa	+	Yague, et al, 1988

bacterianas, éstas pueden ser inducibles o constitutivas; la mayoría de los estudios indican que el sistema es regulado por inducción y/o represión por fuentes de carbono fácilmente metabolizables. Los inductores y represores reportados para estos microorganismos se resumen en la tabla 5.

En estudios realizados por Greenberg y col (1987) en *Cellulomonas fimi* se encontraron dos endoglucanasas y una exoglucanasa; las tres enzimas fueron reguladas por la fuente de carbono a nivel de transcripción. Sin embargo, una de las endoglucanasas (codificada por el gene cen B) fue transcrita a niveles bajos aún en presencia de glucosa; por lo que se supone un nivel basal que produciría los verdaderos inductores para la síntesis de celulasas.

Por lo anteriormente expuesto, es claro que un modelo unificado de la síntesis de celulasas es difícil de construir, dada la gran diversidad de respuestas de los organismos a varios inductores y medios de crecimiento. Gong y Tsao (1979) han propuesto un modelo que trata de generalizar la síntesis y regulación de éstas enzimas en cualquier microorganismo celulolítico (Fig. 3).

Tabla 5. Sustratos inductores (obviando celulosa) y represores de sistemas celulolíticos bacterianos.

Especie	Sustrato	Actividad	Referencia
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Glucosa	-	Murray, 1987
	Celobiosa	-	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soforosa	+	Yamane, et al 1970
	Celodextrinas	+	
	Celobiosa	+	
	Celohexosas	+	
	Glucosa	-	
	Almidón	-	
	Lactosa	-	
<i>Cellulomonas sp</i>	Xilana	-	Poulsen, et al 1988
	Galactomanosa	-	
	Almidón	-	
<i>Cellulomonas sp</i>	Glucosa	-	Vladut-Talor, et al, 1986
<i>Cellulomonas fimi</i>	Glicerol	-	Greenberg, et al, 1987
	Glucosa	-	
<i>Cellulomonas fimi</i>	Glucosa	-	Stewart, et al 1976
	Celobiosa	-	
<i>Cellulomonas uda</i> (anaerobiosis)	Celobiosa	+	Dermaun, et al 1988
<i>Cellulomonas uda</i>	Lactato	-	Chosson, 1987
<i>Cellulomonas uda</i>	Glicerol	-	Schmiz, et al 1983
	Glucosa	-	
	Celobiosa	-	
<i>Cellulomonas uda</i>	Celobiosa	+	Stoppok, et al 1982
	Glucosa	-	
	Manosa	-	
	Maltosa	-	
	Lactosa	-	
	Almidón	-	
	Peptona	-	
	Soforosa	-	
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Celobiosa	-	Beguin, et al 1977
	Glicerol	-	
	Acetato	+	

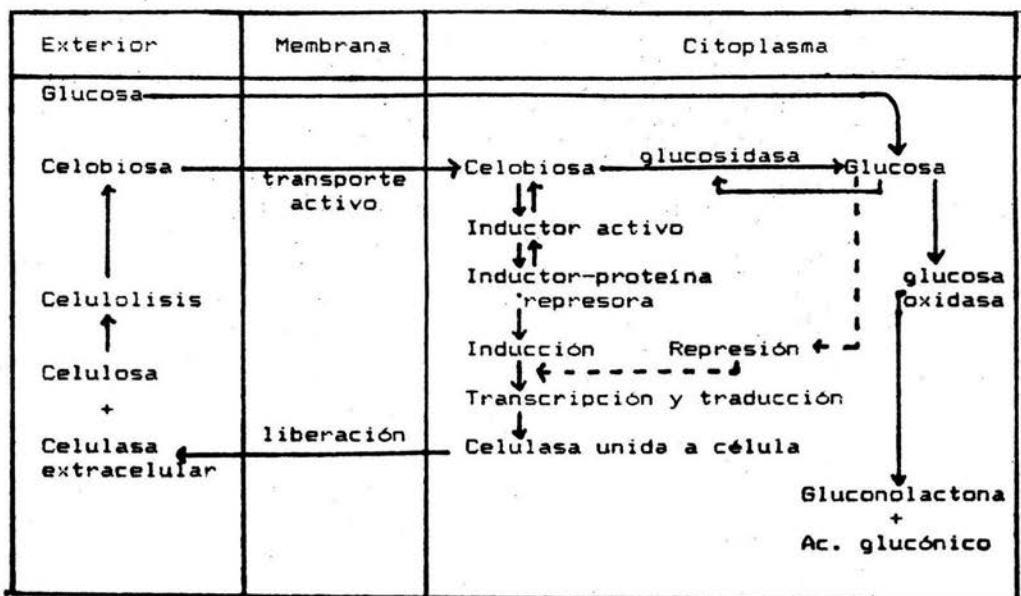


Fig. 3. Modelo propuesto para la regulación de la biosíntesis de celulasas (Gong y Tsao, 1979).

## **MATERIALES Y METODOS**

## Microorganismo

*Cellulomonas flavigena*, aislada del cultivo mixto ATCC. Fuente CDBB-b-532 (CINVESTAV, IPN); fué aislado de muestras de suelo (De la Torre, 1981). Es un bacilo corto, recto, Gram +, no presenta flagelos y es anaerobio facultativo. En placas de medio rico forma colonias circulares, ligeramente elevadas, de bordes lisos y de un color amarillo claro (Bergey, 1974).

## Medio de cultivo

a) Medio de propagación: Infusión cerebro-corazón (BHI); 37 g por litro. (Bioxon).

## b) Medio mineral (g/l)

NaCl	5.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5
$\text{CaCl}_2$	0.1
$\text{MgCl}_2$	0.1
* $\text{PO}_4^{-3}$	3.5

(Las sales usadas son de grado industrial y el agua de la llave).

\* Los fosfatos se obtuvieron por neutralización de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85% con KOH.



Al medio se le añadió además tiamina y biotina a una concentración final de 10 µg/l y 1 mg/l respectivamente.

#### Sustratos

-Bagazo de caña. Sometido a tratamiento alcalino descrito por de la Torre (1981). El bagazo ya seco fue molido en un molino de cuchillas (Arthur H. Thomas Co. Scientific Apparatus hasta pasar por una malla 40.

-Celobiosa. (Sigma)

-Lactosa (Merck).

-Glucosa. (J.T. Baker).

-Glicerol. (J.T. Baker).

#### Conservación del cultivo

*C. flavigena* fue crecida en tubos inclinados con medio mineral, 0.02% de extracto de levadura, 2% de agar bacteriológico y carboximetil-celulosa al 1% como única fuente de carbono y energía. Los tubos se incubaron de 24 a 48 h a 37°C, conservándose posteriormente en refrigeración a 4°C. La resiembra fue mensual.

#### Preparación del inóculo

A partir de un tubo de conservación se inoculó un matraz

de 250 ml con 50 ml de medio BHI, el cual se incubó durante 24 a 37°C, con agitación a 200 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en medio mineral esteril a su volumen original; se les agregó biotina y tiamina a una concentración final de 10 µg /ml y 1 mg/ml respectivamente. esta suspensión se llevó al fermentador como inóculo.

### Fermentación

Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de las enzimas sobre los diferentes sustratos (bagazo de caña, celobiosa, lactosa, glicerol y glucosa) en un fermentador de 1 l (Multigen, New Brunswick, Scientific Co.), tomándose muestras periódicamente hasta que el cultivo llegó a fase estacionaria. Se mantuvieron las siguientes condiciones de operación: volumen 500 ml, temperatura 37°C, aereación 2 vvm, agitación 300 rpm y pH 7.

### Localización de las enzimas

Las muestras tomadas fueron filtradas para eliminar el bagazo y posteriormente centrifugadas a 10 000 rpm durante 15 min. a 4°C para separar la fracción celular, ésta se lavo tres veces en buffer Tris-HCl 0.05M pH 7.2. Se determino actividad de CMC'asa, PF'asa, β-glucosidasa y de xilanasas, tanto en la fracción celular como en la del sobrenadante.

## **Técnicas**

### **Determinación del crecimiento**

El crecimiento se cuantificó indirectamente por medio de una curva en la que se relacionó absorbancia a 660 nm con peso seco de biomasa celular.

Para eliminar interferencia por bagazo de caña residual en la determinación de las muestras obtenidas en este sustrato se filtró a través de papel.

### **Determinación de proteína**

Se determinó en el cultivo total y en el sobrenadante por el método de Lowry et al (1951). La curva patrón se realizó con albúmina de suero de bovino.

### **Determinación de azúcares**

Se empleó la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS), descrita por Miller (1959). Se hicieron curvas tipo para glucosa, xilosa, celobiosa y lactosa.

## Determinación de las actividades enzimáticas

### Actividad sobre carboximetil-celulosa

Con esta prueba, de acuerdo con Mandels et al (1976), se cuantifica la actividad de endoglucanasas.

### Reactivos

Solución reguladora Tris-HCl 0.05M pH 7.2

Carboximetil-celulosa al 1% p/v en regulador tris-HCl 0.05M pH 7.2

### Reactivo de DNS

Se toman 0.5 ml de la solución enzimática y 0.5 ml del sustrato (CMC) se mezclan e incuban 3 min a 50°C. La reacción se detiene por la adición de 3 ml del reactivo de DNS. Se continúa con la técnica para la determinación de azúcares reductores. La curva utilizada se realiza con celobiosa y la actividad se reporta como Unidades Internacionales (UI= $\mu\text{mol}$  de celobiosa liberados por mililitro de enzima por minuto).

Un blanco de enzima fué preparado para descartar los azúcares presentes en la muestra y un blanco de sustrato para eliminar la interferencia que pudiera causar la CMC.

### Actividad sobre papel filtro

Se utiliza para la determinación de la actividad del complejo celulasas.

