

Estudio sobre el comportamiento de levaduras del género *Candida*, en presencia de materiales celulósicos de la caña de azúcar

L. DÍAZ LLODRÁ Y A. HERRERA GUIROLA

Lab. de Fermentaciones, Dpto. de Microbiología, Fac. de Biología
Universidad de la Habana

Recibido: 21 de mayo de 1982

Recibido: 30 de septiembre de 1982

ABSTRACT. From 50 strains of yeasts belonging to the genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces* y *Torulopsis*, were selected three species: *Candida parapsilosis*, *C. krusei* and *C. tenuis*, which were able to grow on carboxymethylcellulose and paper filter as only carbon sources, respectively. Cellulolytic activity was not detected in cultures, but was observed the liberation of reducing sugars because of cellulase activity. It was possible to obtain some growth of these strains before mentioned, on bagasse, pith and leaves of sugar cane, using them as carbon sources with alkaline treatment.

RESUMEN. Del estudio de 50 cepas de levaduras, pertenecientes a los géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, *Sporobolomyces* y *Torulopsis*, fueron seleccionadas las especies *Candida parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tenuis*, capaces de crecer en presencia de carboximetilcelulosa y papel de filtro respectivamente, como únicas fuentes de carbono, no detectándose actividad celulolítica en el sobrenadante de los cultivos de estas especies, pero observándose la liberación de carbohidratos totales y azúcares reductores, señal de haber ocurrido la hidrólisis de las fuentes celulósicas empleadas. Es posible obtener cierto crecimiento de las especies antes mencionadas en presencia de bagazo, meollo o paja de caña, utilizados como única fuente de carbono, así como que el tratamiento alcalino del sustrato carbonato favorece el crecimiento de dichas levaduras, en las condiciones ensayadas.

INTRODUCCION

Son relativamente pocos los microorganismos capaces de producir enzimas extracelulares responsables de la degradación de celulosa crista-

lina, encontrándose mayor número de éstos con actividad biodegradadora, sobre formas solubles y parcialmente sustituidas, de celulosa¹.

Estas enzimas, denominadas celulasas, forman un complejo enzimático, cuyos componentes son C_1 y varias formas de C_x ², siendo los componentes C_x activos sobre la celulosa soluble, parcialmente sustituida, como la carboximetilcelulosa¹. En el grupo de los hongos filamentosos se encuentra una abundante literatura, en relación con la actividad celolítica de estos microorganismos³⁻⁷, reportándose el estudio individual de diferentes especies. Otros aspectos de interés, son los relacionados con la cinética de la fermentación de los materiales celulósicos^{8,9}.

Puede afirmarse, que uno de los grupos de microorganismos que resultarían más importantes en la producción de una biomasa proteica a partir de materiales celulósicos, lo pudieran constituir las levaduras, debido a sus cualidades nutricionales, de cultivo, recuperación, etc. Sin embargo, se ignora prácticamente todo lo relacionado con la posibilidad de utilización de la celulosa por parte de las levaduras¹⁰, conociéndose de cierta actividad celolítica de una especie del género *Willia*¹¹, así como de otra especie del género *Endomycopsis*. También se han reportado a dos especies del género *Tricosporon*^{12,13}.

La utilización de materiales celulósicos de la caña de azúcar, para su conversión en biomasa proteica de origen bacteriano, ha sido reportada desde hace algunos años¹⁴⁻¹⁶, así como por otros investigadores⁷, estando entre ellos algunos trabajos cubanos¹⁸⁻²³. Otros reportan la acción hidrolítica del bagazo pretratado con sosa y por enzimas de un hongo de la especie *Penicillium*²⁴, y de algunas especies de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*^{25,26}.

En el presente trabajo, se aborda el estudio preliminar realizado con 50 cepas de levaduras, de los géneros *Candida*, *Chryptococcus*, *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, y *Torulopsis*, haciéndolas crecer sobre materiales celulósicos como única fuente de carbono.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron donados por el

laboratorio de Micología del Dpto. de Microbiología de la Universidad de la Habana (Tabla I).

Medio de cultivo

El medio de cultivo está compuesto por: $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$... 5 g/l, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$... 0,1 g/l, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$... 0,5 g/l, ClNa ... 0,1 g/l, $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$... 0,1 g/l, extracto de levadura Oxoid L-20 ... 2 g/l, solución de microelementos ... 1 ml./l, según Beech y Davenport²⁷. Esterilización a 110°C durante 30 minutos. Solución de microelementos: BO_3H_3 ... 0,5 g/l, $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$... 0,04 g/l. IK ... 0,1 g/l, $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$... 0,2 g/l, $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$... 0,4 g/l. $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$... 0,2 g/l, $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$... 0,4 g/l²⁷.

