



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

CARACTERIZACION DEL COMPLEJO XILANOLITICO DE *Streptomyces* sp. CH-M-1035

M.A. B. Z.

T E S I S

Que para obtener el título de QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

GERARDO PIZAÑA CUREÑO



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

México, D.F.

2001





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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por haberme impulsado a lograr mis metas, por los sacrificios que tuvieron que hacer para que yo pudiera seguir adelante con mis estudios y por el apoyo que hasta el día de hoy me siguen brindando.

A la Dra. María Elena Flores Carrasco por abrirme las puertas de su laboratorio y por toda la ayuda otorgada para la realización del trabajo experimental.

A Wendy y a la familia Vázquez Gómez por la contribución moral y técnica para el desarrollo y la conclusión del trabajo escrito.

A Manuel y a Toño, quienes tienen toda mi amistad y confianza.

Y a todas las personas del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad, que aunque no fueron mencionados en este apartado, han participado de esta tesis.

Gracias.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Antecedentes</b>	
<b>Composición del xilano</b>	<b>4</b>
<b>Estructura tridimensional del xilano</b>	<b>7</b>
<b>Xilanasas</b>	<b>8</b>
<b>Propiedades fisicoquímicas de las endo 1,4-<math>\beta</math>-D-xilanasas</b>	<b>9</b>
<b>Especificidad cruzada a sustrato</b>	<b>17</b>
<b>Modificaciones postraduccionales</b>	<b>18</b>
<b>Productos de diferentes genes</b>	<b>18</b>
<b>Mecanismo catalítico</b>	<b>20</b>
<b>Organización modular de las xilanasas</b>	<b>22</b>
<b>Eslabones</b>	<b>22</b>
<b>Secuencias repetidas</b>	<b>23</b>
<b>Dominios de unión a celulosa</b>	<b>23</b>
<b>Dominio catalítico</b>	<b>24</b>
<b>Celulosoma y xilanosoma</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos</b>	<b>35</b>
<b>Material y métodos</b>	
<b>Métodos preparativos</b>	<b>36</b>
<b>Métodos analíticos</b>	<b>37</b>

## RESUMEN

*Streptomyces* sp. CH-M-1035 produce un complejo xilanólítico que presenta en geles desnaturalizantes cuatro bandas de 35, 45, 85 y 110 kDa y en condiciones no desnaturalizantes, seis bandas de 85, 110, 125, 145, 160 y 185 kDa.

En geles revelados para teñir proteínas se observa la aparición de proteínas de alto peso molecular en geles no desnaturalizantes, mientras que en geles en condiciones desnaturalizantes aparecen otras bandas de menor peso molecular, desapareciendo las primeras.

Las proteínas se eluyeron bajo condiciones no desnaturalizantes, determinándoseles temperatura óptima, pH,  $K_m$  y  $V_{max}$ . La temperatura óptima encontrada estuvo en un rango de 50 a 60 °C, el pH óptimo en 4.5 a 5.0, la  $K_m$  en valores que van de 0.57 a 3.04 mg/ml y la  $V_{max}$  en valores entre 0.31 y 1.34  $\mu\text{mol/ml/min}$ .

Habiendo caracterizado este complejo, es posible explotar mejor su aplicación en el preblanqueado de pulpa para la fabricación de papel y en la clarificación de jugos y vinos, entre otras.

## INTRODUCCIÓN

En años recientes el estudio de microorganismos que degradan diferentes tipos de polisacáridos ha despertado un gran interés a nivel bioquímico, genético y principalmente biotecnológico. Esto se debe a que los mecanismos enzimáticos son muy eficientes para degradar polímeros de origen vegetal, ya que en muchos casos son residuos de desechos que generan contaminación ambiental.

Las hemicelulosas son polímeros que tienen un peso molecular menor al de la celulosa (aprox. 20 kDa), formados por xilosa, manosa, galactosa y arabinosa (entre otros), que conforman el 33% de la biomasa vegetal. Debido a la diversidad y a la complejidad de los xilanos, son necesarios varios tipos de enzimas hidrolíticas -especialmente las endoxilanasas y otras enzimas accesorias- que trabajan en conjunto para la degradación del polisacárido.

