



Represión Catabólica de la Síntesis de Enzimas Microbianas en Cultivos Líquido y Sólido

CRISTÓBAL NOÉ AGUILAR

Dirección permanente: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo. A. P. 252. C. P. 25 000 Saltillo, Coahuila, México. Correo caguilar@alpha1.sal.uadec.mx
Dirección actual: Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Av. Michoacán y la Purísima s/n col. Vicentina, Iztapalapa. C.P. 09340 México, D. F.
Correo electrónico: cnoe@xanum.uam.mx

ABSTRACT. Recent studies on high levels of inducible enzymes production such as α -amylase, pectinase, and tanase by certain microorganisms during Solid State Culture (SSC) have called strongly the attention. Apparently, this is due to apparent absence of catabolic repression, still when high levels of glucose are added, while that in the Liquid State Culture (LSC) to low concentrations of glucose, a marked repression of the synthesis of such enzymes is showed. Several theories have been proposed to explain this phenomenon, but still, no one has demonstrated which are the causes of its manifestation. In this work, main aspects of induction and catabolic repression of enzymes are reviewed, and possible causes of the apparent absence of catabolic repression of enzymes in SSC are presented.

RESUMEN. Los altos niveles de producción de enzimas inducibles tales como la α -amilasa, pectinasa y tanasa por ciertos microorganismos durante los procesos de Cultivo en Medio Sólido (CMS) han llamado la atención en los últimos años; al parecer, ésto se debe a que en tales condiciones no se ejerce la represión catabólica, aún cuando los niveles de glucosa adicionados son considerablemente altos; mientras que en el Cultivo en Medio Líquido (CML) con bajas concentraciones de glucosa, existe una marcada represión de la síntesis de dichas enzimas. Diversas teorías han sido propuestas para explicar dicho fenómeno, pero hasta ahora, ninguna ha demostrado cuales son las causas por las cuales se presenta. En este trabajo se revisan los aspectos generales de la inducción y represión catabólica de enzimas y se presentan las posibles causas de la ausencia aparente de la represión catabólica enzimática en el CMS.

INTRODUCTION

La represión catabólica por definición representa la interrupción de la expresión de genes que codifican la síntesis de enzimas inducibles. La biosíntesis de enzimas microbianas involucra serios problemas, principalmente económicos, cuando la producción de éstas, se realiza por procesos de cultivo en medio líquido (CML) con fines comerciales.¹⁴ Para evitar este complejo mecanismo regulatorio, se han propuestos nuevos modelos de producción de enzimas microbianas, tales como, cultivos continuos o por lote alimentado, así como la obtención de cepas mutantes resistentes a represión catabólica. Algunos de estos modelos son imprácticos o difíciles de ejecutar.³⁴

En los últimos años, diversos autores han mostrado que el proceso de cultivo en medio sólido (CMS), minimiza la presencia de este fenómeno; tal como lo demuestran los resultados sobre la producción de α -amilasa,^{33,34} endo y exopoligalacturonasa,³⁷ tanasa²⁵ y proteasa.²⁰

En este trabajo se presentan aspectos generales sobre los fenómenos de inducción enzimática y represión catabólica; se hace énfasis en los principales hallazgos sobre la capacidad del proceso de CMS para minimizar la represión

catabólica; se discuten las principales causas que inciden en este fenómeno y finalmente se sugieren algunas áreas futuras de investigación que permitan entender detalladamente la existencia de estos patrones de producción, cuando se comparan el CMS y el CML.

ASPECTOS GENERALES

El crecimiento bacteriano en medios con dos fuentes de carbono presenta un comportamiento denominado como diauxia o de dos fases;²² éste se manifiesta, ya que el microorganismo utiliza primero al sustrato de más fácil asimilación (que incluye el transporte y el metabolismo del compuesto) o con el cual se requiera el mínimo consumo de energía para introducirlo y metabolizarlo. Cuando éste se acaba, consumirá la otra fuente de carbono para la que requiera un gasto energético mayor.

En el metabolismo bacteriano, este fenómeno conocido como represión catabólica, se presenta por la inhibición del transporte activo provocado por la alta concentración de uno de los azúcares que ingresan por el sistema fosfotransferasa. Este proceso regulatorio consiste básicamente en la



inhibición de la transcripción de los genes que codifican para las enzimas necesarias para la degradación y asimilación de substratos más complejos, y se ocasiona por la alta concentración de substratos energéticamente preferidos por los microorganismos³⁶ debido a que las células se desarrollan en base a un eficiente sistema metabólico basado en un mínimo gasto energético.