Las modificaciones efectuadas en el medio de cultivo con respecto a la fuente de carbono fueron: papel de filtro Whatman No. 1 (10 g/l) cortado en pedazos de 1 x 1 cm, carboximetilcelulosa como sal sódica, con grado de sustitución 0,7-0,8 ... 10 g/l, meollo, bagazo y paja de caña con y sin tratamiento alcalino²⁸ ... 20 g/l. En los medios sólidos para detectar crecimiento sobre carboximetilcelulosa, se emplearon las siguientes variantes: a) medio salino con 2 g/l de extracto de levadura y 3 g/l de carboximetilcelulosa, b) medio salino con 2 g/l de extracto de levadura y 3 g/l con papel de filtro, c) medio salino con 0,5 g/l de extracto de levadura y 3 g/l de carboximetilcelulosa, d) medio salino con 3 g/l de carboximetilcelulosa, e) medio salino con 0,5 g/l de extracto de levadura, f) medio salino solamente. La fuente de nitrógeno sufrió las modificaciones siguientes: peptona micológica Oxoid L-40 ... 1,5, 10 g/l. Se empleó también $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a la concentración antes señalada. Para medio de conservación de las cepas se empleó extracto de malta-agar, incubándose a 30°C durante 48 y 72 horas, guardándose en refrigeración a 4°C.

Condiciones de cultivo

Se emplearon erlenmeyers de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo, incubándose a 30°C con agitación a 120 r.p.m. Se tomaron muestras cada 24 horas y a otros tiempos de fermentación, según las características de cada experiencia.

Determinación de carbohidratos totales solubles

Se empleó el método del fenol-sulfúrico²⁹.

TABLA I

Especies de levaduras estudiadas

<i>Candida albicans</i>	<i>Hansenula anómala</i>
<i>C. blankii</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>C. clausenii</i>	<i>Pichia polymorpha</i>
<i>C. humicola</i>	<i>Rhodotorula gracilis</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Saccharomyces bryamisi</i>
<i>C. krusei</i> , A.	<i>S. cerevisiae</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>S. cerevisiae</i> , A.
<i>C. robusta</i>	<i>S. cerevisiae</i> , B
<i>C. robusta</i> , A	<i>S. cerevisiae</i> (pan)
<i>C. robusta</i> , B	<i>S. chevalieri</i>
<i>C. robusta</i> , C	<i>S. ellipsoideus</i>
<i>C. solani</i>	<i>S. ellipsoideus</i> , A
<i>C. tenuis</i>	<i>S. fragilis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>S. klunei</i>
<i>C. tropicalis</i> , A	<i>S. ludwigii</i>
<i>C. tropicalis</i> , B	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>C. utilis</i> , var. major	<i>S. roseus</i>
<i>C. utilis</i> , A-S	<i>Sporobolomyces</i> sp.
<i>C. utilis</i> , I	<i>Torulopsis</i> sp.
<i>C. utilis</i>	<i>Torulopsis</i> sp. (t)
<i>Chryptococcus albidus</i>	<i>T. globosa</i>
<i>C. laurentii</i>	<i>T. globosa</i> , A
<i>C. laurentii</i> , A	<i>T. sake</i>
<i>Citeromyces matritensis</i>	Levadura s/c
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	Levadura de Suki

Determinación de azúcares reductores

Se siguió el método del ácido dinitrosalicílico de Sumner y Somers³⁰, modificado por Miller³¹.

Determinación de la actividad enzimática C₁

Se empleó una combinación de los métodos de Mandels y Weber³² y de Gupta y cols.³³, considerándose la liberación de los carbohidratos totales solubles, a partir de la celulosa insoluble utilizada como sustrato enzimático. A 4 ml de una solución tampón 0,055M citrato con 50 mg papel de filtro Whatman No. 1, se añade 1 ml del sobrenadante del cultivo libre de células, incubando por una hora a pH 5 y 50°C.

