



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**" IDENTIFICACION DE LAS GLUCANASAS  
PRODUCIDAS POR *Cellulomonas flavigena*  
CRECIENDO EN DIFERENTES FUENTES  
DE CARBONO "**

**PROYECTO DE INVESTIGACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**MA. ANGELICA GUTIERREZ NAVA**

**A S E S O R E S :**

**DRA. MA. TERESA PONCE NOYOLA  
M. EN C. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

1995  
7

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo  
El Proyecto de Investigación: "Identificación de las plúgenas producidas por Cellulomonas flavigena creciendo en diferentes fuentes de carbono".

que presenta la pasante: María Angélica Gutiérrez Nava  
con número de cuenta: 660787-0 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Biológica .

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 10 de Junio de 1996.

PRESIDENTE	<u>Dr. C. Susana Patricia Miranda Castro</u>	<u>[Firma]</u>
VOCAL	<u>Dr. en C. Stella Marie Acuniana Rivera</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>Dr. en C. Susana E. Leonora Elvira</u>	<u>[Firma]</u>
1er. SUPLENTE	<u>Dr. en C. Andres Roberto Rojas</u>	<u>[Firma]</u>
2do. SUPLENTE	<u>Dr. en C. Sofia Cecilia Gallardo</u>	<u>[Firma]</u>

*A mi mamá,  
por su apoyo, cariño y paciencia  
tan grandes.*

*A mis hermanos:  
Blanchi, Clauss, Rjca,  
Carmen, Gege y Tishia, porque  
a pesar de los pesares, siempre  
estaremos unidos.*

*Al "círculo cerrado":  
Alex, Caro, Elena, Flaca,  
Isauro, Loriz y Sergio,  
por esos momentos  
inolvidablemente divertidos que  
pasamos juntos.*

*Un amigo, es un hermano que  
nosotros mismos escogemos:  
GRACIAS Loric !*

*La parte experimental del presente  
proyecto, se realizará en  
el lab. 42 del Departamento de  
Biotecnología y Bioingeniería del  
CINVESTAV-IPN, bajo la dirección  
de la Dra. Tere Ponce a quien  
agradezco su apoyo y confianza en  
mi trabajo.*



## INDICE

	<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>3</b>
	<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Microorganismos Celulolíticos y Xilánolíticos</b>	<b>5</b>
<b>1.2</b>	<b>Enzimas Xilánolíticas</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Enzimas Celulolíticas</b>	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>Biosíntesis y Regulación</b>	<b>12</b>
<b>1.5</b>	<b>Alternativas Biotecnológicas</b>	<b>16</b>
<b>2.0</b>	<b>Justificación</b>	<b>17</b>
<b>3.0</b>	<b>Objetivo</b>	<b>17</b>
<b>4.0</b>	<b>Metas a alcanzar</b>	<b>17</b>
<b>5.0</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>18</b>
<b>5.1</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>18</b>
<b>5.2</b>	<b>Medio Mineral</b>	<b>18</b>
<b>5.3</b>	<b>Medio de Conservación</b>	<b>18</b>
<b>5.4</b>	<b>Preparación del inóculo</b>	<b>19</b>
<b>5.5</b>	<b>Obtención de extractos enzimáticos</b>	<b>19</b>
<b>5.6</b>	<b>Determinación de Proteína</b>	<b>19</b>
<b>5.7</b>	<b>Determinación de Actividades Enzimáticas</b>	<b>20</b>
<b>5.8</b>	<b>Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizante</b>	<b>20</b>
<b>5.9</b>	<b>Detección de actividad enzimática en geles de poliacrilamida</b>	<b>21</b>
<b>5.10</b>	<b>Inmunización para la producción de anticuerpos policlonales</b>	<b>22</b>
<b>5.10.1</b>	<b>Procedimiento para la inmunización</b>	<b>22</b>
<b>5.10.2</b>	<b>Preparación del suero</b>	<b>23</b>
<b>5.11</b>	<b>Medición del título de los anticuerpos</b>	<b>23</b>
<b>5.12</b>	<b>Identificación de proteínas inducidas con diferentes sustratos, por medio de anticuerpos</b>	<b>25</b>
<b>6.0</b>	<b>Discusión</b>	<b>26</b>
<b>7.0</b>	<b>Referencias</b>	<b>27</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CMC:** Carboximetilcelulosa.

**KDa:** Kilo daltones.

**DNS:** Acido dinitrosalicilico.

**TRIS:** Tris(hidroxi metilaminometano).

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametilendiamina.

**PBS:** Regulador de fosfatos salino.

**CMCasa:** Carboximetilcelulosa. Nombre arbitrariamente asignado a la actividad de endoglucanasa.

**Pfasa:** Nombre arbitrariamente asignado a la actividad enzimática sobre papel filtro. Esta actividad representa el complejo celulasa.

**Solka floc:** Tipo de celulosa que contiene regiones amorfas y cristalinas, su pureza es del 90 al 95%.

## RESUMEN

Este trabajo se enfoca principalmente al estudio de las celulasas y xilanasas producidas por *Cellulomonas flavigena*, bacteria que degrada materiales celulósicos formados por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosas y lignina. Estas enzimas juegan un papel muy importante en el proceso digestivo de los herbívoros, ya que estos polisacáridos son la principal fuente de nutrientes de los rumiantes. Además proveen a través de fermentaciones microbianas sustratos que son utilizables para la industria farmacéutica, química y alimentaria, entre otros. Una ventaja de utilizar estos materiales es que son una fuente renovable encontrada en residuos agrícolas como bagazo de caña, residuos de maíz, desechos de papel, desechos de animales, desechos municipales etc. Se ha propuesto que la celulosa y la xilana tienen un efecto sinérgico sobre las actividades (xilanolítica y celulolítica), dejando entrever que tanto las xilanasas como las celulasas están sujetas a un mismo sistema de control, también se propone que una misma proteína presente diferentes actividades enzimáticas. En el presente trabajo se pretende integrar los conocimientos que existen de las dos enzimas llevando a cabo una comparación en la producción de éstas en diferentes fuentes de carbono para contribuir al conocimiento de su regulación metabólica.