Los mecanismos involucrados en el fenómeno de represión catabólica aún no han sido satisfactoriamente elucidados²⁷ y los avances que se tienen se han logrado utilizando como modelo células procariotas, principalmente de *Bacillus subtilis*,³¹ *Escherichia coli*,³⁰ *Pseudomonas multivorans*,⁴⁰ *Bacillus licheniformis*³⁴ mientras que en eucariotas, las levaduras del género *Saccharomyces*, han sido las más estudiadas.²²

Con respecto a mohos, Anwar y colaboradores⁴ enfocaron sus esfuerzos al aislamiento de mutantes de *Penicillium purpurogenum* resistentes a represión catabólica, mientras que Antier y colaboradores^{2,3} aislaron mutantes de una cepa silvestre de *Aspergillus niger* C28B25, usando como fenotipo de selección la resistencia a la 2-desoxiglucosa.⁴¹

En los últimos años, se han reportado aspectos muy llamativos sobre el fenómeno de represión catabólica cuando se evalúan los niveles de producción de enzimas inducibles entre la fermentación en CML y en CMS. Al adicionar bajas concentraciones de glucosa (0-3 %) más el inductor al medio de cultivo en CML, existe una represión casi total de las enzimas inducibles, mientras que en CMS existe una ausencia aparente de este fenómeno.

Solis-Pereira y colaboradores³⁷ mencionan que en el CMS, este fenómeno se debe a diferencias inherentes al mezclado (en este sistema no hay agitación, por lo que la concentración de nutrientes y particularmente la del represor catabólico es heterogénea) y difusión de nutrientes en el medio de fermentación (la cual depende directamente de la viscosidad del medio).

Mientras, Ramesh y Lonsane³⁴ suponen que se debe principalmente a dos tipos de factores: los fisicoquímicos, tales como la formación de procesos de difusión de nutrientes sobre el soporte, los cuales se dan en presencia de una baja actividad acuosa y también por la adherencia de las células al soporte; y los de cultivo, que se relacionan con la falta de agitación. Sobre este aspecto, Lekha y Lonsane²⁵ mencionan que la alta producción de la enzima tanasa por *A. niger* PKL 104 en CMS se favorece por un bajo contenido de humedad, además mencionan que el CMS ofrece condiciones más propicias de producción al microorganismo que el CML.

Asimismo, hasta ahora, existe muy poca información acerca de los patrones de inducción-represión en estos tipos de fermentación. Por esta razón, es necesario elucidar los factores que influyen en la manifestación de estos tipos de patrones, los cuales tienen grandes implicaciones económicas y prácticas en los procesos industriales convencionales.