### Reactivos

Solución reguladora Tris-HCl 0.05M pH 7.2

Tiras de papel filtro Whatman #1 de 1 X 6 cm

Reactivo de DNS

Se toma 1 ml de solución enzimática y 1 ml del regulador Tris-HCl se agrega una tira de papel y se incuba durante 30 minutos a 45°C. La reacción se detiene con la adición de 3 ml del reactivo de DNS. Se continua con la técnica para la determinación de azúcares reductores. La curva se realiza con celobiosa y la actividad se reporta como UI ( $\mu\text{mol}$  de celobiosa liberados por mililitro de enzima por minuto).

De igual manera un blanco de enzima y un blanco de sustrato es preparado.

### Actividad de $\beta$ -glucosidasa

#### Reactivos

Solución reguladora Tris-HCl 0.05M pH 7.2

Salicina al 1% en regulador Tris-HCl 0.05M pH 7.2 (J.T. Baker)

Reactivo de DNS

En un tubo de ensaye se colocan 0.5 ml de la solución de salicina y 0.5 ml de la solución enzimática. Se incuba 30 min. a 41 C, se adicionan 3 ml del reactivo de DNS y se continua la técnica para la determinación de azúcares reductores. La curva patrón se realiza con glucosa, reportandose la actividad como  $\mu$ mol de glucosa por mililitro de enzima por minuto.

### Actividad sobre xilana

#### Reactivos

Solución reguladora citratos-fosfatos 0.5M pH 7.0

Xilana al 1% (Sigma)

Reactivo de DNS

1 ml de regulador citratos-fosfatos, 1 ml de xilana y 1 ml de enzima se mezclan e incuban con agitación durante 5 min a

40°C. La reacción se detiene con la adición de 3 ml del reactivo de DNS, se continúa con la técnica de determinación de azúcares reductores. La curva se realiza con xilosa y la actividad se reporta como UI ( $\mu\text{mol}$  de xilosa liberados por mililitro de enzima por minuto).

El blanco de enzima se prepara con 2 ml de regulador y 1 ml de enzima. El blanco de sustrato con 2 ml de regulador y 1 ml de la solución de xilana.

#### Determinación de actividad en placa sobre carboximetil-celulosa

##### Reactivos

Agar bacteriológico  
Carboximetil-celulosa  
Rojo Congo 0.1%  
NaCl 1M  
HCl 1N

Las placas se realizaron con agar al 2% y carboximetil-celulosa al 0.1%.

Se colocan 20 $\mu\text{l}$  del sobrenadante en la superficie del agar y se incuban durante 1 h. a 50 C.

Para el revelado se cubre la placa con rojo congo durante 15 min., se lava otros 15 min. con NaCl y finalmente se vira a azul con HCl. La actividad se denota por zonas claras que contrastan con el fondo azul (Teather, et al. 1982).



## RESULTADOS

## Localización de las enzimas

Para determinar la localización de las enzimas se midió actividad de  $\beta$ -glucosidasa, endoglucanasa, xilanasas y sobre papel filtro, tanto en el sobrenadante como en las células lavadas. En todos los casos excepto  $\beta$ -glucosidasa la actividad detectada se encontró mayoritariamente en el sobrenadante y en las células intactas apenas se registró alrededor del 1% de la actividad total. La actividad de  $\beta$ -glucosidasa no se detectó en ninguna fracción. Observándose este comportamiento en todas las fuentes de carbono probadas (Tabla 7 y 8) por lo que sólo se muestran las cinéticas de producción de enzimas excretadas.

## Inducción

Se desarrolló a *Cellulomonas flavigena* en los sustratos probados como inductores obteniéndose lo siguiente:

### a) Bagazo de caña

En las pruebas de crecimiento la correlación

turbidez-peso seco del cultivo desarrollado en bagazo de caña, mostro variaciones con respecto a lo esperado dada la concentración de proteína encontrada, por esta razón, todos los resultados de crecimiento se expresaron como proteína celular para que pudieran ser comparables entre los diferentes sustratos.

Se probaron dos concentraciones de bagazo de caña como inductor, 0.5% y 1%. El crecimiento que se obtuvo en estas condiciones se muestra en la Fig. 4. Como se puede observar cuando la concentración fue del 0.5% se tuvo un periodo de adaptación de 20 h y una fase exponencial con una velocidad específica de crecimiento de  $0.10 \text{ h}^{-1}$ . Mientras que en bagazo de caña al 1%, el cultivo mostró dos fases de crecimiento; la primera comprendida entre las 10 y 24 h con una  $\mu=0.11 \text{ h}^{-1}$  y la segunda con una  $\mu=0.009 \text{ h}^{-1}$ , a esta concentración de sustrato la fase lag fué notoriamente menor (10 h).

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) del cultivo se determinó graficando el logaritmo natural de la concentración celular (g/l) contra la edad del cultivo (h), ajustándose las rectas por el método de regresión lineal, siendo para todas las pruebas  $r^2 > 0.98$ .

Las curvas de actividad de endoglucanasa siguieron un comportamiento semejante a las curvas de crecimiento en las dos concentraciones de sustrato probadas, mientras que la actividad

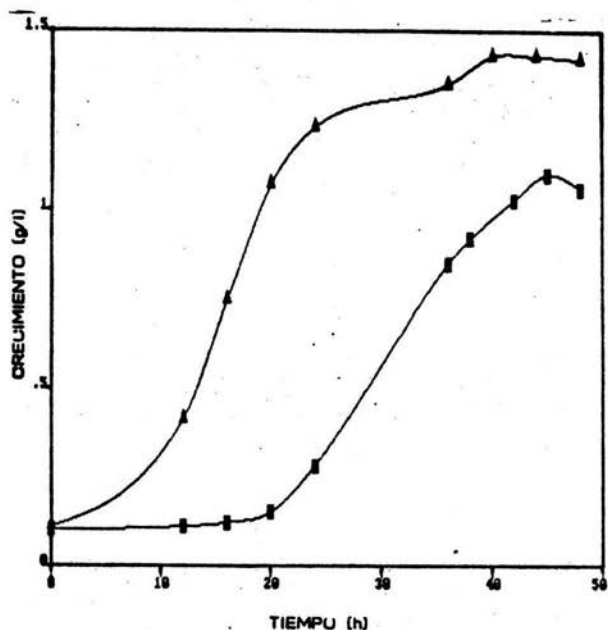


Fig. 4. Cinética de crecimiento de *C. flavigena* en bagazo de caña.

▲ 1%, ■ 0.5%

Cada punto es promedio de dos o tres experimentos.

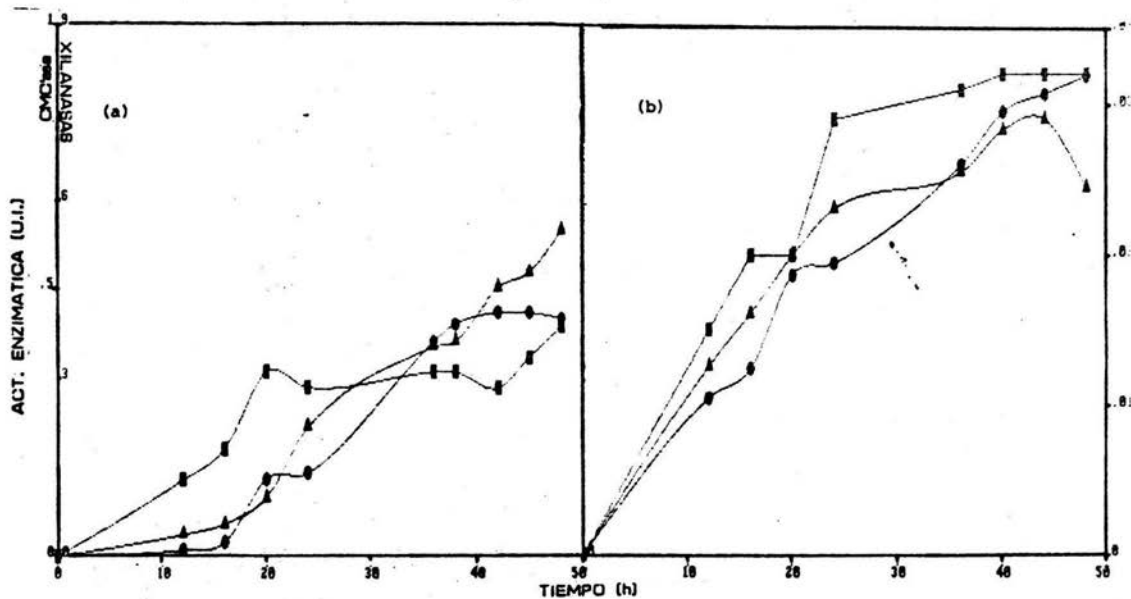


Fig. 5. Cinética de producción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas de *C. flavigena* en bagazo de caña. (a) 0.5% y (b) 1%. ▲ actividad sobre CMC, ■ actividad sobre P.F. ● xilanasas.

sobre papel filtro se encontró en el medio desde el inicio de la fermentación (Fig. 5). En el caso de actividad xilanolítica, si bien parece, seguir un comportamiento asociado al crecimiento, su semejanza con la curva de crecimiento no es tan marcada como en el caso de la endoglucanasa.

Las actividades máximas y específicas de cada enzima se resumen en la Tabla 8. Como era de esperarse, el crecimiento y las actividades enzimáticas fueron proporcionales a la concentración de sustrato.

En estos experimentos no se observó acumulación de azúcares reductores en el medio, siendo 0.6 g/l el máximo valor encontrado en bagazo de caña al 1% y de 0.3 g/l en bagazo de caña al 0.5%.