## 1.0 INTRODUCCION.

Este trabajo se enfoca principalmente al estudio de las celulasas y xilanasas bacterianas, no obstante, es preciso recordar que éstas son también producidas por otros organismos como levaduras y hongos, aunque no todos producen cantidades significativas de estas enzimas. El estudio de las celulasas y de las xilanasas, es de suma importancia ya que son capaces de hidrolizar enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 de los principales polisacáridos estructurales de las plantas: celulosa y hemicelulosa (xilana principalmente). Estas enzimas juegan un papel muy importante en el proceso digestivo de los herbívoros, ya que estos polisacáridos estructurales son la principal fuente de nutrientes de los rumiantes. Además proveen a través de fermentaciones microbianas sustratos que son utilizables para la industria farmacéutica, química y alimentaria principalmente. Una ventaja de utilizar estos materiales es que son una fuente rápidamente renovable incluyendo residuos agrícolas como bagazo de caña, residuos de maíz, desechos de papel, desechos de animales, desechos municipales etc. Desde un punto de vista económico, es esencial que todo este material sea reutilizado.

### 1.1 MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS Y XILANOLÍTICOS

La mayoría de los microorganismos que crecen en residuos de plantas, producen naturalmente enzimas tanto celulolíticas como xilanolíticas lo cual no debe extrañarse en vista de la estrecha asociación que existe entre la celulosa y la xilana en las paredes celulares de las plantas. Existen diversos organismos que son capaces de degradar la holocelulosa hasta derivados solubles de la misma, donde los sistemas celulolíticos y xilanolíticos de cada uno de ellos están compuestos por diferente número y tipo de enzimas.(Tabla 1)

La mayor parte de la degradación de la celulosa que ocurre en la naturaleza, se lleva a cabo por un gran número de microorganismos, entre los que se encuentran hongos, bacterias, actinomicetos, y protozoarios. Este proceso de degradación se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas, mesofílicas y termofílicas. (Saxena,1991).

Dentro de las bacterias celulolíticas, el género *Cellulomonas*, es el que más se ha estudiado debido a su gran capacidad celulolítica. En base a sus homologías de DNA, se considera que este género comprende siete especies, las cuales pueden ser aisladas de

fuentes naturales sembradas en condiciones aeróbicas en un medio de sales minerales conteniendo biotina y tiamina como factores de crecimiento y celulosa como fuente de carbono. Las principales especies estudiadas han sido *C. fimi*, *C. uda* y *C. flavigena*. Estas especies producen altos niveles de enzimas celulolíticas cuando crecen en celulosa insoluble. (Stackebrandt & Keddie, 1986)

**Tabla 1. Microorganismos Celulolíticos**

Microorganismo	Enzima
<i>Cellulomonas flavigena</i>	endoglucanasa
<i>Cellulomonas fimi</i>	exo y endoglucanasa A
<i>Aferobispora bispora</i>	endoglucanasa A
<i>Clostridium thermocellum</i>	xilanasas Z/endoglucanasa
<i>Trichoderma reesei</i>	celobiohidrolasa I y II/endoglucanasa I y III
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	endoglucanasa
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	endoglucanasa A
<i>Aspergillus sp.</i>	xilanasas
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	endoglucanasa/xilanasas
<i>Cellulomonas uda</i>	endoglucanasa
<i>Cryptococcus albidus</i>	xilanasas
<i>Bacillus subtilis</i>	endoglucanasa

Béguin, 1990

La celulosa es el principal componente estructural de plantas y vegetales además de ser el material orgánico más abundante del mundo. Los materiales celulósicos contienen tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina; la celulosa es utilizada como fuente de carbono y energía por un gran número de microorganismos, es un polímero simple de residuos de glucosa, que van desde 14,000 unidades en la celulosa nativa de plantas, y de 50 a 5000 en celulosas comerciales. Estos residuos se encuentran unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 rotados 180° con respecto a los residuos vecinos, es decir que las moléculas de celulosa al estar en forma paralela entre sí unidas por puentes de hidrógeno, forman microfibrillas cristalinas insolubles y altamente resistentes a la hidrólisis enzimática, lo que hace que la degradación de los materiales celulósicos sea lenta.

La xilana es la más abundante de las hemicelulosas, y por lo tanto, después de la celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, está compuesta de residuos de xilopiranosas unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, y es característica de maderas duras, maderas suaves, pastos y plantas anuales. (Coughlan, 1993) Su estructura es compleja ya que tiene ramificaciones que dependen de la fuente de donde provengan, estas sustituciones pueden ser principalmente residuos de acetil, arabinosil y ácido-4 *O*-metilglucurónico. (Gilbert, 1993). En contraste con la celulosa, la estructura de la xilana no es uniforme, además de que tiene otros componentes. Dependiendo de la fuente, la estructura de la xilana varía de ser una cadena lineal de  $\beta$ -1,4-xilosas a tener ramificaciones de heteropolisacáridos (Biely, P. 1993).

Los principales constituyentes hemicelulósicos de los residuos agrícolas son las hetero-1,4- $\beta$ -D-xilanas (arabino-4-*O*-metilglucuronoxilanas y 4-*O*-metil-glucuronoxilanas) y las hetero-1,4- $\beta$ -D-mananas (galactoglucomananas y glucomananas) (Dekker, 1983).

Las heteroxilanas son el principal componente hemicelulósico de las gramíneas y las angiospermas, mientras que las  $\beta$ -mananas son más abundantes en las gimnospermas (Dekker, 1983). Bisaria & Ghose en 1981, publicaron estructuras de algunas hemicelulosas, las cuales se presentan en la Figura 2.

La xilana de "maderas duras", es típicamente *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana con aproximadamente 10% de unidades de xilosa con uniones laterales  $\alpha$ -1,2 a un ácido 4-*O*-metilglucurónico, y un 70% de xilosas acetiladas en los carbonos 2 y 3 (Gilbert, 1993).