Las enzimas más importantes para la degradación del xilano son las endoxilanasas, las cuales tienen aplicaciones en la industria papelera -donde sustituyen de manera parcial el proceso químico, debido a que éste es muy contaminante- en la industria de la panificación, en la industria textil y en la industria vitivinícola y de los jugos. Estas enzimas hidrolizan al azar los enlaces  $\beta$ -(1,4) del xilano, generando xilooligosacáridos de hasta seis unidades de xilosa, que posteriormente, son hidrolizados hasta xilosa por otra enzima: la  $\beta$ -xilosidasa.

## ANTECEDENTES

### COMPOSICIÓN DEL XILANO

Es bien sabido que la biomasa vegetal es uno de los más importantes reservorios de energía y fuente renovable en la Tierra, por lo tanto, su utilización directa en procesos biológicos puede ser efectiva, como una importante clave para la producción de enzimas o biomasa que en el futuro, pudiera ayudar a superar la falta de alimentos<sup>46</sup>. Los principales componentes de la biomasa vegetal son polímeros consistentes de glucosa y otros azúcares relacionados, los cuales pueden ser la principal fuente de carbono y energía de fermentaciones microbiológicas cuando éstos son convertidos en monosacáridos<sup>46</sup>.

Las paredes celulares de las plantas tienen en su mayoría tres polímeros importantes: la celulosa (fibras insolubles de  $\beta$ -1,4-glucano), hemicelulosa (polisacáridos no-celulósicos, incluyendo glucanos, mannanos y xilanos) y lignina (complejo con estructura fenólica). Por esta razón, se les llama también lignocelulosa<sup>13</sup>. La lignocelulosa es una estructura de fibras de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos y lignina; el xilano juega un papel importante en la integridad de la estructura de la pared celular por las asociaciones de las uniones covalentes y no-covalentes de la lignocelulosa-celulosa-xilano.

de un sistema de enzimas con funciones especializadas es una estrategia de los microorganismos para llevar a cabo una mejor hidrólisis del xilano. Así, encontramos que una multiplicidad de enzimas xilanólíticas con diferentes características ha sido reportada en numerosos microorganismos, incluyendo termofilicos y alcalofílicos (Tabla 1). También se ha reportado la purificación de xilanasas de *Streptomyces* sp. cepa 3137, *Streptomyces exfoliatus* MC<sub>1</sub>, *Streptomyces lividans* 66 (Tabla 2), *Clostridium stercorarium* (Tabla 3), *Trichoderma harzianum* E58 y *Trichoderma reesei* QM9414 (Tabla 4); además se han encontrado cinco xilanasas en filtrados del cultivo de *Aspergillus niger* 11 (Tabla 5) y dos xilanasas de *Bacillus* sp. C-59-2 (Tabla 6).

La multiplicidad de las endoxilanasas puede deberse a modificaciones postraduccionales de una proteína proveniente de un solo gen, o bien, al resultado de productos de diferentes genes; así encontramos que los microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces*, también presentan multiplicidad de endoxilanasas, como es el caso de *Streptomyces lividans* 1326, que produce las xilanasas A, B y C provenientes de diferentes genes. En hongos, algunas de las isoenzimas xilanólíticas son productos de diferentes alelos de un mismo gen (Tabla 7)<sup>12,56</sup>.

La especificidad cruzada a sustrato y las modificaciones postraduccionales de estas enzimas son consideradas también como factores que pueden influir en la multiplicidad de enzimas con actividad xilanólítica<sup>56</sup>. Las endo  $\beta$ -1,4-xilanasas pueden ser clasificadas como específicas o como enzimas que presentan una especificidad cruzada, dependiendo en todo caso, si la acción es restringida a