Determinación de la actividad enzimática C_x

Se empleó una modificación del método de Gupta y cols.³³, considerándose la liberación de azúcares reductores a partir de celulosa soluble, empleada como sustrato enzimático. A 4 ml de una solución tampón 0,055 M citrato con 1% carboximetilcelulosa (sal sódica, grado de sustitución 0,7-0,8) se añade, 1 ml del sobrenadante del cultivo libre de células, incubando por una hora a pH 5 y 50°C.

Determinación del pH, densidad óptica de los cultivos y peso seco

Se determinó el pH, una vez filtrado los cultivos con materiales celulósicos, en pH-metro Pye-Unicam. La densidad óptica se determinó una vez filtrado el cultivo, a la longitud de onda de 650 nm, en espectrocolorímetro Spekol, con complemento de extinción T.R. La determinación del peso seco se hizo por el método de Osman y cols.²⁸.

Tratamiento estadístico de los datos

Se empleó el método de los mínimos cuadrados³⁴, aleatorización de los muestreos por tablas de permutaciones al azar y un diseño de bloques al azar³⁵.

RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de los resultados obtenidos con las 50 cepas de levaduras en estudio (Tablas II y III), en relación con el crecimiento en presencia de carboximetilcelulosa, con diferentes variantes en medio sólido, se pudo constatar que a partir de estas experiencias no era posible dilu-

cidar si verdaderamente crecían a expensas de la celulosa, ya que el crecimiento fue dudoso por su magnitud, lo cual puede atribuirse al extracto de levadura utilizado en las distintas variantes, así como cualquier impureza en el agar, que actuara como fuente carbonada, o bien arrastrada con el inóculo. Ninguna de las cepas degradó al agar. Por tal motivo, se cultivaron las cepas en presencia de carboximetilcelulosa en medio líquido y en celulosa insoluble en la forma de papel Whatman No. 1, siendo entonces posible observar visualmente el cambio en la viscosidad de los medios de cultivo, al compararlos con controles no inoculados, coincidiendo las especies *Candida parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tenuis* en la degradación de la carboximetilcelulosa, habiéndose repetido esta experiencia, corroborándose los resultados. El medio de cultivo empleado contenía extracto de levadura, el cual garantizaba el crecimiento de cualquier levadura que necesitara vitaminas, evitando así que pudiera el no crecimiento de los cultivos enmascarar los resultados.

Dennis¹², así como Stevens y Payne¹³, reportan actividad extracelular celulolítica en especies del género *Trichosporon*.

Debido a que las especies estudiadas son del género *Candida*, no es posible establecer una comparación, si bien no pudo ser detectada actividad celulolítica en el sobrenadante, aunque si se liberaban azúcares reductores a partir de los materiales celulósicos ensayados (Figs. 1-3), destacándose la liberación de carbohidratos totales y azúcares reductores, a partir del bagazo tratado alcalinamente, y empleado como única fuente de carbono. Las fluctuaciones en las concentraciones de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores, presentan las mismas características generales observadas en cultivos de bacterias celulolíticas²⁸, coincidiendo la disminución de los carbohidratos solubles con la fase de crecimiento más vigorosa que atraviesa el cultivo, señal de una gran demanda por parte de los microorganismos, de la fuente de carbono soluble. Si observamos el crecimiento de estas tres especies, en presencia de bagazo con y sin tratamiento, vemos que existe un mayor crecimiento cuando se emplea bagazo tratado como única fuente de carbono, lo cual se ha reportado para microorganismos celulolíticos^{5,26}. Otro hecho en favor de una actividad celulolítica, es el encontrado en la especie bacteriana *Cellvibrio gilvus*, en la cual se sugiere que las enzimas celulolíticas se encuentran asociadas a la pared celular del microorganismo y, por lo tanto, no son detectadas en el sobrenadante³⁷.

TABLA II

Crecimiento de diferentes especies de levaduras, en medios salinos con carboximetilcelulosa con diversas variantes

ESPECIES	variantes (*)					
	A	B	C	D	E	F
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. blankii</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. clausenii</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. humicola</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. krusei</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. krusei</i> , A	+	+	+	±	+	±
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. robusta</i>	±	+	+	±	+	±
<i>C. robusta</i> , A	±	+	+	±	+	±
<i>C. robusta</i> , B	±	+	+	±	+	±
<i>C. robusta</i> , C	±	+	+	±	+	±
<i>C. solani</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. tenuis</i>	+	±	+	±	±	±
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. tropicalis</i> , A	+	+	+	±	+	±
<i>C. tropicalis</i> , B	+	+	+	±	+	±
<i>C. utilis</i> , var. major	±	+	+	±	+	±
<i>C. utilis</i> , A-S	±	+	+	±	+	±
<i>C. utilis</i> , I	±	+	+	±	+	±
<i>C. utilis</i>	+	+	+	±	+	±
<i>Chryptococcus albidus</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. laurentii</i>	+	+	+	±	+	±
<i>C. laurentii</i> , A	+	±	+	±	±	±
<i>Citeromyces matritensis</i>	±	+	+	±	+	±
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	±	+	+	±	+	±