La xilana de "maderas suaves", es comúnmente arabinoxilana en donde aproximadamente el 10% de las unidades de xilosa se encuentran sustituidas con residuos de arabinofuranosas con uniones  $\alpha$ -2,3 (Whistler & Richards, 1970; Biely, 1985).



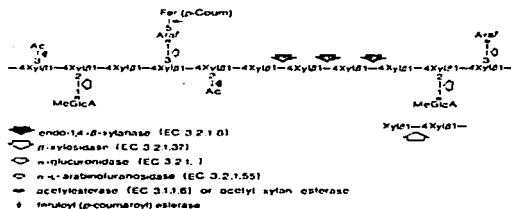




En la Fig. 4 se muestran los sitios de acción de las enzimas involucradas en la degradación de la xilana donde se observa que la enzima crucial para la despolimerización de la xilana es la *endo-β-1,4-xilanasa* (EC3.2.1.8), la cual ataca la cadena principal generando xilooligosacáridos (Biely, 1993). Los sustituyentes de la cadena principal son liberados por las correspondientes esterases y glicosidasas de la siguiente manera:

- ◊ Residuos de α-L-arabinosil por la α-L-arabinofuranosidasa (EC3.2.1.55).
- ◊ Residuos de 4-O-metil-D-glucuronosil o D-glucuronosil por la α-glucuronidasa.
- ◊ Residuos de ácido acético, ácido p-cumárico, y ácido ferúlico, por sus correspondientes esterases, (acetilesterasa, feruloil (p-coumaroil) esterasa, β-xilosidasa ó xilobiasa (EC 3.2.1.37), ataca los xilooligosacáridos generados por la acción de la β-xilanasa y otras hidrolasas de las terminaciones no reductoras liberando D-xilosa como único producto de la hidrólisis.

**Figura 4.** Fragmente hipotético de xilana de plantas que muestra los sitios de acción de las enzimas involucradas en su hidrólisis.



Abbreviations used: Ac, acetyl group; Araf, L-arabino-furanose; MeGlcA, 4-O-methyl-D-glucuronic acid; Xyl, D-xlyose; Fer, ferulic acid; p-Coum, p-coumaric acid.

Biely 1993

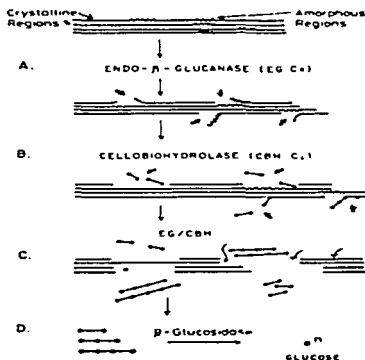
### 1.3 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Las enzimas celulolíticas son también producidas por un gran número de microorganismos, algunos de los cuales excretan grandes cantidades de ellas, mientras que otros, aunque crezcan en celulosa, excretan pocas o ninguna enzima al medio (Enari,

1983). La hidrólisis enzimática de la celulosa cristalina es un proceso complejo que requiere la participación de varias enzimas (Fig.5). En hongos son tres las enzimas principales que se sabe actúan sinérgicamente para llevar a cabo la degradación (Enari, 1983), éstas son:

- ENDO-B-1,4-GLUCANASAS: Rompen las cadenas de celulosa al azar, convirtiendo las cadenas largas en oligosacáridos, presentándose un lento incremento de grupos reductores.
- EXO-B-1,4-GLUCANASAS: Son celulasas que remueven unidades de glucosa o celobiosa del extremo no reductor de la cadena, de lo que resulta un rápido incremento de azúcares reductores con poco cambio en la longitud de la cadena.
- B-GLUCOSIDASA: Hidroliza la celobiosa a unidades de glucosa.

**Fig.5 Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la celulosa.**



De acuerdo a este esquema, la endoglucanasa actúa en la región amorfa de las fibras de celulosa, lo que provoca la formación de nuevas cadenas terminales que pueden ser atacadas por la celobiohidrolasa, la cual después remueve las unidades de celobiosa de las terminaciones no reducidas de las cadenas. La  $\beta$ -glucosidasa completa la hidrólisis removiendo la celobiosa la cual es un inhibidor de la celobiohidrolasa y la endoglucanasa.

Varios autores mencionan que aparentemente las bacterias sólo producen endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasa (Robson y Chamblis 1989; Enari, 1983) y celobiofosforilasa dependiendo del género bacteriano (Ghose 1981).

Los sistemas celulolíticos y xilanolíticos de cada especie están compuestos por diferente número de enzimas, por ejemplo en *C. fimi* ATCC-484, se han encontrado tres o cuatro enzimas. (Parece ser que dos tienen actividad de endoglucanasas y una de exoglucanasa.). Además de que pueden ser enzimas que se encuentren ya sea intra o extracelularmente, por ejemplo se sabe que en las especies de *Bacillus*, las enzimas celulolíticas son extracelulares.

#### 1.4 BIOSÍNTESIS Y REGULACION

Poco se ha estudiado acerca de los sistemas de regulación en la producción de las celulasas y xilanasas aunque indudablemente son sistemas catalíticos que están muy relacionados a nivel funcional puesto que ambas hidrolizan enlaces glicosídicos B-1,4 por medio de mecanismos muy similares. (Coughlan y Hazlewood, 1993).

Salvo algunas excepciones, los organismos que degradan xilana son invariablemente celulolíticos y secretan mezclas complejas de celulasas y xilanasas (Biely, 1991). Generalmente se acepta que las celulasas y las xilanasas son inducibles por fragmentos de oligosacáridos que se forman sobre la acción de niveles bajos de hidrolasas que son producidas constitutivamente y secretadas al medio de cultivo o llevadas a la superficie celular (Biely, 1993). Estos fragmentos, entran a la célula y dan la señal de síntesis de las respectivas enzimas lo que enciende la transcripción de los genes. Hasta el momento, no hay evidencias de los sistemas que gobiernan la síntesis de enzimas celulolíticas y xilanolíticas

La regulación de las enzimas que están involucradas en la degradación de la xilana se ha estudiado menos que la regulación en celulasas (Biely, Kratky, Vrsanska y Urmanicova, 1980 y Biely, McKenzie, Puls y Schneider, 1986), reportó que existen diferencias en la presencia del inductor, la xilobiosa indujo la síntesis de la xilanasa en *Cryptococcus albidus* y en *Trichoderma reesei*, en cambio Rapp y Wagner (1986) reportaron que en *Cellulomonas* este disacárido no actuó como inductor.