#### b) Lactosa

Cuando se usó lactosa como inductor, también se probaron dos concentraciones, 0.2 y 0.5% p/v. En ambas condiciones las cinéticas de crecimiento fueron muy semejantes (Fig 6), observándose una fase lag de 24 h y una fase exponencial con una velocidad específica de crecimiento de  $0.04 \text{ h}^{-1}$ . Cabe hacer notar la baja concentración de proteína celular a la que se llegó, alcanzándose 0.29 g/l y 0.32 g/l para 2% y 5% de lactosa

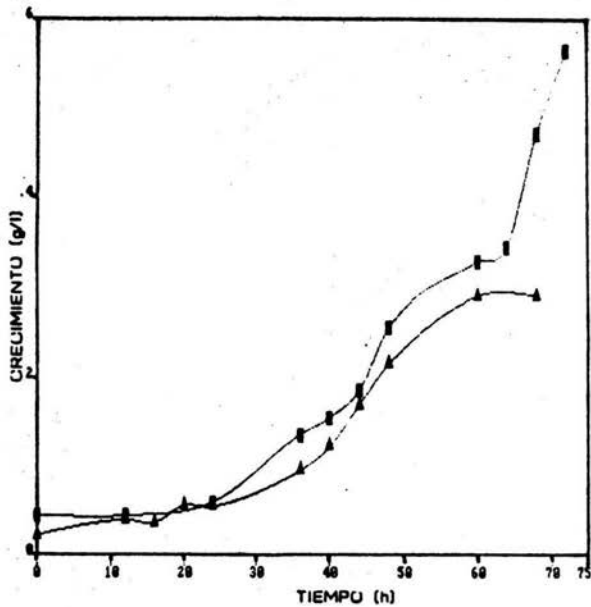


Fig. 6. Cinética de crecimiento de C. flavigena en lactosa  
 ▲ 0.2% ■ 0.5%

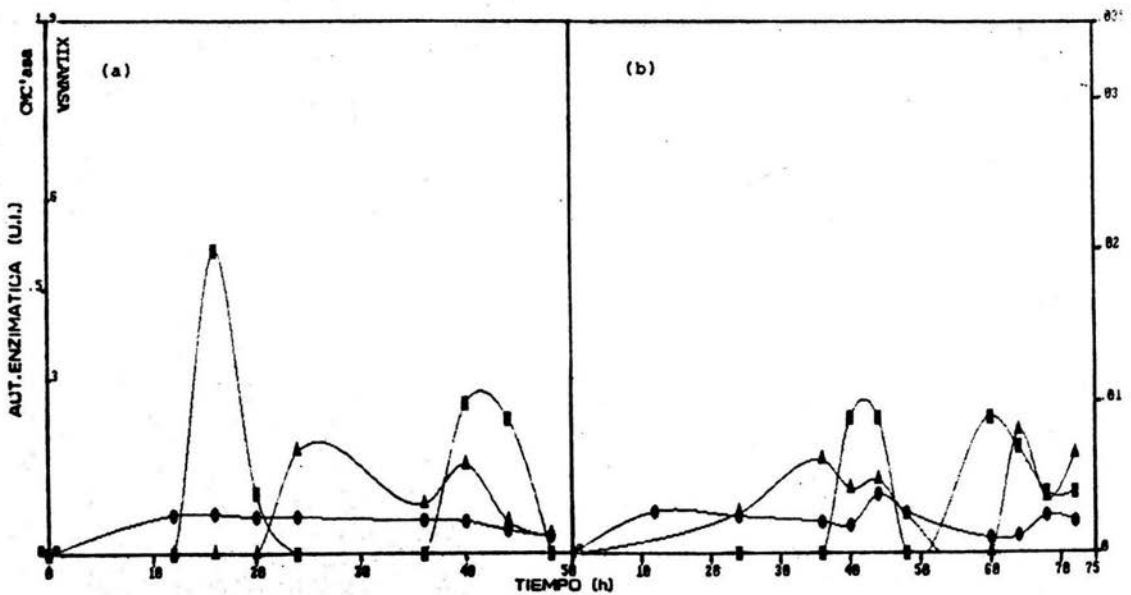


Fig. 7. Producción de actividades xilanolíticas y celulolíticas por C. flavigena durante su crecimiento en lactosa: (a) 0.2% y (b) 0.5%.  
 ▲ actividad sobre CMC, ■ actividad sobre P.F., ● Xilanasas.

respectivamente.

Los resultados de actividad se muestran en la Figura 7. La actividad sobre CMC (en las dos concentraciones de lactosa probadas) se registró hasta las 24 h; su comportamiento fue irregular por lo que se separó de la curva de crecimiento, sin embargo, sí se pudo observar que la producción se inicia con el crecimiento.

La actividad sobre papel filtro muestra, a ambas concentraciones de lactosa dos picos que aunque similares tienen desplazamiento en el tiempo, esto es, en lactosa al 0.2% se presentó a las 16 y 48 h, mientras que en lactosa al 0.5% a las 44 y 60 h. Por otro lado la actividad máxima con lactosa al 0.2% fue de 0.020 U.I., el doble de la encontrada en lactosa al 0.5% (0.009) (Tabla 8).

La actividad de xilanasas fue muy baja en este sustrato y se mantuvo constante prácticamente a lo largo de toda la fermentación en las dos concentraciones usadas.

#### c) Celobiosa

Con este sustrato se probaron concentraciones bajas pero de tal manera que fueran capaces de soportar el crecimiento

celular. Se encontró que el desarrollo se inició en la mitad del tiempo cuando se tenía el doble de sustrato, al menos para las cantidades que se probaron, es decir, en 24 h para 0.1% y 12 h para 0.2% (Fig. 8), sin embargo, la velocidad específica de crecimiento mostró un comportamiento inverso, es decir, fue de  $0.14 \text{ h}^{-1}$  y  $0.08 \text{ h}^{-1}$  respectivamente (Tabla 6).

La producción de endoglucanasa en este sustrato fue en apariencia muy pobre, ya que el máximo encontrado fue de 0.10 U.I. en celobiosa al 0.1%, sin embargo, tomando en cuenta el bajo crecimiento dado por la poca cantidad de sustrato suministrado la actividad específica en celobiosa al 0.1% fue muy alta (1.45 U.I./mg de proteína celular).

En el caso de la actividad sobre papel filtro, en la Fig. 9 se observa que el comportamiento inicial de la curva de producción de enzimas fue muy similar al que se dio en celulosa, sin embargo, la actividad decayó rápidamente después de las 24 y 16 h para celobiosa 0.1% y 0.2% respectivamente, coincidiendo con el comienzo de la fase exponencial del crecimiento del cultivo. La actividad específica que se encontró en celobiosa al 0.1% fue la mejor de todos los sustratos probados (Tabla 8).

Las xilanasas se presentaron también con una alta actividad específica (17.83 U.I./mg de proteína celular) al desarrollar a *C. flavigena* en celobiosa al 0.1% y al igual que las



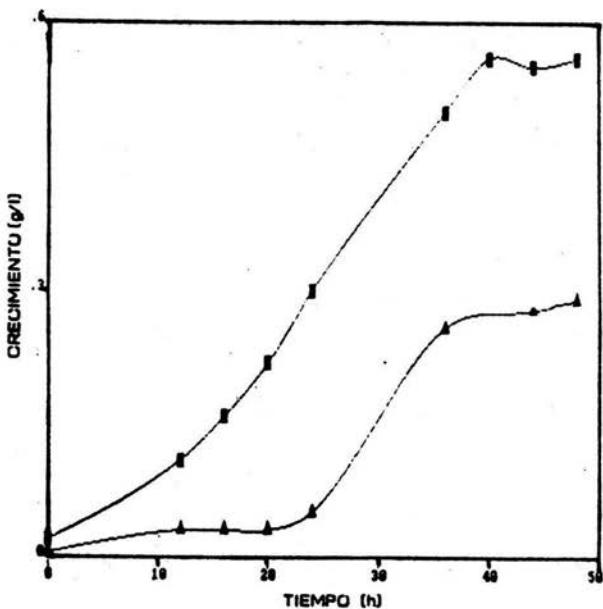


Fig. 8. Curva de crecimiento de C. flavigena en celobiososa:

▲ 0.1% ■ 0.2%

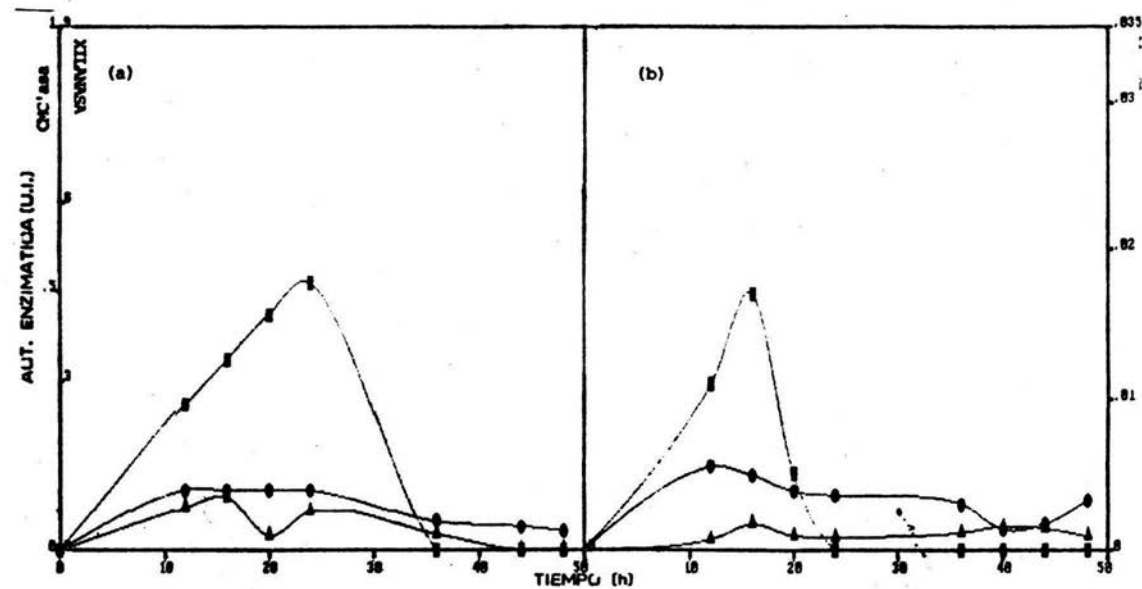


Fig. 9. Cinética de producción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas de C. flavigena en celobiososa: (a) 0.1% y (b) 0.2%. ▲ actividad sobre CMC, ■ actividad sobre P.F. ● xilanasas.

celulasas la actividad específica disminuyó considerablemente al aumentar la concentración del sustrato (4.07 U.I./mg de proteína celular en celobiosa al 0.2%).