**Tabla 5.-Xilanasas de *Aspergillus* sp. hasta la fecha<sup>45</sup>**

Especies	Cepa	Enzima	PM (10 <sup>3</sup> )	pl	pH óptimo	Temp. Ópt. (°C)	Refer.
<i>Aspergillus sidowi</i>	MG49		30		5.5	60	45
<i>Aspergillus sp.</i>	Amano		[21.9]	6.7	5.0	60	56
<i>Aspergillus niger</i>		I			4.5-5.0	45-50	56
		II			5.5-6.0	45-50	56
		I			5.5		56
		II			5.05		56
		III			3.5		56
	14		33.0, [24.0] {24.7}	4.2	4.0	50	56
	11	IIA	[31.0]		4.0	50	56
		IIB/IIC	[31.0]		4.0	50	56
		IID	[31.0]		6-6.5	50	56
		IA	[50.0]		5.5-6.0	65-80	56
		IB	[50.0]		4.0-4.5	65-80	56
	Rhozyme	7II	[14.0] (13.5)	9.0	5.5	45	56
		7I	[12.0] (13.5)	8.6	6.0	45	56
		4/6III	[20.8]	6.7	4.5-5.5	50-60	56
		9-13B	[11.0] (16.5)	4.5	4.9	45	56
		8	28.0	3.6	5.0	40	56
	15		[13-16] {14-16}	4.0	4.0-4.5		56

El peso molecular fue estimado por: SDS-PAGE, filtración en gel (entre paréntesis cuadrados); ultracentrifugación (entre llaves); cromatografía de líquidos de alta resolución (entre paréntesis); cuando se emplean paréntesis cuadrados dobles es porque el método no se especificó.

aisladas de alrededor de 30 bacterias diferentes, algunas expresadas en *E.coli* (Tabla 8). Existen microorganismos de los cuales se han aislado varios genes para distintas xilanasas.

**Tabla 8.- Ejemplos de enzimas microbianas clonadas que degradan Xilano<sup>13</sup>.**

Fuente	Actividad de la enzima (número de genes) y designación
<i>Aeromonas</i> sp.	Xilanasas (1)
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>Awamori</i>	Xilanasas (1)
<i>Aspergillus tubigensis</i>	Xilanasas (1)
<i>Bacillus</i> sp. C-125	Xilanasas (1)
<i>Bacillus circulans</i>	Xilanasas (2)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Xilanasas (1), xilanasas (1)
<i>Bacillus pumilus</i>	Xilanasas(1), xilosidasas (1)
<i>Bacillus subtilis</i>	Xilanasas (1), xilanasas(1)
<i>Bacteriodes ovatus</i>	Xilanasas (1), xilosidasas/arabinofuranosidasas (1)
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Xilanasas (1)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Xilosidasas/arabinofuranosidasas (1) <i>xyI</i> B, xilanasas (1) <i>xyn</i> A, xilanasas (1) <i>xyn</i> B
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Xilanasas (1) <i>xyn</i> A, xilosidasas (1) <i>xyn</i> B, acetilxilanasas esterases (1) <i>xyn</i> C
<i>Cellulomonas</i> sp.	Xilanasas (1)
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Xilanasas, xilosidasas, arabinofuranosidasas
<i>Cellulomonas fimi</i>	Xilanasas (4) <i>xyn</i> A,B,C,D
<i>CeIVibrio mixtus</i>	Xilanasas
<i>Clostridium</i> sp. F1	Xilanasas (2)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Xilanasas (1)
<i>Clostridium stercoararium</i>	Xilanasas (1) <i>xyn</i> A, xilosidasas (2) <i>bxIA</i> , <i>bxIB</i> , arabinofuranosidasas (2) <i>arfA</i> , <i>arfB</i>
<i>Clostridium thermocellum</i>	Xilanasas (2) <i>xyn</i> Z, xilanasas (3), xilanasas
<i>Cryptococcus albidus</i>	Xilanasas (1)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Xilanasas (1), xilanasas (1)
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Xilanasas (1) <i>xyn</i> A
<i>Pseudomonas fluorescens</i> subsp. <i>Cellulosa</i>	Xilanasas (2) <i>xyn</i> A, <i>xyn</i> B, arabinofuranosidasas (1) <i>xyn</i> C acetil esterases (1) <i>xyn</i> D
<i>Ruminococcus albus</i>	Xilanasas (1)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Xilanasas (4), xilosidasas (1)
<i>Streptomyces</i> sp.	Xilanasas (1)
<i>Streptomyces cyaneus</i>	Xilanasas (1)
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	Xilanasas (2)
<i>Streptomyces lividans</i>	Xilanasas (1) <i>xln</i> A, xilanasas (1) <i>xln</i> B, xilanasas (1) <i>xln</i> C
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	Xilanasas (1), xilosidasas (1)
<i>Thermoascus auranticus</i>	Xilanasas (1)
<i>Thermomonospora fusca</i>	Xilanasas (1)

Las características más distintivas de las secuencias de dominios de unión a celulosa bacteriales son: (1) bajos contenidos de aminoácidos cargados; (2) altos contenidos de hidroxiaminoácidos; (3) residuos conservados de triptófano, asparagina y glicina<sup>21</sup>.