(*) Ver materiales y métodos

(+) crecimiento

(±) crecimiento dudoso

TABLA III

Crecimiento de diferentes especies de levaduras, en medios salinos con carboximetilcelulosa con diversas variantes

ESPECIES	variantes (*)					
	A	B	C	D	E	F
<i>Hansenula anomala</i>	±	+	+	±	+	±
<i>Kloeckera apiculata</i>	-	±	-	-	±	-
<i>Pichia polymorpha</i>	-	-	±	±	-	±
<i>Rhodotorula gracilis</i>	+	+	+	-	+	±
<i>Saccharomyces bryamii</i>	-	-	+	-	-	±
<i>S. cerevisiae</i>	+	-	+	±	-	±
<i>S. cerevisiae</i> , A	+	+	+	±	+	±
<i>S. cerevisiae</i> , B	+	-	+	±	-	±
<i>S. cerevisiae</i> (pan)	+	+	+	±	+	-
<i>S. chevalieri</i>	+	-	+	±	-	±
<i>S. ellipsoideus</i>	+	+	+	±	+	±
<i>S. ellipsoideus</i> , A	+	+	+	±	+	±
<i>S. fragilis</i>	+	+	±	±	-	±
<i>S. klunei</i>	-	-	±	±	-	±
<i>S. ludwigii</i>	+	-	+	-	-	±
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	+	+	+	+	±
<i>S. roseus</i>	+	+	+	±	+	±
<i>Sporobolomyces</i> sp.	+	+	+	±	+	-
<i>Torulopsis</i> sp.	+	+	+	+	+	±
<i>Torulopsis</i> sp. (t)	-	±	+	-	±	±
<i>T. globosa</i>	+	+	+	+	+	±
<i>T. globosa</i> , A	-	+	+	±	+	-
<i>T. sake</i>	+	+	+	+	+	±
Levadura s/c	+	±	+	+	±	±
Levadura de Suki	+	+	+	±	+	±

(*) Ver materiales y métodos

(+) crecimiento

(±) crecimiento dudoso

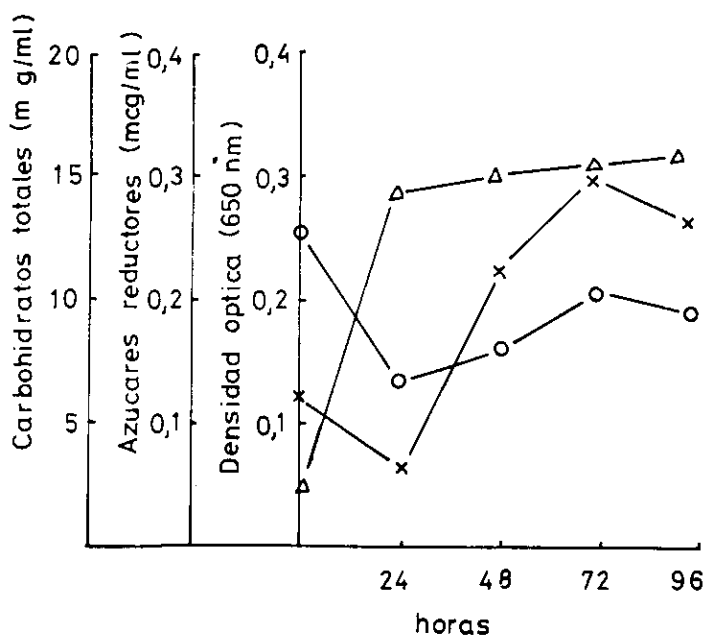


Fig. 1. Cultivo de *Candida parapsilosis* en presencia de bagazo de caña, con tratamiento alcalino: (Δ) densidad óptica del cultivo, (x) carbohidratos totales solubles, (○) azúcares reductores.