### Represión

Como sustratos represores se probaron glucosa a tres concentraciones: 0.2, 0.5 y 1.0% p/v y glicerol al 0.2 y 0.5% v/v; los resultados encontrados fueron los siguientes:

#### a) Glucosa

La velocidad específica de crecimiento de *Cellulomonas flavigena* creciendo en glucosa fue igual cuando este azúcar se encontraba al 0.5 y 1%, y fue ligeramente menor cuando se usó una concentración del 0.2% (Tabla 6). La fase exponencial se inició en menor tiempo conforme se aumentó la concentración del sustrato (Fig. 10). En el caso de glucosa a una concentración de 2 g/l la fase exponencial del crecimiento se inició hasta después de 20 h de inoculado el fermentador alcanzándose un crecimiento de 0.65 g/l a las 30 h. Al aumentar la concentración a 5 g/l se redujo la fase lag y el crecimiento se inició a las 12 h alcanzándose a las

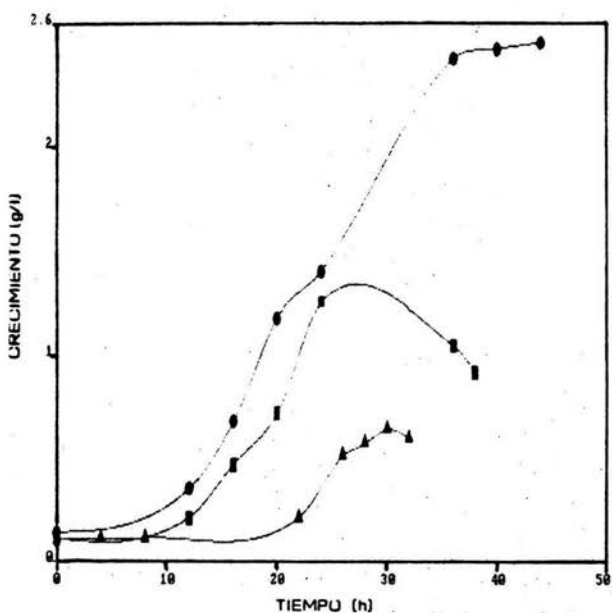


Fig. 10. Curva de crecimiento de C. flavigena en glucosa:

0.2%, 0.5%, 1%.

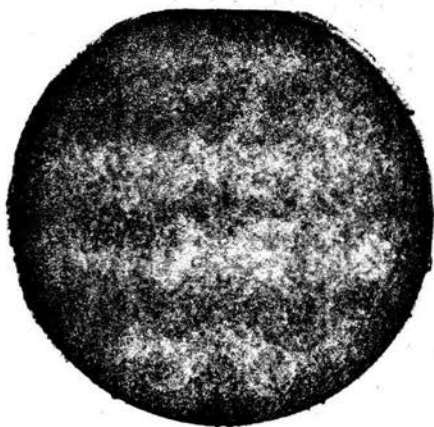
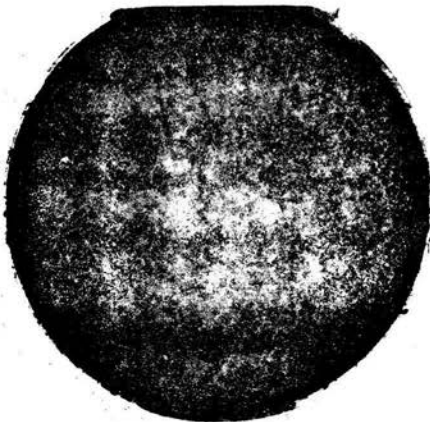


Fig. 11.

- 1) Actividad sobre placas de CMC de un extracto enzimático producido por C. flavigena al crecer en bagazo de caña al 1%.



2) Actividad en placas de CMC durante el desarrollo de C. flavigena en glucosa al 0.5%.



3) Actividad en placas de CMC durante el desarrollo de C. flavigena en glucosa al 1%.

24 h la máxima concentración de proteína celular en 0.85 g/l. Para glucosa al 1% la fase de adaptación disminuyó aún más y se obtuvieron 2.51 g de proteína celular por litro alrededor de las 40 h. El desarrollo de los cultivos se detuvo y decreció cuando la cantidad de glucosa en el medio llegó a ser menor de 0.1 g/l; presentándose esta concentración a las 28, 24 y 44 horas para el 0.2, 0.5 y 1% respectivamente.

Se tuvieron problemas en la determinación de actividad enzimática en estas muestras debido a la presencia del sustrato que causaba interferencia. Para eliminarla se probaron varias técnicas:

Primeramente se intentó eliminar la glucosa residual dializando las muestras en membranas de colodión a baja temperatura (4°C) contra regulador Tris-HCl 0.05M pH 7. Se realizaron las determinaciones de actividad tanto al líquido contenido en la membrana como al exterior, pero no se encontró actividad, por lo que se presume las enzimas se absorbieron a la membrana que es de celulosa. Para evitar esta absorción se trató de inactivar las enzimas bajando el pH del medio hasta 5 pero igualmente no se registró actividad.

Se probó precipitar las enzimas con acetona en una relación 3 a 1, pero se tuvo una pérdida hasta del 70% en actividad y del 30% en proteína, no siendo reproducibles los resultados.

Finalmente se optó por tener una medición cualitativa, por lo menos en la actividad de endoglucanasa (esto se realizó a través de placas de CMC como se indicó en materiales y métodos). Como se observa en la Fig. 11 se alcanzó a detectar actividad en el cultivo con glucosa al 0.5% pero al 1% ésta fué completamente reprimida.

#### b) Glicerol

Para las dos concentraciones de glicerol probadas (0.2 y 0.5%) se encontró que los crecimientos en la fase exponencial mostraron la misma  $\mu=0.10 \text{ h}^{-1}$  (Fig. 12), alcanzándose 0.9 y 1.97 g/l de proteína celular para 0.2 y 0.5% de glicerol respectivamente.

La actividad de celulasas, (tanto la medida sobre papel filtro como sobre CMC) apenas se alcanzó a detectar cuando *C. flavigena* se hizo crecer en glicerol. Como se observa en la Fig. 13 la actividad sobre CMC apenas muestra diferencias en las dos concentraciones de sustrato utilizadas, los máximos a los que se llegó fueron de 0.09 y 0.12 U.I. para glicerol al 0.2 y 0.5% respectivamente. En el caso de papel filtro la actividad se presentó posteriormente cuando la concentración del sustrato se aumentó siendo las máximas actividades encontradas 0.003 y 0.004 U.I.

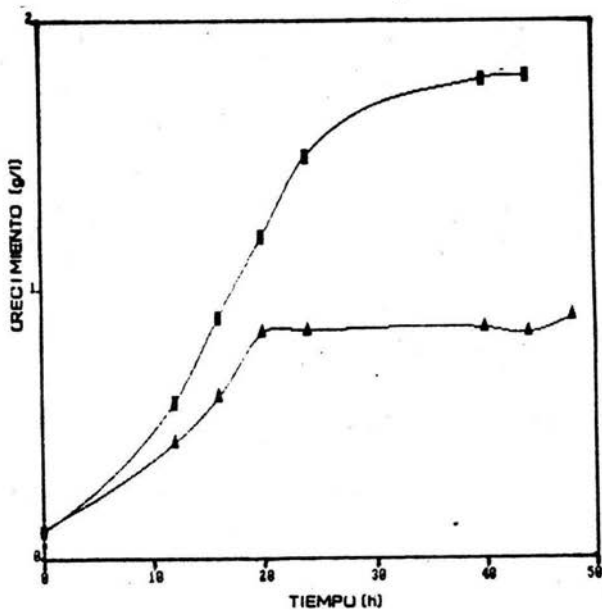


Fig. 12. Cinética de crecimiento de *C. flavígena* en glicerol:

▲ 0.2% y ■ 0.5%

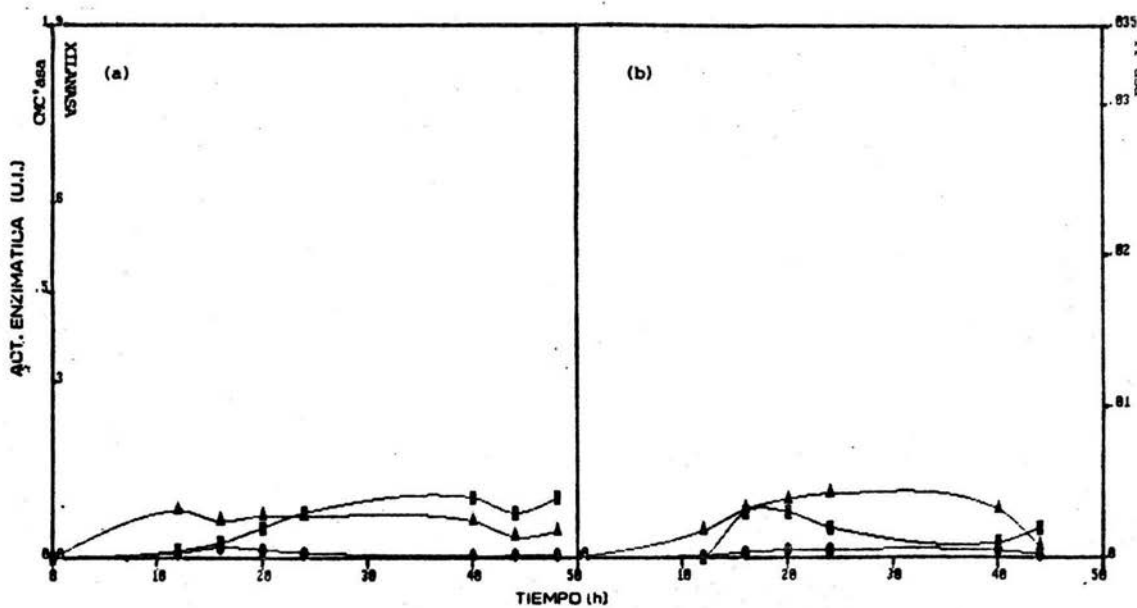


Fig. 13. Producción de actividades xilanolíticas y celulolíticas por *C. flavígena* durante su crecimiento en glicerol: (a) 0.2% y (b) 0.5%.  
 ▲ actividad sobre CMC, ■ actividad sobre P.F., ● xilanasas.