Se ha demostrado que las celulasas son enzimas sujetas a regulación metabólica, la cual se lleva a cabo por tres mecanismos diferentes: inducción, inhibición y represión que puede ser catabólica o por producto final, los cuales pueden actuar independientemente o en combinación. (Stewart & Leatherwood, 1976 ; Goksoyr & Erikser, 1980).

Prácticamente en todos los microorganismos celulolíticos, la síntesis de las celulasas es inducida por la presencia de celulosa y reprimida por la presencia en el medio de glucosa u otros azúcares rápidamente metabolizables. (Canevascini, 1979)

Tanto la celulosa como la xilana y otros catabolitos son capaces de inducir la síntesis de ambas enzimas en microorganismos celulolíticos y xilanolíticos. En hongos que son los microorganismos en los que más se han estudiado estos sistemas, hay evidencias que indican que la regulación de la síntesis de la xilanasa en algunos organismos está estrechamente relacionada con las de las celulasas y por otra parte la inducción de las xilanasas puede ocurrir independientemente de la síntesis de las celulasas. Similarmente en las bacterias, no parece existir un mecanismo de regulación sencillo, las xilanasas no son del todo inducibles, pues se ha observado una baja actividad que resulta de la síntesis de enzimas constitutivas que pueden requerirse para generar inductores de bajo peso molecular de la xilana nativa.

La síntesis de ambas enzimas (xilanasas y celulasas) puede ser reprimida por fuentes de carbono fácilmente metabolizables o por los productos finales de su hidrólisis, como lo es la xilosa, celobiosa o glucosa, en cambio en algunos microorganismos, la xilobiosa es un inductor de la síntesis de las xilanasas, aunque su fácil conversión a xilosa puede inhibir la síntesis vía represión catabólica (Coughlan y Hazlewood, 1993)

La regulación y propiedades de las celulasas producidas por las especies de *Cellulomonas* parecen ser cualitativamente similares, aunque se han observado grandes

diferencias cuantitativas en la producción tanto de enzimas celulolíticas como xilanolíticas. (Thayer et al. 1984; Rajoka & Malik, 1986).

Rickard y Peiris en 1981 encontraron que *Cellulomonas flavigena* N1AB-441 incrementó la producción de celulasas y hemicelulasas cuando se hizo crecer en sustratos lignocelulósicos. Peiris y cols. (1982) observaron que en *Cellulomonas flavigena*, y su mutante CS1-17, la xilana era inductor de estas enzimas.

Dekker en 1983, publicó que las xilanasas son enzimas inducibles y se producen cuando los microorganismos se desarrollan en sustratos capaces de producir desrepresión, sin embargo hay excepciones en las que las xilanasas se producen cuando se usa celulosa como sustrato la cual está considerada como inductor de las celulasas.

Leathers y col. (1986), observaron que la xilobiosa que es hidrolizada intracelularmente por la  $\beta$ -xilosidasa, es desrepresor de la síntesis de enzimas hemicelulósicas.

La xilosa es un inductor directo de las xilanasas. Se sabe también que la concentración usada del inductor es muy importante ya que existe una concentración crítica de cada sustrato para inducir determinada enzima.

Se han hecho estudios para conocer el efecto represor o desrepresor en la biosíntesis de D-xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas, haciendo crecer a *Cellulomonas flavigena* en diferentes fuentes de carbono. Pérez (1992), además de observar que la D-xilanasas se localizó preferentemente en el medio de cultivo y que la  $\beta$ -xilosidasa se encontró enlazada a la célula, el bagazo de caña y la xilana fueron los mejores desrepresores utilizando inóculos crecidos en glicerol, sin embargo éste último resultó ser represor catabólico de ambas enzimas. Muñoz (1995), probó el efecto de diferentes mezclas de sustratos sobre la actividad xilanolítica y observó que la mezcla de xilana y solka flock favoreció la actividad con respecto a la xilana sola; adicionalmente notó que la presencia de celulosa tiene un efecto estimulante sobre la producción de las xilanasas y en presencia de xilosa y arabinosa al 1% la actividad estuvo reprimida. En presencia de xilana, la actividad celulolítica es muy baja. Por otra parte, en la mezcla de sustratos como xilana y celulosa, o xilana y bagazo de caña se han encontrado actividades xilanolíticas superiores a las encontradas en los sustratos puros, sin embargo bajo estas condiciones no se han evaluado las celulasas.

Para detectar e identificar las diferentes enzimas, tanto celulolíticas como xilanolíticas se han desarrollado diferentes métodos zimográficos. Eriksson & Pettersson (1973) localizaron una endoglucanasa colocando tiras de papel filtro sobre geles de poliacrilamida esparcidos con carboximetilcelulosa (CMC) en solución y los azúcares adsorbidos en el papel se detectaron por reacción con *p*-anisidina.

Las endoglucanasas también se han detectado incorporando CMC en los geles de poliacrilamida observando las zonas de hidrólisis tiñendo con yodo (Goren & Huberman, 1976).

Bayer et al. (1983), detectaron endoglucanasas sobreponiendo geles de agar con CMC sobre los geles de poliacrilamida, el sustrato no hidrolizado se precipitó con isopropanol.

Béguin, (1983) detectó endoglucanasas basado en la observación de Teather & Wood (1982) de que el rojo congo se une a las B-1,4-glucanas.

Fägerstam & Pettersson (1979), prepararon antisueros específicos con celobiohidrolasa y endoglucanasa de *T. reesei* como antígenos, con la ayuda de estos antisueros, es posible detectar las enzimas en solución. Nummi *et al.* en 1980, prepararon un antisuero contra todas las proteínas del filtrado de un cultivo de *T. reesei*.