Cuando estas especies fueron cultivadas en presencia de meollo con y sin tratamiento alcalino, así como en paja de caña con y sin tratamiento, se observó mayor crecimiento en los sustratos carbonados que presentaban el tratamiento con sosa, así como un crecimiento superior con respecto al bagazo tratado, que en términos generales fue un 30% más alto (Figs. 4-6). Esto pudiera explicarse por el hecho de que el meollo está constituido por tejido parenquimatoso del tallo de caña, que al no ser un tejido de sostén en la planta, sus estructuras ligno-celulósicas son más sencillas, lo cual es ampliamente reportado en los tejidos vegetales³⁸⁻⁴¹. La estructura de los haces fibro-vasculares del tallo y la hoja de caña difieren en que el número de haces es inferior en la hoja⁴²; además, puede considerarse el hecho de que a partir de los datos anatómico-comparativos en la estructura de un corte transversal en un tallo y una hoja,

la relación entre los tejidos vegetales favorece al parénquima de la hoja. Calderín y Ocampo⁴³ realizaron estudios al microscopio electrónico de tejidos de la caña de azúcar, mostrando la complejidad de la estructura de las paredes celulares.

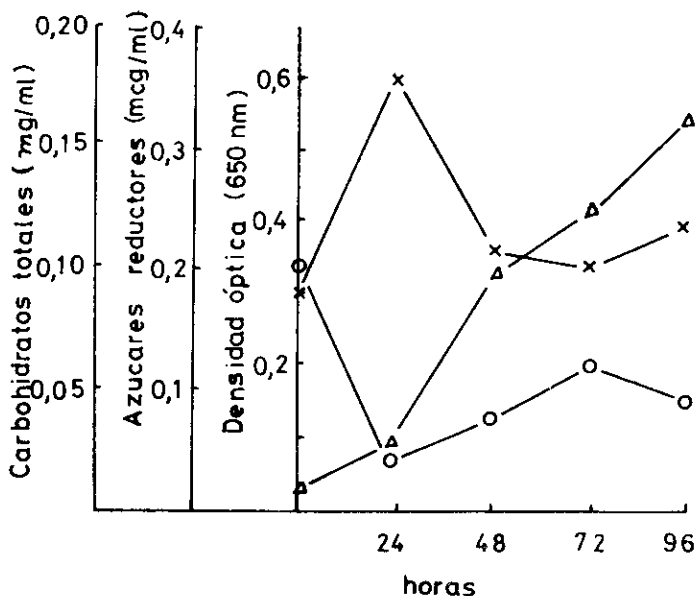


Fig. 2. Cultivo de *Candida krusei* en presencia de bagazo de caña, con tratamiento alcalino: (Δ) densidad óptica del cultivo, (×) carbohidratos totales solubles, (○) azúcares reductores.

Las concentraciones de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores encontrados en los medios de cultivo, constituyen la resultante de dos procesos; uno de hidrólisis de la forma insoluble del material celulósico a formas solubles con producción de azúcares reductores, y otro fenómeno constituido por el consumo de estos compuestos reductores³⁸. Por lo tanto, los valores en concentración de estos compuestos solubles representan la resultante de ambos fenómenos⁴⁴, coincidiendo un aumento de la población de levaduras con una disminución de los azúcares solubles y su tendencia a un posterior aumento debido a una estabilización del crecimiento de la población y el consiguiente decremento en su demanda.

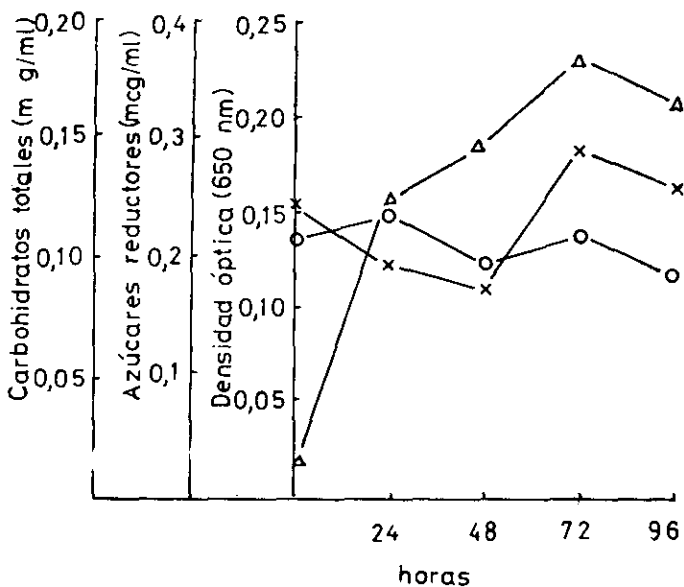


Fig. 3. Cultivo de *Candida tenuis* en presencia de bagazo de caña con tratamiento alcalino: (Δ) densidad óptica del cultivo, (×) carbohidratos totales solubles, (○) azúcares reductores.