Los dominios de unión a celulosa de Cex y Cen-A de *Cellulomonas fimi* unen las enzimas a celulosa, lo mismo que las secuencias similares en endoglucanasas, xilanasas XynA y XynB y la arabinofuranosidasa de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*<sup>21</sup>.

La celulosa es usualmente asociada con la hemicelulosa, especialmente con el xilano encontrado en la naturaleza. Esto no es impedimento para algunas enzimas que hidrolizan celulosa y xilano a la vez, ni tampoco para algunas xilanasas unidas a celulosa. Cex de *Cellulomonas fimi* hidroliza tanto xilano como celulosa y su secuencia de aminoácidos del dominio catalítico es similar a secuencias de xilanasas diversas.

## DOMINIO CATALÍTICO

El dominio catalítico está constituido por secuencias de aminoácidos que permiten realizar la función específica de las enzimas. Así como para los dominios de unión a celulosa, los dominios catalíticos han sido caracterizados o definidos en muchas celulasas por proteólisis parcial.

Más de 60 genes de celulasa y xilanasas han sido identificados; de estas secuencias de nucleótidos se dedujeron las secuencias de aminoácidos. A su vez,

conocidas como protubozimas. Mediante adhesión celular a celulosa los celulosomas forman un contacto entre la célula y el sustrato.

Los celulosomas son liberados de la matriz extracelular con continua actividad celulolítica y su estructura está compuesta de multisubunidades (la mayoría de estas son enzimas, por ejemplo, celulasas y xilanasas)<sup>38,54</sup>. La estructura del celulosoma es flexible y estable<sup>3,53</sup>.

Estudiando al celulosoma, se encontró que contiene una subunidad funcional no catalítica, esto sugirió que la función de esta subunidad es la de unir al complejo con la celulosa, anclando el celulosoma en la superficie de la célula y que esta subunidad es responsable de la organización de los componentes enzimáticos en dicho complejo; esta subunidad es llamada andamiaje o "scaffolding" y es el centro de la estructura del celulosoma<sup>53</sup>.

Algunas celulasas bacteriales contienen de manera relativa pequeños dominios que están inicialmente descritos en *Clostridium thermocellum*<sup>3</sup>; estos dominios muestran una función de anclaje que comprende un segmento (por duplicado) de 22 residuos, separados por un pequeño segmento distinto de 9 a 15 aminoácidos. Este tipo de dominio, llamado sitio de anclaje o "dockerin", interviene en el enlace de las subunidades catalíticas del celulosoma en *Clostridium thermocellum*<sup>6</sup>.

Los andamiajes de *Clostridium thermocellum* y *Clostridium cellulovorans* contienen eslabones que separan dominios de cohesinas. Los eslabones de *Clostridium thermocellum* son ricos en prolina y residuos de treonina y están glicosilados en estos últimos con oligosacáridos<sup>3</sup>.

## OBJETIVOS

- Separar y purificar las enzimas que constituyen el complejo xilanolítico.
- Determinar temperatura óptima, pH óptimo,  $K_m$ ,  $V_{max}$  y patrón electroforético de las enzimas observadas en geles de actividad no desnaturalizantes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MÉTODOS PREPARATIVOS

#### Microorganismo y condiciones de cultivo

La cepa de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 se aisló en el Laboratorio del Dr. Carlos Huitrón, de una muestra de suelo de los campos de caña de azúcar del estado de Morelos, México<sup>19</sup>.

La propagación y esporulación se realizó en un medio mínimo (MM) que contiene en % (p/v):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.14%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%, xilano de avena 1%, Agar bacteriológico 1.5% (pH 6.5).

#### Producción de la enzima

200 mL de MM contenidos en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL se inocularon con 20 mL de micelio precrecido durante 24 hrs. en medio YEMEG<sup>19,20</sup>. Los matraces se incubaron a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rev/min.