## 1.5 ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS

Tradicionalmente, la aplicación tanto de las celulasas como de las hemicelulasas se ha visto desde la perspectiva de la bioconversión de materiales lignocelulósicos hasta producir productos de alto valor como lo es la proteína unicelular, combustibles y otros productos químicos. La bioconversión es una posibilidad que se ha considerado con el fin de utilizar la acumulación masiva de residuos agrícolas, forestales y municipales. Actualmente, las preparaciones de estas enzimas son utilizadas en la clarificación de jugos, además las celulasas se utilizan en la extracción de jugos y de aceites de las semillas y de la pulpa de frutas. También se espera que las celulasas y las hemicelulasas tengan un gran impacto en el proceso de alimentos para animales no rumiantes ya que al adicionarlas a los alimentos se aumenta la digestibilidad y el valor nutricional de los mismos.

Considerable interés se ha enfocado en el uso de las hemicelulosas en la industria de la pulpa y del papel, varios estudios indican que las xilanasas ayudan a reducir la cantidad de cloro utilizado para blanquear la pulpa. (Biely, 1985; Coughlan and Hazlewood, 1993; Tremblay and Archibald, 1993) además de que un tratamiento de la pulpa con las xilanasas ayuda a la extracción química de la lignina, permitiendo un ahorro significativo de sustancias químicas que son usadas para el blanqueo en y una reducción de la emisión de compuestos tóxicos en el medio ambiente. Para esta aplicación se requiere una preparación de xilanasas específicas carente de actividad celulolítica para evitar la reducción de la celulosa. A este respecto, se han realizado bastantes estudios con ingeniería genética con el fin de obtener microorganismos recombinantes capaces de producir e hiperproducir las enzimas de interés. En la sig. tabla se muestran algunas de las aplicaciones de celulasas y xilanasas.

Bioconversión de residuos celulósicos para obtener combustibles.
Blanqueo de la pulpa en la industria papelera.
Mejoramiento de alimentos para animales no rumiantes.
Clarificación de jugos y vinos
Industria textil.
Incorporación a detergentes.
Mejoramiento en la panificación

Tabla 2. Algunas aplicaciones de xilanasas y celulasas

## 2.0 JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que la celulosa y la xilana tienen un efecto sinérgico sobre las actividades (xilanolítica y celulolítica) de *Cellulomonas flavigena*, dejando entrever que estas enzimas (xilanasas y celulasas) están sujetas a un mismo sistema de control, también se propone que una misma proteína presente diferentes actividades enzimáticas (Ponce-Noyola, 1995; Muñoz, 1995; Pérez, 1996). Se han obtenido cepas mutantes de *Cellulomonas flavigena* hiperproductoras de xilanasas y celulasas, en el presente trabajo se pretende integrar los conocimientos que existen de las dos enzimas llevando a cabo una comparación en la producción de éstas en diferentes fuentes de carbono además de comparar la cepa silvestre con sus mutantes con el fin de contribuir al conocimiento de su regulación metabólica.

## 3.0 OBJETIVO

“Separar, identificar y comparar las diferentes glucanasas presentes en extractos de *Cellulomonas flavigena* silvestre y sus mutantes PN-120 y M9-82, creciendo en diferentes fuentes de carbono”.

## 4.0 METAS A ALCANZAR

1. Estandarizar técnicas de determinación de proteínas y actividades (xilanasas, CMCasa, FPasa) de las cepas creciendo en bagazo de caña.
2. Obtener extractos enzimáticos de *C. flavigena* creciendo en xilana, solka flock y glicerol como controles.
3. Llevar a cabo una purificación parcial de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante.
4. Identificar las bandas que tengan actividad. (xilanolítica y celulolítica).
5. Obtener anticuerpos a partir de dichas bandas.



6. Probar los anticuerpos obtenidos con los extractos enzimáticos obtenidos a partir de diferentes fuentes de carbono.

## 5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MICROORGANISMO

Se utilizará *Cellulomonas flavigena* tipo silvestre (CS) y sus mutantes PN-120 (Ponce-Noyola, 1995) y M9-82, (Mayorga, 1994)

### 5.2 MEDIO MINERAL

	g/l
NaCl	5.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5
*PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	3.5
CaCl <sub>2</sub>	0.1
MgCl <sub>2</sub>	0.1

\* H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85 % neutralizado con hidróxido de potasio.

Todas las sales son grado industrial y se aforan con agua de la llave.

### 5.3 MEDIO DE CONSERVACION

Las cepas se conservarán en tubos inclinados con medio mineral, carboximetilcelulosa al 1%, agar al 2%, tiamina 1mg/l, biotina 10 µg/l. Al medio para la cepa mutante se le adiciona 2-Desoxiglucosa al 0.2%; incubados durante 48 horas a 37°C. Los tubos se guardarán en refrigeración resembrando cada 30 ó 45 días.

#### 5.4 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

A partir de un tubo con medio de conservación, resuspender la cepa con un poco de medio en el cual se va a sembrar. Vaciar en un matraz que contenga 50 ml de medio mineral con 1% p/v del sustrato. Incubar 48h a 37°C con agitación. Tomar 20 ml de la suspensión, centrifugarlos y lavarlos dos veces con medio mineral, colocarlos en otro matraz que contenga 200 ml de medio mineral con el sustrato anterior, incubar 24 horas a 37°C con agitación. El crecimiento obtenido se usará para inocular el fermentador. Los sustratos a utilizar en esta etapa serán: glicerol 1%, solka floe 0.6% y xilana 0.8% como controles. (Concentraciones previamente establecidas. Ponce-N, 1995; Muñoz, 1995)

#### 5.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.

Para esto se utilizará un fermentador de 3 litros de capacidad con un volumen de operación de 2 L, a una temperatura de 37°C, con agitación de 300 rpm y una aireación de 0.5 vvm. Mantener el cultivo durante 60 horas. Al final de la fermentación se determinará cantidad de proteína y actividades de xilanas, CMCasa y Pfsa. Después de lo cual se cosecharán y eliminarán las células por centrifugación. el sobrenadante se concentrará hasta un volumen aproximado entre 50 y 100 ml por medio de una diafiltración en un ultrafiltro con una membrana de 5,000 kDa. Una parte del concentrado se congelará en alícuotas de 1 ml y otra parte se liofilizará.