El efecto de este sustrato en las xilanasas fue más evidente, ya que la actividad de estas enzimas disminuyó hasta en un 98% en comparación a la encontrada en bagazo de caña al 1%, los valores máximos apenas alcanzaron a ser de 0.17 y 0.14 U.I. para 0.2 y 0.5% de glicerol

c) Efecto de la adición de glicerol a un cultivo creciendo en bagazo de caña

Al añadir glicerol a una concentración final del 0.2 y 0.5% en la mitad de la fase exponencial a un cultivo desarrollado en bagazo de caña al 1% se dió un decremento en la concentración de proteína celular (Fig 14), disminuyendo a 0.2 g/l después de una hora de la adición para las dos concentraciones de glicerol probadas. 10 horas después el cultivo al que se le agregó glicerol al 0.5% se recuperó y empezó a crecer hasta llegar a un máximo de 2.17 g/l de proteína celular, mientras que, el cultivo con glicerol al 0.2% se mantuvo oscilando alrededor de 0.4 g/l alcanzando el máximo crecimiento a las 64 horas siendo de 0.55 g/l. de proteína celular.

En las Figuras 15, 16 y 17 se puede observar que al añadir glicerol a una concentración final de 0.2% se dió una disminución inmediata en las tres actividades probadas. La actividad sobre CMC bajó de 0.4 a 0.32 U.I. manteniéndose



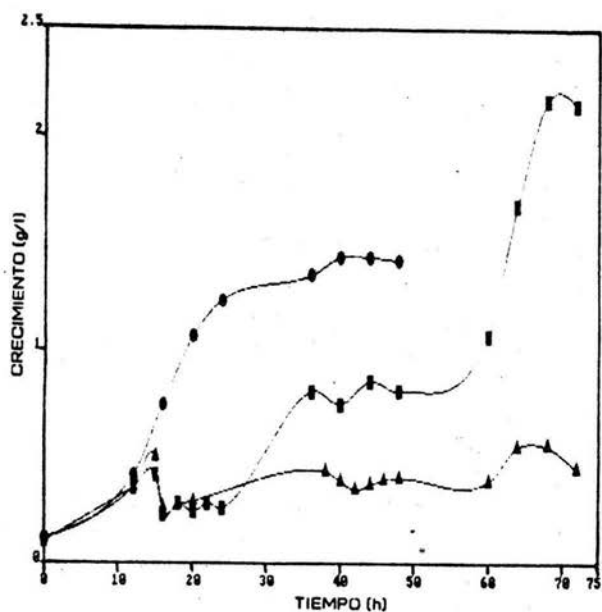


Fig. 14. Efecto de la adición de glicerol sobre el crecimiento de un cultivo de *C. flavigena* desarrollado en bagazo de caña:

- bagazo de caña 1%
- ▲ B. C. y glicerol 0.2%
- B. C. y glicerol 0.5%

\*Después de 15 horas de crecimiento en bagazo de caña se adicionó el glicerol, realizándose la primera medición 1 hora después.

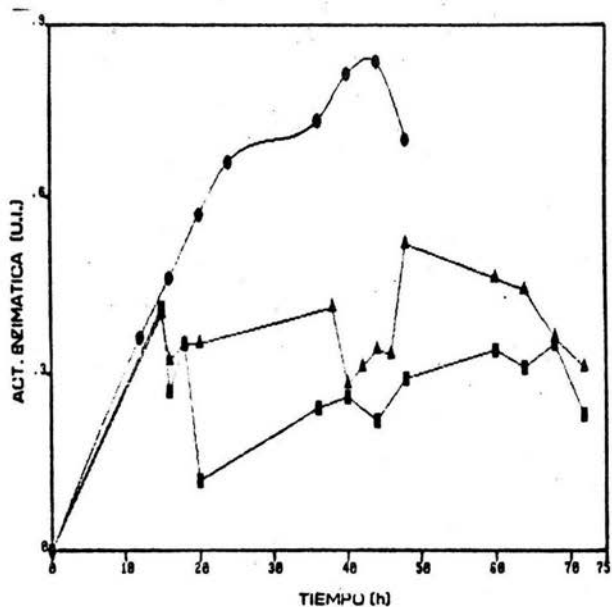


Fig. 15 Efecto del glicerol en la actividad de endoglucanasa inducida en bagazo de caña al 1%:

- bagazo de caña 1%
- ▲ B. C. y glicerol 0.2%
- B. C. y glicerol 0.5%

\*El glicerol se adicionó a las 15 horas y la primera medición de actividad se realizó 1 hora después.

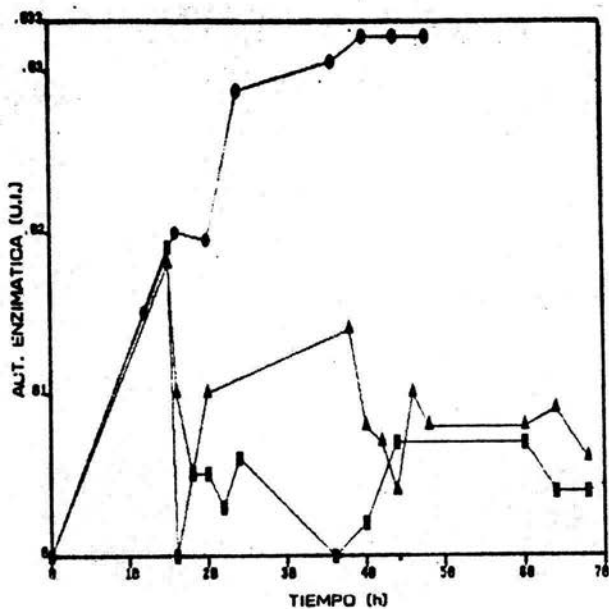


Fig. 16. Efecto del glicerol en la actividad sobre papel filtro inducida en bagazo de caña al 1%.

- bagazo de caña 1%
- ▲ B. C. y glicerol 0.2%
- B. C. y glicerol 0.5%

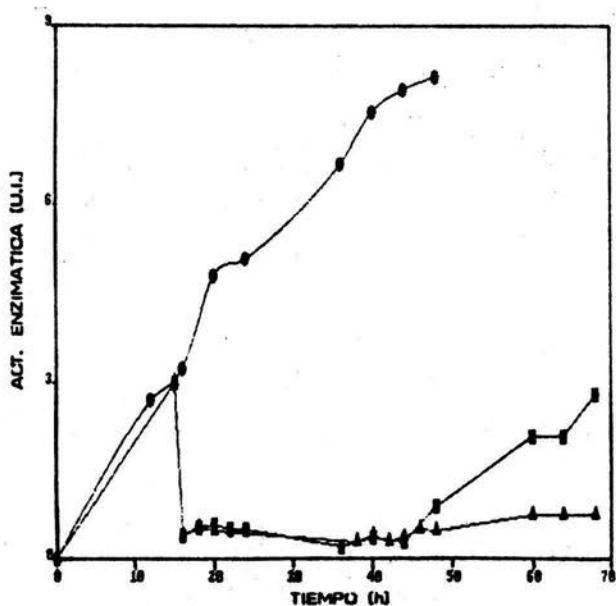


Fig. 17. Efecto del glicerol en la actividad de xilanasas excretada por un cultivo de *C. flavigena* desarrollado en bagazo de caña al 1%.

- bagazo de caña 1%
- ▲ B. C. y glicerol 0.2%
- B. C. y glicerol 0.5%

alrededor de este valor durante las 55 horas posteriores; en este lapso de tiempo no se encontró que el sistema se repusiera al efecto del glicerol aunque la actividad específica se mantuvo constante alrededor de 0.9 U.I./g proteína celular. La actividad sobre papel filtro disminuyó de 0.018 a 0.010 U.I. en el lapso de una hora y disminuyó nuevamente a la mitad en las dos horas posteriores, manteniéndose esta actividad alrededor de 0.01 U.I. La actividad de xilanasas cayó drásticamente de 3 a 0.38 U.I. siendo ésta la actividad más afectada por esta concentración de glicerol.

Al añadir glicerol a una concentración final del 0.5% las actividades se vieron mayormente afectadas disminuyendo la endoglucanasa hasta 0.27 U.I. en una hora y 0.1 U.I. a las tres horas de la adición. La actividad sobre papel filtro no se detectó una hora después de la aplicación y a pesar que se recuperó el cultivo ésta nunca pasó de 0.007 U.I. La actividad xilanolítica mostró el mismo comportamiento que el encontrado cuando se le añadió glicerol a una concentración menor, al menos hasta las 44 horas, punto en el que el cultivo con glicerol al 0.5% se recuperó y empezó a presentar actividad llegando a un máximo de 2.78 U.I.

TABLA 6. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de *Cellulomonas flavigena*

Sustrato	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	T.D. (h)	Crec. Max. (g prot/l)
Bagazo de caña 0.5%	0.10	6:51	1.10
Bagazo de caña 1.0%	0.11	6:14	1.43
Lactosa 0.2%	0.05	14:47	0.29
Lactosa 0.5%	0.04	16:07	0.33
Celobiosa 0.1%	0.14	4:57	0.29
Celobiosa 0.2%	0.08	8:40	0.56
Glicerol 0.2%	0.10	6:55	0.90
Glicerol 0.5%	0.10	6:55	1.97
Glucosa 0.2%	0.14	4:57	0.65
Glucosa 0.5%	0.15	4:37	1.25
Glucosa 1.0%	0.15	4:37	2.51

TABLA 7. Actividad de celulasas y xilanasas unida a células de *Cellulomonas flavigena* crecida en diferentes sustratos.