FENÓMENO DE INDUCCIÓN Y REPRESIÓN DE SÍNTESIS DE ENZIMAS

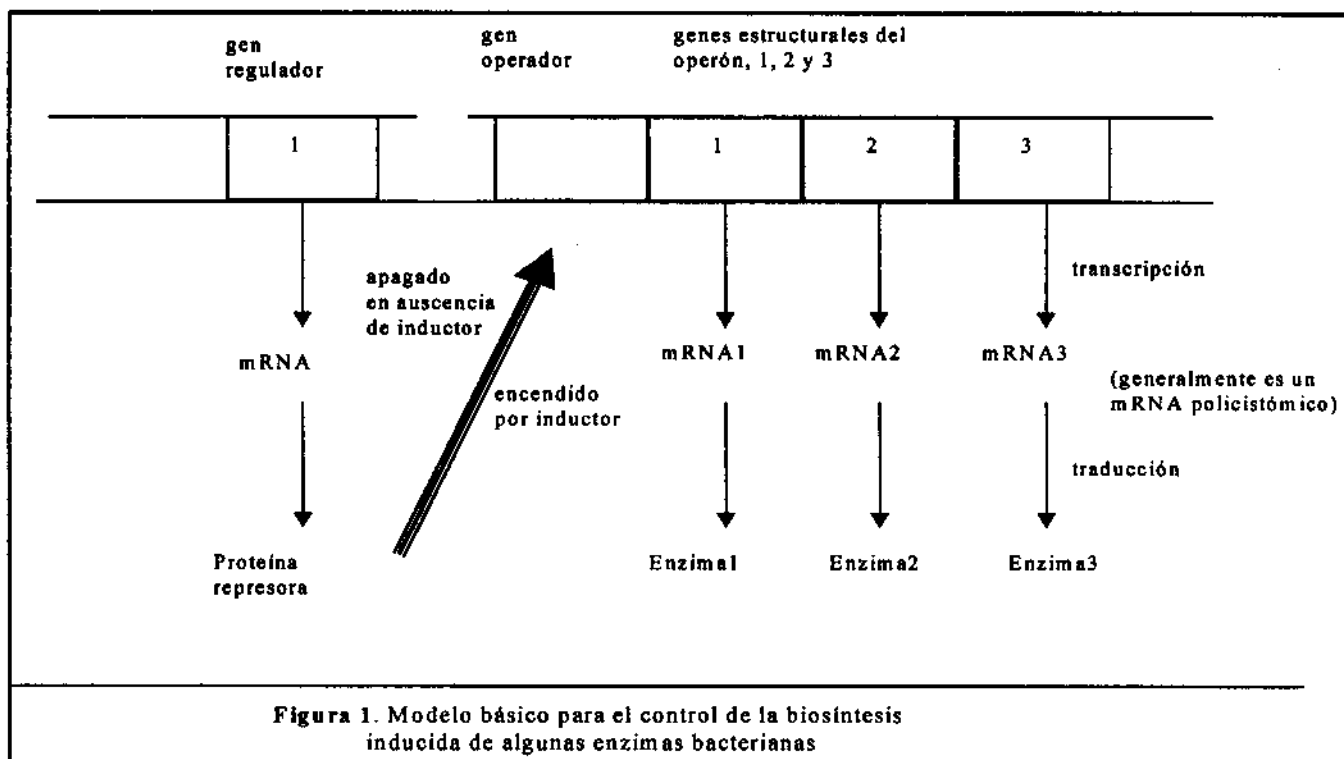
Todas las células poseen sistemas de control muy complejos que aseguran un uso eficiente de los recursos materiales y energéticos que las rodean.⁷ Para lograrlo, las células sintetizan proteínas específicas conocidas como enzimas adaptativas o inducibles, las cuales se producirán en función de las circunstancias medioambientales (particularmente el aporte cualitativo y cuantitativo de los nutrientes) en las que se encuentra la célula. Esta capacidad para formar una serie de proteínas con actividad catalítica únicamente cuando las sustancias que metabolizan se encuentran presentes, permite a la célula su adaptación al ambiente que la circunda sin modificar su eficiencia metabólica; a este comportamiento se le conoce como mecanismo de inducción y se encuentra regulado genéticamente.

La existencia del otro fenómeno conocido como activación-inhibición de la actividad enzimática, no debe confundirse con el de inducción-represión, ya que el primero, no altera la cantidad de enzima presente, pues ésta, es controlada por el segundo mecanismo. La inducción-represión, causa cambios en la tasa de síntesis de enzima a nivel genético. Ambos procesos regulatorios son similares en su sensibilidad a la concentración de ciertas moléculas (incluyendo a los substratos) relativamente pequeñas.⁷

CÉLULAS PROCARIOTAS

El control genético de la síntesis de enzimas ha sido ampliamente estudiado en los microorganismos, especialmente en bacterias. Los modelos de mayor utilidad (Fig. 1) para entender la inducción-represión son los de Monod y colaboradores³¹, en los cuales una proteína (represora) se involucra en el control del gene operador. Si el sitio operador está bloqueado, el gene estructural que codifica para la enzima de interés no se transcribe. El gene regulador en el modelo de inducción produce una molécula que controla la expresión de los genes estructurales y por lo tanto la producción de la enzima. Cuando el inductor esta presente, se une con el represor inactivándolo, permitiendo la transcripción de los genes estructurales. En el modelo de represión (regulación de operones anabólicos), el gene regulador promueve la formación de un apo-represor que puede formar un complejo represor. Sin el co-represor, la síntesis de la enzima procede. El gene regulador y el operador pueden simultáneamente controlar la síntesis de diversas enzimas.

El modelo previamente descrito, está basado en el operon *Lac*, involucrado en la asimilación de lactosa por *E. coli*,²³ los genes que participan en los mecanismos de inducción-represión catabólica para una cierta enzima o enzimas, se agrupan en un operón, en este caso, es el operón *Lac*, que codifica para la síntesis de β -galactosidasa, la β -galactosidopermeasa y una transacetiliasa.



Hay diversas variaciones sobre los mecanismos de control a nivel genético, entre los cuales el "efecto glucosa" forma parte de ellos; y al evaluarlo, se puede decir que la represión catabólica puede ocurrir en la ausencia de glucosa.