#### 5.6 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Se utilizará una modificación el método de Lowry et al (1951), descrito por Herbert et al. (1971), el cual consiste en dar a la muestra un tratamiento alcalino en ebullición durante 5 min, posteriormente seguir la técnica tal cual, omitiendo el NaOH de

la mezcla tartrato-sulfato de cobre. Realizar una curva tipo con albúmina de suero bovino de 0 a 200 µg, tratada de la misma manera que las muestras.

### 5.7 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

*Actividad sobre CMC:* En un tubo de ensayo colocar 0.5 ml de una solución de CMC al 1% en regulador TRIS-HCl 0.05 M pH 7.2 y 0.5 ml de extracto enzimático. Incubar la mezcla a 50°C durante 3 min, y detener la reacción adicionando 3 ml de reactivo de DNS continuando con la determinación de azúcares reductores. (Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para producir un µmol de celobiosa por minuto en las condiciones del ensayo.

*Actividad sobre Papel Filtro:* Colocar una tira de papel filtro Whatman, de 1 X 6 cm en un tubo de ensayo, adicionar 1 ml de regulador TRIS-HCl 0.05M pH 7.2 y 1 ml del extracto enzimático. Incubar la mezcla durante 30 minutos a 45°C, detener la reacción con 3 ml de reactivo DNS, y determinar azúcares reductores.

*Actividad sobre xilana:* Mezclar 1 ml de solución de xilana al 1% con 1 ml de regulador citratos-fosfatos pH 7.0 y 1 ml de extracto enzimático, incubar la mezcla a 41°C durante 5 min, detener la reacción con 3 ml de reactivo de DNS determinar azúcares reductores.

### 5.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURALIZANTE.

Seguir la técnica descrita en el boletín Sigma Chemical (MKR-137):

*Gel Separador:*

Acrilamida/Bis acrilamida (28:0.74)%	11.0 ml
Regulador TRIS pH 8.8	7.3 ml
Agua desionizada	11.5 ml
Persulfato de amonio (10%)	50.0 µl
TEMED	22.5 µl

*Gel Concentrador:*

Acrilamida/Bis acrilamida (10:2.5)%	0.9 ml
Regulador Tris pH 6.8	1.5 ml
Agua desionizada	3.6 ml
Persulfato de amonio (10%)	36.0 $\mu$ l
TEMED	9.0 $\mu$ l

*Regulador de muestra:*

Regulador TRIS pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	1.0 ml
Agua desionizada	1.0 ml
Azul de bromofenol	0.25 mg

Mezclar las muestras con el regulador de muestra en una relación 1:1 procurando que las muestras contengan entre 70 y 100  $\mu$ g de proteína y colocar en las pozas. Aplicar un voltaje de 80 volts hasta que las muestras alcancen la orilla del gel concentrador. Incrementar el voltaje a 120 volts hasta que el colorante alcance la orilla del gel. Después de la electroforesis teñir los geles con azul brillante de Coomassie. Utilizar estándares para la determinación de pesos moleculares.

## 5.9 DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se utilizarán dos técnicas diferentes, una de ellas es la descrita por Breccia y col. (1995) donde una vez corridos los geles, se sumergirán durante 20 minutos en regulador TRIS-HCl 50 mM pH 6.5 que contenga el sustrato de la actividad a detectar (xilana o CMC al 1%). Lavar el gel con agua destilada, y sumergirlo en una solución de rojo congo al 0.2% durante 20 minutos a temperatura ambiente, después de los cuales reemplazar la solución de rojo congo por una solución de NaCl 1.0 mM e incubarlo hasta que las bandas se vean claras con luz blanca y un fondo rojo.

La otra técnica es preparar un gel de agarosa al 1% con 0.1 -0.5% de sustrato a probar y empalmarlo con los geles de poliacrilamida previamente corridos. Ya empalmados, envolverlos en toallas húmedas e incubarlos durante 60 minutos a 50°C (Mackenzie y Williams, 1984). Después de este tiempo localizar los halos de hidrólisis en el gel de agarosa siguiendo el método de Teather y Wood, (1982).

## **5.10 INMUNIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES**

Una vez que se identifiquen las proteínas con actividad tanto de celulasas como de xilanasas, se correrán geles preparativos, las bandas con actividad se cortarán y se tratarán de la siguiente manera para con ellas inmunizar a los conejos.

### **5.10.1 PROCEDIMIENTO:**

1. Sangrar al animal antes de la inmunización y colectar la muestra de sangre en un tubo de centrifuga de 50 ml. Obtener el suero y almacenarlo a 4°C..
2. Homogenizar la banda respectiva que contenga aproximadamente 400 µg de proteína con 1 ml de regulador PBS pH 7.0.
3. Una vez homogenizado, emulsificar con 1 ml de adyuvante completo de Freund (ACF).
4. Sujetar al animal e inyectarle la emulsión en varios sitios subcutáneamente.
5. Llevar a cabo 3 inmunizaciones de refuerzo con las respectivas proteínas preparadas de igual manera sólo que ahora utilizando Adyuvante Incompleto de Freund (Un refuerzo cada 15 días, antes de cada uno, sangrar al animal y preparar el suero).

### **5.10.2 PREPARACIÓN DEL SUERO**

1. Colocar cada muestra de sangre en tubos de centrifuga de 50 ml y dejarlos 4 horas a temperatura ambiente para la formación de coagulos y después a 4°C toda la noche..
2. Con ayuda de un palillo despegar el coagulo del tubo y quitarlo tratando de no romperlo.
3. Transferir el suero a un tubo de centrifuga de 50 ml, centrifugar 10 minutos a 4,000 rpm a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
4. Almacenar el suero en alícuotas a -20°C.