Sustrato	Actividad específica (U.I./mg prot. celular)			
	CMC'asa	P.F.'asa	$\beta$ -glucosidasa	Xilanasas
Bagazo de caña 0.5%	0.005	--	--	0.04
Bagazo de caña 1.0%	0.006	--	--	0.05
Lactosa 0.2%	0.004	--	N.D.	0.07
Lactosa 0.5%	0.004	--	N.D.	0.05
Celobiosa 0.1%	0.006	--	--	0.12
Celobiosa 0.2%	0.005	--	--	0.04
Glicerol 0.2%	<0.001	--	N.D.	0.01
Glicerol 0.5%	<0.001	--	N.D.	0.01
Glucosa 0.2%	<0.001	--	--	--
Glucosa 0.5%	<0.001	--	--	--
Glucosa 1.0%	<0.001	--	--	--

-- No se encontro actividad

N.D. No se determinó.

Las células fueron lavadas tres veces en regulador Tris-HCl 0.05M pH 7.2 antes de las mediciones de actividad.

TABLE 8. Actividades de celulasas y xilanasas excretadas por *Cellulomonas flavigena* en diferentes fuentes de carbono.

Sustrato	Enzima							
	CMC <sup>a</sup> asa		P.F. <sup>a</sup> asa		$\beta$ -glucosidasa		Xilanasas	
	Act. Max. U.I.	Act. Esp. UI/mg *	Act. Max. U.I.	Act. Esp. UI/mg *	Act. Max. U.I.	Act. Esp. UI/mg *	Act. Max. U.I.	Act. Esp. UI/mg
B.C. 0.5%	0.61	0.54	0.015	0.32	--	---	4.12	4.09
B.C. 1.0%	0.83	0.59	0.032	0.24	--	---	8.16	5.13
Lac. 0.2%	0.19	1.29	0.020	0.19	N.D.	N.D.	0.68	9.19
Lac. 0.5%	0.18	0.82	0.009	0.03	N.D.	N.D.	1.00	4.37
Cel. 0.1%	0.10	1.45	0.012	0.40	--	---	1.04	17.83
Cel. 0.2%	0.05	0.12	0.017	0.07	--	---	1.42	4.07
Gl. 0.2%	0.09	0.10	0.004	0.003	N.D.	N.D.	0.17	0.13
Gl. 0.5%	0.12	0.07	0.003	0.002	N.D.	N.D.	0.14	0.08

\* Act. Esp. Actividad específica; la relación se encuentra dada en base a los mg de proteína celular

N.D. No determinada.

--- No se registro actividad.

## DISCUSSION

## Efecto del sustrato en el crecimiento

Como ya se mencionó, los resultados referidos a crecimiento se presentaron como proteína celular dado que la correlación turbidez-peso seco en bagazo de caña mostró variaciones respecto a lo esperado. Estas diferencias se atribuyen a dos factores: El primero sería el bagazo residual que alcanza a pasar a través del filtro causando interferencia en una prueba turbidimétrica y el segundo se debería al cambio conformacional que se presenta en las células de *Cellulomonas* en función del sustrato en el que se desarrollan. Vladut-Talor, et al, (1986) encontraron la presencia de una cubierta que se desarrollaba cuando *C. flavigena* crecía en celulosa y desaparecía al desarrollarla en otra fuente de carbono; este hecho podría causar cambios en la densidad óptica por lo que el método mencionado sólo se utilizó para hacer seguimientos del cultivo.

De los sustratos probados la mayor velocidad de crecimiento se encontró en glucosa, seguida por celobiosa, bagazo de caña, glicerol y lactosa. Exceptuando glicerol, los demás sustratos mostraron fases lag más largas a las encontradas en glucosa. Este comportamiento es atribuible a la inducibilidad de las enzimas involucradas en la utilización de estos sustratos



(lactosa, celobiosa y bagazo de caña) y al caracter constitutivo de la glucoquinasa que se presenta en *Cellulomonas* (Schmiz, et al, 1983) para el consumo de glucosa.

Cuando *C. flavigena* creció en bagazo de caña al 1% presentó dos periodos de crecimiento, éste comportamiento ha sido reportado con anterioridad, (Ponce-Noyola, 1982, De la Torre, 1981). Rodríguez y Volfoa (1984) atribuyeron el crecimiento diaúxico de una cepa de *Cellulomonas* sp II bc creciendo en el mismo residuo a la utilización temprana de las hemicelulosas y posteriormente de la celulosa.

Al comparar las Figs. 4 y 5 fue notoria la similitud entre las curvas de crecimiento y la de producción de endoglucanasas y xilanasas, lo que indicaría que estas enzimas están asociadas al crecimiento (Mes-Hartre, et al, 1988; Farkas, et al, 1987; Stoppok, et al, 1982; Schaffeld & Ulanes, 1983). Dado que la actividad de endoglucanasas y xilanasas se presenta desde el inicio del crecimiento y a lo largo de toda la fase exponencial del desarrollo, es difícil pensar que como en el caso de Rodríguez y Volfoa (1984) sólo se aprovechen en un principio hemicelulosas. Al parecer se dá un aprovechamiento integral de ambos polímeros (hemicelulosa y celulosa) y la disminución del crecimiento se presentaría por el agotamiento de algún recurso que se puso nuevamente en disposición al morir algunas células. El comportamiento diaúxico no se observó en bagazo de caña al 0.5%

pero, como era de esperarse la concentración celular que se alcanzó fue menor.

El caso de celobiosa fue diferente, ésta ha sido reportada como un sustrato donde el genero *Cellulomonas* crece muy bien, tanto en condiciones aerobias (Stoppok, et al, 1982; Beguin et al, 1977) como anaerobias (Dermoun & Belaich, 1988), siendo este crecimiento en ocasiones mejor que en glucosa (Bagnara, et al, 1987). Los resultados muestran que a una concentración de 1 g/l la velocidad específica de crecimiento es igual a la encontrada en glucosa (Tabla 6) y al aumentar la cantidad de celobiosa en el medio la velocidad de crecimiento disminuye, lo que indicaría que concentraciones de celobiosa superiores a 2 g/l inhiben el crecimiento, lo cual podría entenderse si este azúcar actuara como represor del sistema celulolítico (Stoppok, et al, 1982, Beguin, et al, 1977) y se limitara la degradación de celobiosa por este sistema.

Cuando *C. flavigena* se desarrolló en lactosa en concentraciones iniciales de 2 y 5 g/l el crecimiento tuvo un comportamiento diferente y la concentración de proteína celular a la que se llegó fué apenas la tercera parte de la obtenida en otros sustratos, este crecimiento tan bajo fué encontrado también por Stoppok, et al, (1982) para organismos del género *Cellulomonas*. En la Fig. 6 se observa que la primera etapa del crecimiento se presenta como una fase lag muy larga, en donde se

alternan periodos de crecimiento con periodos en los que no lo hay. Este comportamiento ha sido reportado anteriormente por Knorre (1968), quien atribuyó estas oscilaciones a interacciones en el operón lac, entre glucosa como represor y alolactosa como inductor. Posteriormente West & Page (1984) resaltaron como un aspecto importante el transporte pasivo de lactosa a través de la membrana, y encontraron que la difusión de la lactosa se ve limitada cuando la concentración de ésta en el medio es de alrededor de 0.05 g/l. Dado que en el presente estudio la menor concentración inicial que se utilizó fue de 2 g/l, no podría ser ésta la limitante en el crecimiento. Straight & Ramkrishna (1989) al encontrar este crecimiento irregular concluyen que la energía utilizada en el transporte activo compete con la necesaria para el crecimiento, así, se produciría una limitación de energía en la célula y el crecimiento ocurriría alternativamente con el mantenimiento del proceso para tener una ambiente intracelular favorable.

Finalmente es importante señalar que en todos los sustratos probados, cuando se tenía una concentración baja del nutriente se aumentaba la duración de la fase lag, hecho que sugiere que el sustrato no podía ser transportado hacia la célula a una velocidad lo suficientemente rápida como para satisfacer todas las demandas metabólicas.

## Localización de las enzimas

Los resultados mostrados en las tablas 7 y 8 muestran que las endoglucanasas y exoglucanasas de *C. flavigena* son excretadas al medio, ya que en las células se presentó menos del 1% de la actividad encontrada en el cultivo total. Esta baja actividad en la célula podría ser considerada como un nivel basal.

Esto ha sido encontrado en la generalidad de los organismos celulolíticos; es el caso de las endoglucanasas y celobiohidrolasas de hongos como *Trichoderma reesei* (Bisaria y Mishra, 1989; Hengspiel, et al. 1989; Stutzenberger, 1985) *Neurospora crassa* (Macris, et al, 1989); *Aspergillus nidulans* (Bagga, et al 1989); *Aspergillus japonicus* (Sanyal, et al, 1988), etc.

Rodríguez y Volfoa (1984) reportan en *Cellulomonas/sp II* actividad sobre CMC y papel filtro que se encuentra unida a la célula; alcanzando a ser de 0.2 U.I. para CMC y de 0.05 U.I. para papel filtro, sin embargo, sus mediciones de actividad no fueron obtenidas de manera directa sobre las células lavadas, sino por diferencia entre la actividad total menos la actividad del sobrenadante, sin tomar en cuenta la actividad unida al bagazo.

La  $\beta$ -glucosidasa no se encontró en el sobrenadante ni en células intactas. Como ha sido reportado antes para el género

*Cellulomonas* esta enzima es intracelular (Stoppok, et al, 1982; Beguin & Eisen, 1977).