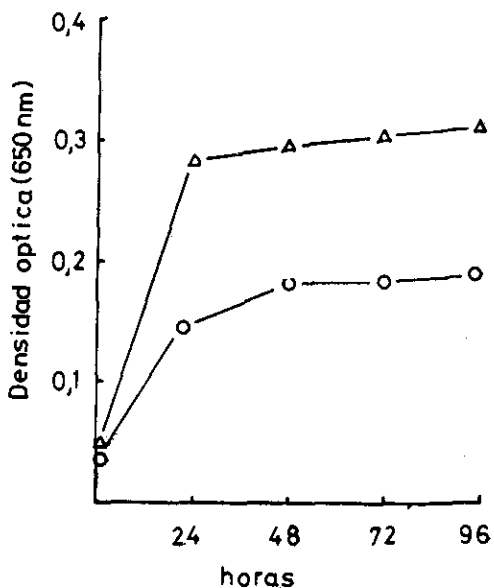


Fig. 4. Crecimiento de *Candida parapsilosis*: (Δ) en bagazo con tratamiento alcalino, (○) en bagazo sin tratamiento.

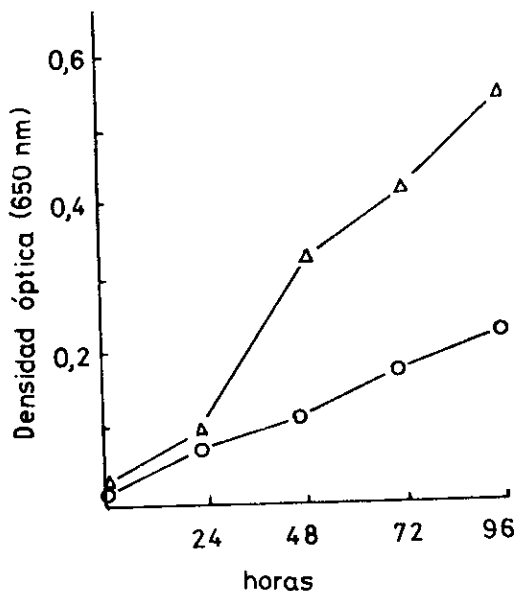


Fig. 5. Crecimiento de *Candida krusei*: (△) en bagazo con tratamiento alcalino, (○) en bagazo sin tratamiento.

Mandels y Weber³² reportaron la influencia de la peptona en la excreción de celulasas por hongos filamentosos, por lo que se incluyó a ésta en un diseño de bloques al azar, encontrándose en los cultivos con peptona a 10 g/l mejor crecimiento (Tabla IV), no siendo posible separar el crecimiento provocado por la peptona del aportado por el bagazo solamente, por lo que éste es una expresión de ambos. Sin embargo, el crecimiento con peptona solamente fue inferior a la combinación bagazo y peptona (Tabla V).

No fue posible encontrar diferencias significativas entre las tres especies estudiadas, siendo el coeficiente de variación experimental de 6,2%, el cual resulta aceptable para estas condiciones. El análisis de los coeficientes de correlación obtenidos a partir de los valores de crecimiento del cultivo, en presencia de diferentes concentraciones de peptona como única fuente de carbono, muestran una correlación positiva con valores entre 0,873 y 0,892 para las tres especies estudiadas, indicando una

evidente proporcionalidad en la utilización de la peptona como fuente de carbono. Con respecto a los cultivos crecidos en bagazo y diferentes concentraciones de peptona también se observa igual fenómeno, con valores para los coeficientes de correlación entre 0,925 y 0,965, no siendo posible separar el crecimiento debido al bagazo del de la peptona, ya que parte de la peptona, así como los cuerpos celulares de las levaduras, se adherían a las fibras e intersticios de los materiales celulósicos empleados, lo cual se evidenció en las observaciones al microscopio, impidiendo esto el tener la posibilidad de determinar sólo al material celulósico residual debiéndose considerar en el futuro un estudio más detallado de esta fuente orgánica de nitrógeno, así como de otros aspectos que puedan influir en una mejor utilización de los materiales celulósicos por las levaduras.