### **5.11 MEDICIÓN DEL TÍTULO DE LOS ANTICUERPOS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ELISA.**

La medición del título de los anticuerpos (P.23) se llevará a cabo por medio de la técnica de ELISA, la cual consta de la siguiente metodología:

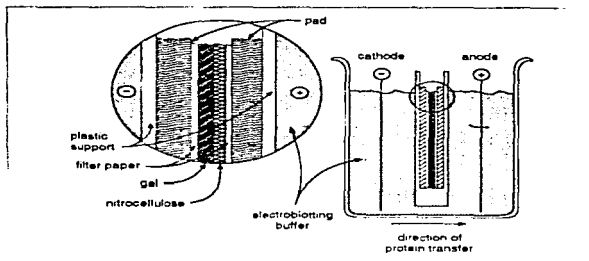
1. Determinar la concentración del antígeno a utilizar en la prueba y preparar una solución de éste con regulador de BiCar p1196
2. Colocar 100 µl de antígeno en cada pozo, agitando para que se distribuya bien en el fondo e incubar a 4°C toda la noche.
3. Lavar con regulador PBS-Tween 5 veces.
4. Agregar 100 µl de albúmina al 1% en PBS-T e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
5. Lavar la placa 5 veces con regulador PBS-T.
6. Agregar a cada pozo (excepto a los primeros) 100 µl de regulador PBS-T.
7. A los primeros pozos adicionar 200 µl de la solución de anticuerpo PBS-T con una dilución 1:200.
8. Llevar a cabo diluciones sucesivas e incubar 1 hora a temperatura ambiente.

9. Lavar 5 veces y agregar el segundo anticuerpo, incubando 1 hora a temperatura ambiente y lavar con PBS-T.
10. Agregar 100  $\mu$ l de reactivo revelador a cada pozo e incubar 10 min. a temperatura ambiente, detener la reacción con ácido sulfúrico y leer en un lector de ELISA.
11. Determinar el título de los anticuerpos

#### **5.12 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INDUCIDAS CON DIFERENTES SUSTRATOS, POR MEDIO DE ANTICUERPOS POLICLONALES**

En esta etapa se utilizará la técnica de Western blot para la identificación de las proteínas de las tres cepas (silvestre y sus dos mutantes) inducidas con diferentes sustratos: xilana, solka flok, glicerol, bagazo de caña, Avicel, celobiosa y xilosa, los gels preparativos que se correrán serán con cada una de las muestras obtenidas con las tres cepas en los diferentes sustratos y se seguirá el siguiente procedimiento.

1. Correr gels preparativos en condiciones desnaturalizantes con las muestras a partir de las que se obtuvieron los antígenos. incluir marcadores de peso molecular.
2. Cuando se haya completado la electroforesis, colocar el gel separador en regulador de transferencia.
3. Ensamblar el sandwich de transferencia y colocarlo dentro de la cámara de transferencia como se muestra en la figura A. (Current Protocols in Immunology Unit. 8.10)
4. Transferir electroforéticamente las proteínas del gel a la membrana durante 60 minutos a 100 v en cuarto frío.
5. Desarmar la cámara y remover la membrana, marcarla por una esquina, secarla y guardarla en bolsas de plástico a 4°C.
6. Teñir el gel con azul de Coomassie para verificar la eficiencia de la transferencia.



7. Sumergir la membrana en regulador de bloqueo, incubar 30 min a temperatura ambiente con agitación.
8. Diluir el anticuerpo primario en regulador de bloqueo
9. Desechar el regulador de bloqueo de la membrana y remplazarlo con la solución del anticuerpo primario, incubar 30 min a temperatura ambiente con agitación.
10. Lavar cuatro veces con TBS, de 10 a 15 min cada vez.
11. Diluir el conjugado anti Ig en regulador de bloqueo.
12. Colocar la membrana en una bolsa de plastico y agregar el conjugado diluido, incubar 30 min. a temperatura ambiente con agitación constante.
13. Remover la membrana de la bolsa y lavar cuatro veces como en el paso 10.
14. Revelar con un apropiado protocolo de visualización. (Alternate protocols. Current Protocols in Immunology 8.10.7).



## 6.0 DISCUSIÓN

Este protocolo es parte de una investigación, el cual es un requisito para la titulación por la opción de "Maestría-Titulación". Desde mi punto de vista, el proyecto presenta objetivos muy interesantes los cuales para ser alcanzados requieren de aproximadamente un año de investigación y trabajo en el laboratorio, este trabajo, ayudará y contribuirá al conocimiento de la síntesis y regulación de las glucanasas producidas por *Cellulomonas flavigena*, las cuales tienen un beneficio a la sociedad, como lo es la incorporación de xilanasas en el tratamiento de la pulpa en la industria papelera para su blanqueo, con esto se reduce la utilización de cloro hasta en un 30%, disminuyendo así la contaminación atmosférica por efluentes. En cuanto a las metodologías y técnicas a utilizar, así como la investigación que se seguirá realizando durante todo el proyecto, me brindarán una experiencia y formación académica lo suficientemente buenas como para poder desarrollarme en un campo profesional.

## 7.0 REFERENCIAS

- BÉGUIN, P. (1990), *Molecular Biology of Cellulose Degradation*. Annu. Rev. Microbiol. 44:218-248.
- BIELY, P., Kratky, Z., Vrsanska, M., and Urmanicova, D., (1980) *Induction and Inducers of endo-1,4- $\beta$ -xylanase in yeast *Cryptococcus albidus**. Eur. J. Biochem. 108:323:329.
- BIELY, P. (1985) *Microbial xylanolytic systems*. Trends Biotechnol. 3:386-290.
- BIELY, P., McKenzie, R., Puls, J. and Schneider, H., (1986), *Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan*. Biotechnol. 4:731:733.
- BIELY, P. (1991) *Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases*, Enzymess in Biomass Conversion pp. 408-416
- BIELY P., (1993), *Biochemical aspects of the production of the production of microbial hemicellulases*, en Hemicellulose and hemicellulasas Ed. by Coughlan & Hazlewood. Portland Press Research Monograph.
- BISARIA, V., and Ghose, T. K., (1981), *Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes, and products*, Enzyme Microb. Technol. 3:90:104.
- BRECCIA, J.D., M.D. Baigori, G.R. Castro and F. Siñeriz, (1995) *Detection of endo-xylanase activities in electrophoretic gels with congo red staining*, Biotechnol. Tech. 2(2):145-148.