Dado que las celulasas son un complejo enzimático, no se sabe con exactitud en que orden aparecen en el medio de cultivo. Sanyal, et al (1988) y Larios, et al, (1983) encontraron que la actividad sobre CMC y papel filtro se dan simultaneamente en los géneros *Aspergillus* y *Aureobasidium*. Farkas y col (1987) encontraron en *Trichoderma* que la actividad sobre CMC antecedió a la de papel filtro, sin embargo, Kawamori, et al, (1987) encontraron un comportamiento inverso en *Termonascus*.

Para microorganismos del género *Cellulomonas*, Rodríguez y Volfoa (1984) encontraron primero actividad sobre CMC y posteriormente sobre papel filtro, por otro lado Vladut-Talor, et al, (1986) encontraron las dos actividades simultaneamente.

Observando las Figs. 5, 7, 9 y 13 se notará que en todos los sustratos ambas actividades se presentaron simultaneamente, aunque siempre en mayor proporción la endoglucanasa, excepto en el caso de lactosa, donde las enzimas se presentaron desordenadamente, debido quizá al crecimiento tan irregular que se dió en este sustrato.

## Biosíntesis de celulasas

### Inducción

Observando los resultados experimentales, se encontró que la máxima actividad de celulasas y xilanasas se dió en bagaza de caña (celulosa), su inductor natural, siendo la actividad de endoglucanasa en otros sustratos alrededor de la quinta parte; la actividad de papel filtro en otras fuentes de carbono disminuyó de un 50% a un 90% y de xilanasas hasta un 98%. Sin embargo, dado que los crecimientos fueron diferentes en cada sustrato, se compararon las actividades específicas (UI/mg proteína celular) donde se observó que tanto para celulasas como para xilanasas el valor más alta se presentó cuando la celobiosa se usó como inductor a una concentración de 1 g/l. Diversos autores han reportado que celobiosa a bajas concentraciones tiene un efecto inductor y que en concentraciones altas reprimen el sistema celulolítico. Stoppak, et al. (1982) observaron que la celobiosa en concentraciones entre 0.1 y 0.3 g/l tenían un efecto inductor en el sistema de *Cellulomonas uda* y cocentraciones por arriba de 0.35 g/l la reprimían. Stewart y Leatherwood (1976) encontraron en *Cellulomonas sp* este mismo comportamiento, con inducción de celulasas en concentraciones menores de 0.5 g/l y represión con valores mayores. Los resultados del presente trabajo muestran que la actividad de celulasas en *Cellulomonas flavigena* depende de la concentración inicial de celobiosa. En el caso de endoglucanasas

la actividad que se presentó con una concentración inicial del azúcar de 1g/l fue de 1.45 UI/mg de proteína celular y al ser la concentración inicial de 2.g/l la actividad alcanzó sólo 0.12 UI/mg de proteína celular. Lo mismo sucedió en el caso de la actividad sobre papel filtro y la de xilanasas (Tabla 8). Todo esto indica que en bajas concentraciones la celobiosa puede ser el inductor natural de la síntesis del sistema celulolítico, lo cual resulta lógico al ser ésta producto de la degradación de la celulosa (Yaguie, et al. 1988; Stutzenberger, 1985; Zhu, et al. 1988).

En celobiosa se pueden destacar otros dos puntos importantes: la actividad sobre papel filtro se ve inducida de manera muy semejante a como ocurre en bagazo de caña pero cae drásticamente cuando la concentración de celobiosa en el medio disminuye de 0.8 g/l a 0.05 g/l o menos, situación dada en la fase exponencial del cultivo. El segundo punto es que la actividad de endoglucanasa no aumenta en el medio a lo largo de la fermentación; dos criterios podrían ser aplicados para dar una explicación:

- 1) Si el modelo de biosíntesis de celulasas es un operón, como se ha propuesto (Stutzenberger, 1985), las proteínas serían inducidas en coordinación y la actividad de endoglucanasa estaría siendo inhibida por la celobiosa del medio.

2) Si las enzimas no se inducen conjuntamente, la celobiosa sería el inductor de las enzimas que permiten la degradación del papel filtro y no de las endoglucanasas.

Otra consideración importante es la alta actividad específica encontrada en lactosa, la cual se presenta pese al bajo crecimiento; este sustrato, aún cuando ha sido probado en diferentes bacterias (Stoppok, et al, 1982; Yanane, et al, 1970) sólo había sido reportado como inductor en algunos hongos del género *Trichoderma* (Mes-Hartre, 1988; Kawamori, 1987; Farkas, 1987; Zhu, et al, 1982). En este sustrato aparentemente el cultivo encuentra limitación de carbono y este hecho ha sido sugerido (Stutzenberger, 1985) como causa de la expresión de los genes de celulasas

### Represión

Aún cuando los crecimientos en glucosa y glicerol son muy buenos, la actividad celulolítica encontrada al utilizar estas fuentes de carbono es muy baja.

Como se mencionó en los resultados al desarrollar en glucosa la determinación usual de actividad utilizando el sustrato para la enzima y el método del DNS para la cuantificación de azúcares o grupos reductores no se pudo emplear, ya que la glucosa



de la muestra causaba interferencia por color al dar reacción positiva al reactivo de DNS y encontrarse además en una alta concentración en el medio, de tal manera que se necesitaba diluir hasta 1 en 50 para caer dentro de los límites de confiabilidad de la prueba lo que ocasionó que si la enzima se encontraba presente no se detectara, optándose finalmente por una determinación cualitativa en la que se observó la completa pérdida de actividad sobre CMC a una concentración del 1% (Fig. 11).

Con anterioridad se había reportado que la actividad celulolítica era muy baja o nula al desarrollar organismos celulolíticos en glucosa (Feeldman, et al, 1988; Stoppok, et al, 1982; Yamane, et al, 1970) y en un análisis transcripcional realizado en *Cellulomonas fimi* (Greenberg, et al, 1987) se detectó que los genes *cenA* y *cex*, que codifican para una endoglucanasa y una exoglucanasa respectivamente, reducían drásticamente su expresión al desarrollarse el microorganismo en este azúcar.

Por otro lado en este trabajo se encontró que al desarrollar a *Cellulomonas flavigena* en glicerol que actividades sobre CMC y papel filtro son apenas el 10% de las encontradas en bagazo de caña al 1% y las xilanasas alcanzan a ser solo el 2%.

Para asegurar que existiera un efecto represor por el sustrato y no se tratase de la ausencia del inductor se añadió glicerol a un cultivo creciendo en bagazo de caña a la mitad de la

fase exponencial; en éste se observó la represión del sistema celulolítico al darse una disminución inmediata de la actividad de endoglucanasa, sin que el sistema se recuperara en las 55 h restantes que duró la fermentación, sin embargo la actividad específica se mantuvo, por lo que aparentemente se paró la síntesis de proteína pero la enzima se mantuvo en el medio.

Este efecto también se observó en la actividad sobre papel filtro, donde la actividad disminuyó un 70% con glicerol al 0.2% y se pierde completamente al adicionar glicerol al 0.5%; aunque la actividad se detecta nuevamente no regresa a los niveles que se tienen en ausencia de represor.

Este efecto dado por glicerol ha sido observado por otros autores tanto en hongos como en bacterias, incluyendo *Cellulomonas* (Greenberg, et al, 1987; Kalra, 1984; Curskey, et al, 1983; Schmitz, et al, 1983; Bequin, et al, 1977) e incluso se menciona que el efecto es muy similar al dado por glucosa (Bagga, et al, 1989).

En el caso de xilanasas aparentemente fueron suficientes 2 g/l de glicerol para reprimir el sistema ya que la adición de glicerol en una concentración de 5 g/l no disminuyó aún más la actividad. La susceptibilidad de las enzimas xilanolíticas a represión catabólica ya había sido reportada utilizando como represor glucosa al 1% (Bertrand, et al, 1989).

Las observaciones anteriores y el hecho de que bajos niveles de endoglucanasas y celobiohidrolasa se presenten aún en los cultivos desarrollados en glicerol (Fig. 9), dan la pauta para establecer un modelo de inducción que se presentaría con la siguiente secuencia de eventos:

- 1) Una degradación de celulosa dada en bajos niveles por las enzimas que presenta *Cellulomonas flavigena* en niveles basales.
- 2) La obtención de celodextrinas y el inductor (celobiosa).
- 3) La inducción real de la síntesis de celulasas.

Finalmente, el comportamiento que presentó *Cellulomonas flavigena* parece adecuarse al modelo propuesto por Gong y Tsao (1979) para la regulación de la biosíntesis de celulasas.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Durante el crecimiento en bagazo de caña, la celulosa y la hemicelulosa son aprovechadas simultaneamente por *Cellulomonas flavigena*.

Endoglucanasas, exoglucanasas y xilanasas son, en esta especie bacteriana, enzimas extracelulares.

Las celulasas y hemicelulasas (xilanasas) son inducidas por el bagazo de caña y por celobiosa en concentraciones menores de 1 g/l.

El sistema celulolítico de *Cellulomonas flavigena* está sujeto a represión catabólica por glucosa (determinado en placa) y glicerol a concentraciones de 10 g/l y 2 g/l respectivamente.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

Bagga, P. S.; D. N. Sanjhu & S. Sharma. (1989). Catabolite repression of cellulase production in *Aspergillus nidulans*. *Process Biochemistry* 24:41-45.

Bagnara, Ch.; C. Gaudin & J. P. Belaich. (1987). Physiological properties of *Cellulomonas fermentans*, a mesophilic cellulolytic bacterium. *Applied Microbiology & Biotechnology* 26:170-176.

Béguin, P. & H. Eisen. (1977). Free and cellulose-bound cellulases in a *Cellulomonas* species. *Journal of General Microbiology* 101:191-196.

Bergey, D. H. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Robert Earle & Norman Edwin Gibbons, eds. 8th edition. Baltimore. U.S.A.

Bertrand, J. L.; R. Manosoli, F. Shareck & D. Kluepfel. (1989). Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnology & Bioengineering* 33:791-794.

Bisaria, V. S. & Mishra, S. (1989). Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. Critical Reviews in Biotechnology 9:81-102.