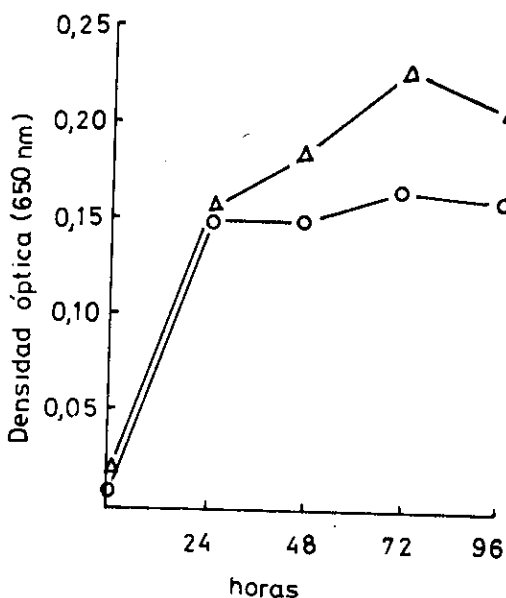


Fig. 6. Crecimiento de *Candida tenuis*: (Δ) en bagazo con tratamiento alcalino, (○) en bagazo sin tratamiento.

TABLA IV

Crecimiento de los cultivos en presencia de bagazo y peptona como fuentes de carbono, expresado en densidad óptica

Especie	peptona (g/l)	densidad óptica (650 nm)	r
<i>C. parapsilosis</i>	0	1,088	0,965
	1	1,118	
	5	2,579	
	10	4,209	
<i>C. krusei</i>	0	0,783	0,947
	1	1,472	
	5	2,467	
	10	3,540	
<i>C. tenuis</i>	0	0,867	0,925
	1	1,018	
	5	1,880	
	10	2,537	

CONCLUSIONES

1. De las 50 cepas de los géneros *Candida*, *Criptomococcus*, *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces* y *Torulopsis* estudiados, sólo las cepas de las especies *Candida parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tenuis*, fueron capaces de crecer en materiales celulósicos como únicas fuentes de carbono.

2. Se detectó la liberación de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores, y se siguió su comportamiento en los cultivos de *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tenuis*, señal de actividad enzimática sobre el material celulósico empleado como única fuente de carbono.

3. Se obtuvo cierto crecimiento de las tres especies, antes mencionadas, en presencia de bagazo, meollo y paja de caña, utilizados como única fuentes de carbono en medios de cultivos.

TABLA V

Crecimiento de los cultivos en presencia de peptona como única fuente de carbono, expresado en densidad óptica

Especie	peptona (g/l)	densidad óptica (650 nm)	r
<i>C. parapsilosis</i>	0	0,080	
	1	1,500	0,877
	5	1,700	
	10	2,000	
<i>C. krusei</i>	0	0,340	
	1	0,750	0,892
	5	1,100	
	10	1,350	
<i>C. tenuis</i>	0	0,240	
	1	0,840	0,873
	5	1,200	
	10	1,400	

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a la A.T.D. Gisela Casado y al Técnico Químico "A" Juan Argüelles, la ayuda prestada, así como a los demás compañeros del laboratorio de Fermentaciones de nuestro Departamento.