- CANEVASCINI, G., M.R. Coudray, J.P. Rey, R.J.G. Southgate, & H. Meier, (1979) *Induction and catabolite repression of cellulase biosynthesis in the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile*. J. Gen. Microbiol. 110:291-303.
- COLIGAN, J.E., A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Sherach, W. Strober. *Current Protocols in Immunology* Ed. John Wiley & Sons. Inc. USA. 1995. Vols. 1,2 y3.
- COUGHLAN, M., Hazlewood, P., (1993),  *$\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications*, Biotechnol. Appl. Biochem. 17:259-289.
- DEKKER, R.F. (1983), *Bioconversion of hemicellulose: Aspects of hemicellulose production by Trichoderma reesei QM 9414 and enzymatic saccharification of hemicellulose*. Biotechnol. Bioeng. 25:1127-1146.
- ENARI, T., (1983) *Microbial cellulases*, Microbial Enzymes and Biotechnology 183-223
- FÄGERSTAM, L.G. and L.G. Pettersson, (1979) *The cellulolytic complex of Trichoderma reesei QM 9414. An Immunochemical approach*. Febs. Lett. 98(2):363-367.
- GHOSE, T.K., B.S. Montenecourt & D.E. Eveleigh. (1981) *Measure of cellulase activity (substrates, assays, activities and recommendations)* Prepared for Biotechnology commission. International Union of Pure and Applied Chemistry.
- GILBERT, H., Hazlewood G., (1993) *Bacterial cellulases and xylanases*, Journal of General Microbiology, 139:187-194.
- GOKSOYR, J., and Erikser, J., (1980) *Cellulases*. En: Microbial Enzymes & Bioconversions. Ed. A.H. Rose. pp. 283-326.

LEATHERS, T.D., R.W. Detroy, and R. J. Bothast. (1986) *Induction and glucose repression of xylanase from a color variant strain of Aerobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett. 8:867-872.

ERIKSSON, K.E. and Petterson (1973) *Cellulases of fungi*. En: Trends in the biology of Fermentation for fuels and chemicals. Alexander Hollander Editor. Plenum Press. N.Y.

HERBERT, D., P.J. Phillips, and R.E. Strange. (1971) *Chemical analysis of microbial cells*. Methods in Microbiol. 5B:350-410.

LOWRY, O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., (1951) *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193:265-275.

MACKENZIE, C.R. & R.E. Williams (1984) *Detection of cellulase and xylanase activity in isoelectric-focused gels using agar substrate gels supported on plastic film*. Can. J. Microbiol. 30:1522-1525.

MAYORGA, R.L. (1994). *Obtención de una mutante de Cellulomonas flavigena hiperproductora de xilanasas*. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN.

MONTENECOURT, B.S, and D.E. Eveleigh. (1979), *Production and characterization of high yielding mutants of Trichoderma reesei*. TAPPI. 28:101

MUÑOZ, M., (1995) *Efecto de diferentes sustratos sobre el crecimiento y actividad xilanolítica de Cellulomonas flavigena Cs y PN-120*. Tesis de Licenciatura. UAEM. Realizada en Depto. Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN.

NUMMI, M., M.L. Niku, T.M. Enari and V. Raunio. (1980) *Immuno-electrophoretic detection of cellulases*, Febs Lett. 113(2):164-166.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PEIRIS, S., Rickard, P. A. and Dunn, N. W., (1982) *Comparison of the xylanolytic and cellulolytic activities of Cellulomonas*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:169-173.

PÉREZ, A., (1992) *Estudio de las D-xilanasas y la  $\beta$ -xilosidasa producidas por Cellulomonas flavigena usando diferentes fuentes de carbono*. Tesis de maestria. CINVESTAV.

PONCE-Noyola T. and M.de la Torre, (1995) *Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of Cellulomonas flavigena on sugar cane bagasse*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:709-712.

RAPP, P., and Wagner, F., (1986) *Production and properties of xylan degrading enzymes from Cellulomonas uda*. Appl. Environ. Microbiol. 51:746:752.

RAJOKA, M., and Malik, K., (1986) *Comparison of different strains of Cellulomonas for production of cellulolytic and xylanolytic enzymes from biomass produced on saline lands*. Biotechnol. Lett. 8(10):753-756.

RICKARD, P., and Peiris, S. P., (1981) *The hydrolysis of bagasse by selected strains of Cellulomonas*. Biotechnol. Lett. 3:39:44.

ROBSON, L.M. and G.H. Chamblis. (1989) *Cellulases of bacterial origin*. Enzyme Microbial. Technol. 11:626-644.

SAXENA, S., (1991) *Production and localisation of carboxymethylcellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase from Cellulomonas and Micrococcus spp.* Appl. Microbiol Biotechnol 34:668-670.

STACKEBRANDT, E. & R.M. Keddie, (1986) *Cellulomonas*. En Berguey Manual of systematic bacteriology. 8th. ed. Sneath R.H.. Vol. 2 pag. 1327-1329.

TEATHER, R.M., and P. Wood (1982) *Use of Congo Red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen*. Appl. Environ. Microbiol. 43:777-780.

THAYER, D.W., S.V.Lowther, & J.G. Phillips. (1984) *Cellulolytic activities of strains of the genus Cellulomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 34(4):432-438.

TREMBLAY, L. and Archibald F. (1993) *Production of a cloned xylanase in Bacillus cereus and its performance in kraft pulp prebleaching*. Can. J. Microbiol. 39:853-860.

WHISTLER, R. L., and Richards, E. L. (1970), *Hemicelluloses*. in The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry. Pigman, W., Horton, D., Ed. Academic Press. New York. 11A:447:469.