#### Recuperación de la enzima

La enzima cruda se recuperó en el sobrenadante de la centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, del cultivo bacteriano.

Las proteínas, incluyendo las xilanasas, se precipitaron con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 90% de saturación, manteniendo la temperatura a 4 °C durante todo el proceso.

El precipitado se recuperó por centrifugación a 15,000 rpm por 30 minutos y se decantó el sobrenadante. Este precipitado se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1M pH 5.5 y se dializó en membrana de corte de 3500 daltones contra buffer de fosfatos 0.1M pH 5.5 con 4 cambios de solución cada hora.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

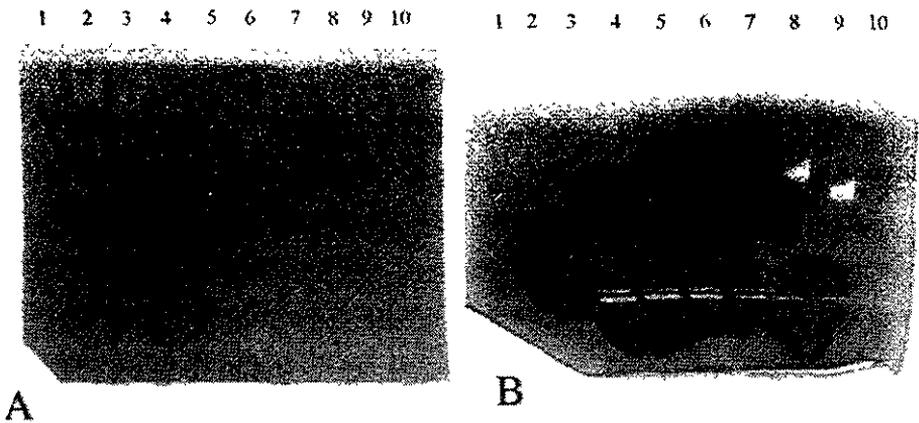
*Streptomyces* sp. CH-M-1035 crecido en xilanos comerciales o desechos agroindustriales produce xilanasas, además de otras enzimas. La producción está asociada al crecimiento y tiene un máximo a las 48 horas de incubación, para declinar posteriormente<sup>19</sup>. Debido a que las xilanasas producidas por este microorganismo están libres de celulasas poseen un valor especial y por ello se decidió analizar a las proteínas con actividad xilanolítica más a fondo.

### SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA Y ZIMOGRAMA DE LAS XILANASAS.

El primer objetivo de este trabajo fue establecer si *Streptomyces* sp. CH-M-1035 producía una o varias xilanasas, debido a que existían reportes en ambos sentidos. Así encontramos que *S. lividans* produce 3 xilanasas distintas<sup>41-43</sup>. Por esta razón, se decidió separar a las proteínas contenidas en el filtrado de este microorganismo crecido en bagacillo de caña, por electroforesis en poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (ND-PAGE) y desnaturizantes (SDS-PAGE). Para el zimograma, los geles contenían xilano de avena al 0.1% para observar las bandas de clarificación del xilano.

En los geles nativos el corrimiento no sólo depende del peso molecular sino también de la carga, debido a esto los pesos son aparentes; en la figura 1 se muestran los resultados del zimograma en geles nativos y geles con SDS y se

En la figura 4 (Paneles A y B) se muestran los resultados de la segunda electroforesis de cada una de las muestras obtenidas después de eluir el gel ND y se puede observar que en los primeros 6 carriles se obtuvieron las bandas por separado en otro gel ND y en el gel con SDS se puede observar que las bandas A,B,C y D generaron a las bandas de 35 y 45. Por otro lado, la banda E presentó las bandas de 110 y de 35 y la F generó una banda de actividad de 85 y otra de 35 kDa.