REFERENCIAS

1. SRINIVASAN V.R. Microbial cellulases, p. 659, en CRC Handbook of Microbiology III, Microbial products (eds. A. I. Laskin, y H. A. Lechevalier) CRC Press, Ohio, 1973.
2. MANDELS M., ANDREOTTI R. AND ROCHE C. *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 6*, 21, 1976.
3. LEVINSON H.S. AND REESE E.T. *J. Gen. Physiol.*, 33, 601, 1950.
4. NORKRANS B. *Upsalienses*, 11, 5, 1950.
5. SIU R.G.H. Microbial decomposition of cellulose, Book Division, Reinhol Pub. Corp. N. York, 1951.
6. KUDRYASHOVA T.I., SIDOROVA I.I. AND FENIKSOVA R.V. *Mikol. Fitopatol.*, 8, 214, 1974.
7. RODIONOVA N.A. TIUNOVA N.A. Y MARTINOVICH L.I. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 6, 666, 1970.
8. HOWEL J.A. AND STUCK J.D. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 873, 1975.
9. ROSS L.W. AND UPDEGRAFF D.M. *Biotechnol. Bioeng.* 13, 99, 1971.
10. LODDER J. The yeast, North Holland Publishing Co. Amsterdam 1970.
11. SARTORY R. *J. Pharm. Chim.* 8, 366, 1930.
12. DENNIS C. *J. Gen. Microbiol.*, 71, 409, 1972.
13. STEVENS B.J.H. AND PAYNE J. *J. Gen. Microbiol.*, 100, 381, 1977.
14. HAN Y.W. AND SRINIVASAN V.R. *Appl. Microbiol.*, 16, 1140, 1968.
15. CALLIHAN C.D. AND DUNLOP C.E. Construction of a chemical microbial pilot plant for the production of a single-cell protein from cellulosic wastes, U.S. Nat. Teach. Inform. Serv. P. B. Resp. 1971.
16. HAN Y.W. AND CALLIHAN C.D. *Appl. Microbiol.*, 27, 150, 1974.
17. PAREDES O., MEDOSA J.E. AND CAMARGO E. *Experientia*, 30, 205, 1974.
18. ENRÍQUEZ A. Y HERNÁNDEZ D. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 7, 175, 1976.
19. LÓPEZ R. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 7, 349, 1976.
20. OCAMPO G., BLANCO R., SUÁREZ R., DRAGANOV L., SOKOLOV T. Y KÓSTÓV V. Cuba Azúcar, Octubre-Diciembre, 19, 1976.
21. LÓPEZ R. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 9, 349, 1978.
22. OTERO M., CABELLO A. Y GÓMEZ R. Algunas respuestas acerca de los tratamientos alcalinos para la proteína celular, ATAC.
23. LARA L. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 7, 337, 1976.
24. GARCÍA D.V., OGAWA T., SHYNYMYO A., AND ENATSU T. *J. Ferments Technol.*, 52, 378, 1974.
25. GUERRA G. Aislamiento y caracterización de hongos celulolíticos, Trabajo de Diploma, Universidad de la Habana 1976.
26. ABÍN L. Estudio del efecto de algunos nutrientes sobre la producción de celulasas por hongos filamentosos, Trabajo de Diploma, Universidad de la Habana 1977.

27. BEECH F. W. AND DAVENPORT R. R. *Methods in Microbiology*, 4, 153, 1971.
28. OSMAN H. G., HERRERA A., BELL A., LLAMA E., Y CASADO G. *Revista Ciencias, Ser. 5*, Abril 1972.
29. DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., ROBERS P. A. AND SMITH F. *Anal., Chem.* 28, 350, 1956.
30. SUMNER J. R. AND SOMER G. F. *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*, A. Press, Inc. N. York, 1944.
31. MILLER G. L. *Anal. Chem.*, 31, 426, 1959.
32. MANDELS M. AND WEBER J. *Adv. Chem. Series*, 95, 391, 1969.
33. GUPTA J. K., DAS N. B. AND GUPTA Y. P. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1961, 1972.
34. SPIEGEL M. R. *Teoría y problemas de estadística*, Pueblo y Educación, La Habana, 1977.
35. COCHRAN W. G. Y COX G. M. *Diseños Experimentales*, Ed. Trillas, México 1971.
36. NORMAN A. G. AND FULLER W. H. *Adv. Enzymol.*, 2, 239, 1942.
37. BREUIL C. AND KUSHNER D. *J. Can. J. Microbiol.* 22, 1776, 1976.
38. GOLA G., NEGRI G. Y CAPPALETTI C. *Tratado de Botánica*, Ed. Rev. La Habana, 1967.
39. ABREU E. *Variedades comerciales de la caña de azúcar*, Ciencia y Técnica, La Habana, 1968.
40. ESAU K. *Anatomía vegetal*. Ed. Rev. La Habana, 1969.
41. STRASBURGER E., NOL F., SHCENK H., Y SCHIMPER A. F. W. *Tratado de Botánica*, Ed. Marín, 1974.
42. VAN DILLEWIJN C. *Botánica de la caña de azúcar*, Ed. Rev. La Habana, 1968.
43. CALDERÍN A. Y OCAMPO G. *Revista ICIDA*, 8, 3, 1974.
44. HERRERA A. *Estudio del género Cellulomonas y la utilización de los materiales celulósicos de la caña para la obtención de proteína microbiana*, Tesis de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas, Dpto. Microbiología, Universidad de la Habana, 1980.