Bond, K. & F. Stutzenberger. (1989). A note on the localization of cellulosome formation in *Thermomonospora curvata*. Journal of Applied Bacteriology 67:605-609.

Chosson, J. (1987). Inhibition of cellulolytic activity by lactate in a *Cellulomonas uda* specie. Biotechnology & Bioengineering 29:767-769.

Coughlan, M. P. (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 3:39-109.

Cowling, E. B. & T. K. Kirk. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic material as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnology & Bioengineering Symposium 6:95-123.

Curskey, S. M.; B. S. Montencourt & D. E. Eveleigh. (1983). In: Screening for cellulolytic mutants. Wise, D. (ed). Fuel and organic chemicals from biomass. C.P.C. Press U.S.A.

De la Torre, L. M. (1981). Producción de proteínas alimenticias de origen unicelular en residuos lignocelulósicos. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.



De la Torre, L. M. y L. B. Flores-Cotera. (1985). Technical and economical evaluation of different substrate alternation for single cell protein production in México. Symposium on Microbial Biomass Proteins: nutritional, safety and economical aspects. University of Waterloo, Waterloo, Canada.

Dermaun, Z. & J. P. Belaich. (1988). Effects of cellobiose concentration on the anaerobic growth of *Cellulomonas uda*. Biotechnology letters 10:365-368.

Enari, T. M. & P. Markkanen. (1977). Production of cellulolytic enzymes by fungi. Advances in Biochemical Engineering 5:1-48.

Enari, T. M. (1983). Microbial cellulases. In: Microbial enzymes and Biotechnology. Fogarty, W. M. (ed). Applied Science Publishers LTD, England.

Fan, L. T. , L. Yong-Hyum & H. David. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. Biotechnology & Bioengineering 22:177-199.

Farkas, V., S. Sesták, M. Gresík, N. Kolarova, I. Labudová & S. Bauer. (1987). Induction of cellulase in *Trichoderma reesei* grown on lactose. Acta Biotechnol. 7:425-429.

Feeldman, K. A. & J. S. Lovett. (1988). Isolation of the cellulase enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and regulation of enzyme production. *Enzyme Microb. Technol.* 10:262-271.

Gong, Ch. S. & G. T. Tsao. (1979). Cellulose and Biosynthesis regulation. *Annual Reports on Fermentation Processes* 3:111-140.

Greenberg, N. M., R. A. J. Warren, D. G. Kilburn & R. C. Miller Jr. (1987). Regulation and initiation of *cenB* transcript of *Cellulomonas fimi*. *Journal of Bacteriology* 169:4674-4677.

Hagget, K. (1981). Bacterial degradation of cellulose. Thesis Ph D. University of New South Wales. School of Biotechnology. Australia.

Hangspiel, K., D. Haab & C. F. Kubicek. (1989). Protease activity and proteolytic modification of cellulases from a *Trichoderma reesei* QM 9414 selectant. *Applied Microbiology Biotechnology* 32:61-67.

Kalra, K. M., M. S. Sidhu, D. K. Sandhu & R. S. Sandhu. (1984). Production and regulation of cellulases in *Trichoderma harzianum*. *Applied Microbiology Biotechnology* 20:427-429.

Kawamori, M., K. Takayama & S. Takasawa. (1987). Production of cellulases by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* A-131. *Agric. Biol. Chem.* 51:647-654.

Knorre, W. A. (1965). Oscillations of the rate of synthesis of  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli* ML 30 and ML 308. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31:812-817.

Larios, G., A. Gilcón y C. Huitrón. (1983). Sistema celulolítico extracelular de *Aureobasidium sp.* En: *Biotecnología de Enzimas*. Huitrón, C. (ed). UNAM. México.

Litchfield, J. H. (1983). Single-cell proteins. *Science* 219:740-746.

Lowry, D. H. , M. J. Rosenbrough, A. L. Farr & R. J. Randall. (1951). Protein measurement with folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:256-265.

Macris, B. J. , D. Kekos & X. Evangelidou. (1989). A simple and inexpensive method for cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology Biotechnology* 31:150-151.

Mandels, M., R. Andreotti & C. Roche. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology & Bioengineering Symp.* 6:21-33.

Marschoun, S. & P. Rapp. (1987). Metabolism of hexoses and pentoses by *Cellulomonas uda* under aerobic conditions and during fermentation. Canadian Journal of Microbiology 33:1024-1031.

Mes-Hartree, M., C. M. Hogan & J. N. Saddler. (1988). Influence of growth substrate on production of cellulase enzymes by *Trichoderma harzianum* E58. Biotechnology & Bioengineering 31:725-729.

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

Murray, W. D. (1987). Effects of cellobiose and glucose on cellulose hydrolysis by both growing and resting cells of *Bacteroides cellulosolvens*. Biotechnology and Bioengineering 29:1151-1154.

O'Neill, G., S. H. Goh, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn & R. C. Miller Jr. (1986). Structure of the gene encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi*. Gene 44:325-330.

Fonce-Noyola, M. T. (1982). Estudio de la dinámica de un cultivo mixto (*Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas sp*) propagado en bagazo de caña. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.

Poulsen, O. M. & L. W. Petersen. (1988). Growth of *Cellulomonas sp* ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source. Induction of extracellular enzymes. Applied Microbiology Biotechnology 29:480-484.

Prasentsan, P. & H. W. Doelle. (1986). Separation and characterization of endoglucanases from culture filtrates of *Cellulomonas sp* Applied Microbiology Biotechnology 24:326-333.

Reese, E. T., R. G. H. Sfu & H. S. Levinson. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. Journal of Bacteriology 59:485-497.

Rodríguez, H. & G. Volf6a. (1984). Formation and localization of cellulases in *Cellulomonas* culture on bagasse. Applied Microbiology Biotechnology 19:134-138.

Ryu, D. D. Y. & M. Mandels. (1980). Cellulase: biosynthesis and applications. Enzyme Microb. Technol. 2:91-101.

Sahasrabudh, N. A., A. H. Lachke & P. K. Ranjekar. (1987). Characterization of the purified multifunctional cellulase component of *Penicillium funiculosum* Biotechnology letters 9:881-886.

Sanyal, A. R., K. Kundu, S. N. Sinha & D. K. Dube. (1988). Extracellular cellulolytic enzyme system of *Apergillus japonicus*: 1. Effect of different carbon sources. Enzyme Microb. Technol. 10:85-90.

Schaffeld, G. y A. Ulanes. (1983). Producción de celulasas de *Trichoderma reesei* QM 9414 a partir de pulpa de remolacha agotada. En: Biotecnología de Enzimas. Huitrón, C. (ed). UNAM. México.

Schmiz, H. L., B. Broll & B. John. (1983). Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) of *Cellulomonas*: occurrence, induction and its role in cellobiose metabolism. Archives of Microbiology 135:241-249.

Stackebrandt, E. & O. Kandler. (1979). Taxonomy of the genus *Cellulomonas* based on phenotypic characters and DNA-DNA homology and proposal of seven neotype strains. Int. Journal Syst. Bacteriol. 29:273-282.

Stewart, B. J. & M. Leatherwood. (1976). Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. Journal of Bacteriology 128:609-615.

Stoppok, W., P. Rapp & F. Wagner. (1982). Formation, location and regulation of endo-1,4- $\beta$ -glucanases and  $\beta$ -glucosidases from *Cellulomonas uda*. Applied and Environmental Microbiology 4:44-53.

Straight, J. V., D. Ramkrishna, S. J. Parulekar & N. B. Jansen. (1989). Bacterial growth on lactose: An experimental investigation. *Biotechnology & Bioengineering* 34:705-716.

Stutzenberger, F. (1985). Regulation of cellulolytic activity. *Annual reports on fermentation processes* 8:111-154.

Teather, R. M. & P. J. Wood. (1982). Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 43:777-780.

Thayer, D. W., S. V. Lowther & J. G. Phillips. (1984). Cellulolytic activities of strains of the genus *Cellulomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34:432-438.

Tucker, M. P., A. Mohaghenghi, K. Grohman & M. E. Himmel. (1989). Ultra-thermostable cellulases from *Acidothermus cellulolyticus*: comparison of temperature optima with previously reported cellulases. *Biotechnology* 7:817-820.

Vladut-Talor, M., T. Kauri & D. J. Kushner. (1986). Effects of cellulose on growth, enzyme production and ultrastructure of a *Cellulomonas species*. *Archives of Microbiology* 144:191-195.

Wakarchuk, W. W., D. G. Kilburn, R. C. Miller Jr & R. A. J. Warren (1984). The preliminary characterization of the glucosidases of *Cellulomonas fimi*. Journal of general Microbiology 130:1385-1389.

Wardle, P. A. (1985). La silvicultura después del año 2 000. Unasylya 37:7-16.

West, I. C. & M. G. P. Page. (1984). When is the outer membrane of *Escherichia coli* rate-limiting for uptake of galactosides. Journal of Theoretical Biology 110:11-19.

Wood, T. M. (1985). Properties of cellulolytic enzyme systems. Biochemical Society Transactions 13:407-410.

Yaguie, E. & M. P. Estévez. (1988). The epiphytic lichen *Evernia prunastri* synthesizes a secretable cellulose system that degrades crystalline cellulose. Physiologia Plantarum 74:515-520.

Yamane, K., H. Suzuki, M. Hirofani, H. Osawa & K. Nisizawa. (1970). Effect of nature and supply of carbon sources on cellulase formation in *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. Journal of Biochemistry 67:9-17

Yong-Hyum, L. & L. Fan. (1980). Properties and mode of action of cellulase. Advances in Biochemical Engineering 17:101-130.



Zhu, Y. S., Y. Q. Wu, W. Chen, C. Tan, J. H. Gao, J. X. Fei & C. N. Shih. (1982). Induction and regulation of cellulase synthesis in *Trichoderma pseudokoningii* mutants EA3-867 and N2-78. *Enzyme Microb. Technol.* 4:3-12.