**Figura 4.- Muestras obtenidas después de eluir en gel ND-PAGE (Panel A) y en gel SDS-PAGE (Panel B).**

**TABLA 4A. Actividad volumétrica del filtrado original a diferentes concentraciones de xilano de madera de abedul**

	concentración (mg/ml)			
	0.666	1.0	1.333	2.0
Filtrado original	12.61	16.0	20.98	27.85

**TABLA 5. Valores obtenidos de los parámetros  $K_m$  y  $V_{máx.}$**

Enzima	$K_m$ (mg/ml)	$V_{máx.}$ ( $\mu\text{mol/ml/min}$ )	Desviación estándar	Coefficiente de determinación	Coefficiente de correlación múlt.
A	3.474	3.407	0.0059	0.9775	0.9887
B	0.831	1.423	0.0046	0.9117	0.9548
C	3.096	2.269	0.0036	0.9701	0.9849
D	0.591	0.807	0.0008	0.9389	0.9689
E	0.566	0.741	0.0005	0.9504	0.9749
F	6.407	2.343	0.0033	0.9531	0.9763
Filtrado original	3.859	81.322	0.0485	0.9926	0.9963

## CONCLUSIONES

1. El patrón electroforético que presenta *Streptomyces* sp. CH-M-1035 en condiciones ND-PAGE y SDS-PAGE es comparable con la de otros microorganismos que presentan complejos enzimáticos de alto peso molecular como *Trichoderma reesei*, *Clostridium thermocellum*, *Thermoanaerobacterium* sp. cepa JW/SL-YS485.
2. La actividad específica de las enzimas que conforman el complejo xilanolítico es comparable con la de otras xilanasas obtenidas por diferentes *Streptomyces*.
3. El complejo xilanolítico que produce *Streptomyces* sp. CH-M-1035 está constituido por la combinación de cuatro enzimas de menos peso molecular aparente: D, E, F y IV, de manera similar al complejo formado por *Thermoanaerobacterium* sp. cepa JW/SL-YS485.
4. Las afinidades por el xilano de abedul presentadas por las enzimas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 son parecidas a las reportadas en otros microorganismos xilanolíticos.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. ATKINS, E. D. T., 1992, Three dimensional structure, interactions and properties of xylans. In: xylan and xylanases, (Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K. And Voragen, A.G.J. Eds.), Elsevier, Amsterdam, 21-39.
2. BAYER, A. E., Lamed, R. T., 1998, The cellulosome of *Clostridium thermocellum*, Advances in Applied Microbiology, United Kingdom, edition published by Academic Press Inc., London, Ltd., 33, 2-41.
3. BAYER, A. E., Morag, E., 1994, The cellulosome -a treasure trove for biotechnology, TIBTECH, 12, 379-386.
4. BÉGUIN, P., Alzarit, P. M., 1998, The cellulosome of *Clostridium thermocellum*, Biochemical Society Transactions, 26, 178-185.
5. BÉGUIN, P., Aubert, J., 1994, The Biological degradation of cellulose, FEMS Microbiology Reviews, 13, 25-58.
6. BÉGUIN, P., Leibovitz, E., 1996, A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein *cipA*, Journal of Bacteriology, 3077-3084.
7. BÉGUIN, P., Lemaire, M., 1996, The Cellulosome: An Exocelular Multiprotein Complex Specialized in Cellulose Degradation, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 31 (3), 201-236.
8. BÉLAICH, Jean-Pierre, Chantal, T., 1997, The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*, Journal of Biotechnology, 57, 3-14.

41. MOROSOLI, Kluepfel, 1986, Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans* 66, Biochemical Journal, 239, 587-592.
42. MOROSOLI, Kluepfel, 1990, Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66, Biochemical Journal, 267, 54-60.
43. MOROSOLI, Kluepfel, 1992, Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66, Applied Microbiology and Biotechnology, 36, 626-631.
44. MOROSOLI, R., Shareck, F., Kluepfel, D., 1997, Minireview Protein secretion in *Streptomyces*, FEMS Microbiology Letters, 146, 167-174.
45. MOUSUMI, G., Nanda, G., 1994, Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG 49, Applied and Environmental Microbiology, 60, 4620-4623.
46. OHMIYA, Kunio, Kazuosakka, 1997, Structure of cellulases and their applications, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 14, 365-413.
47. POUTANEN, K., 1998, An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*, Journal Biotechnology, 7, 271-281.
48. SCHWARZ, W. H., K. Bronnenmeir, F. Grobnitz, and W. L. Staudenbauer, 1987, Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage beta-glucans, Analytical Biochemistry, 164, 72-77.
49. SHAO, W., 1995, A high-molecular-weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485, Applied Environmental Microbiology, 61, 937-940.