En general, el crecimiento microbiano en una mezcla de diferentes fuentes de carbono, involucra la asimilación sucesiva de las mismas.³⁶

CÉLULAS EUCARIOTAS

Al igual que en las bacterias, el fenómeno de inducción y represión catabólica de la expresión genética, se presenta en células eucariotas. Algunos ejemplos son los estudios de inducción de la treonina deshidrogenasa y el citocromo P-450 (caracterizados por su capacidad metabolizante de ciertas drogas) en células hepáticas de rata (Albóres, 1997; comunicación personal), así también existen estudios sobre inducción y represión de la invertasa y la maltasa por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.^{10,18}

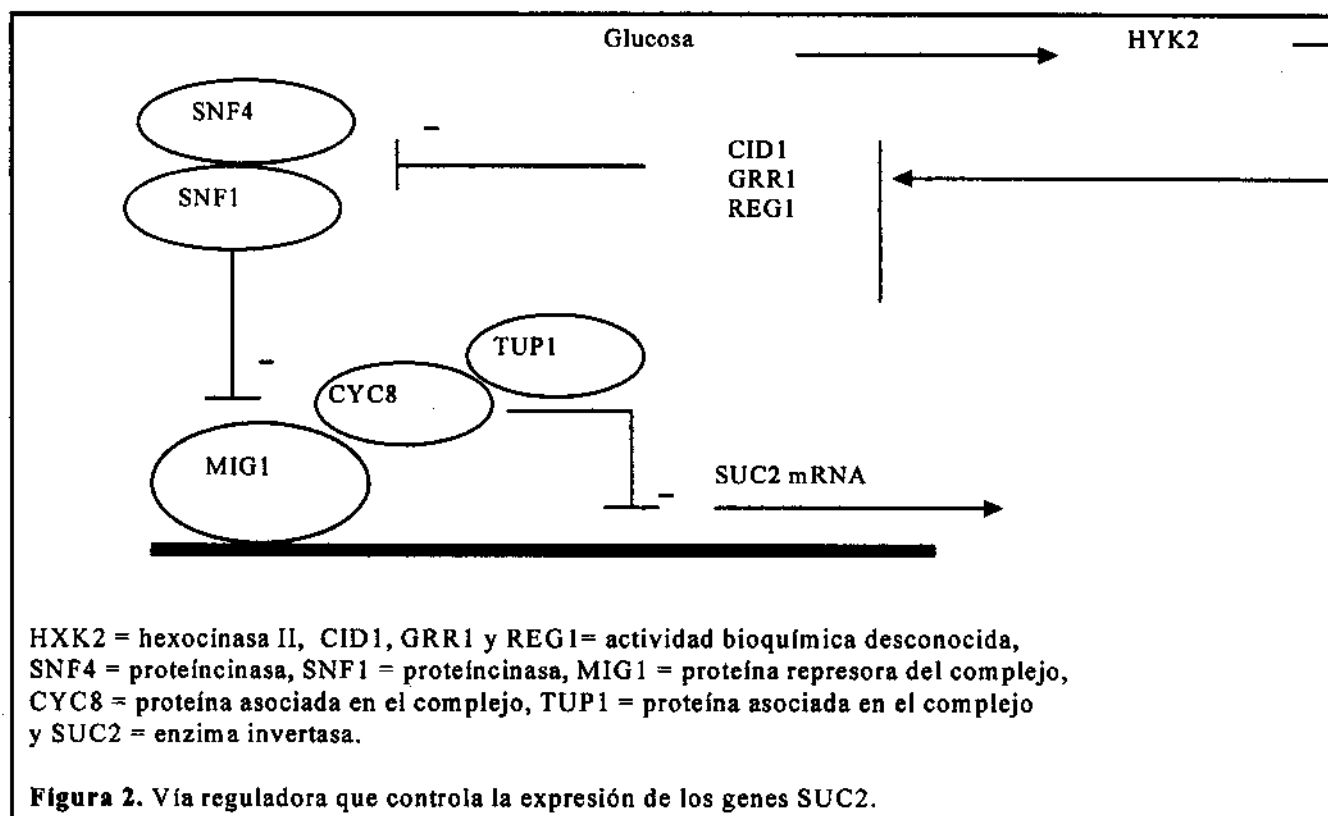
En microorganismos eucariotas, la levadura *S. cerevisiae* ha sido el modelo de mayor estudio.³² Se sabe que la utilización de ciertos azúcares por estos organismos se controla por represión catabólica; este fenómeno regula la expresión de los genes que participan en el proceso de fermentación a nivel de transcripción; la presencia de glucosa afecta el transporte de otros azúcares en la célula y por lo tanto, afecta la función reguladora de los mecanismos involucrados en la inducción enzimática.⁸

Tanto Entian,¹⁵ como Gancedo y Gancedo,¹⁹ demost

ron que la represión catabólica en células eucariotas y particularmente en *S. cerevisiae* consiste en un sistema regulador muy complejo, el cual según Carlson,⁸ aún no se ha estudiado a fondo por lo que su panorama es incompleto. Al parecer se conoce que difiere del de *E. coli* donde la señal molecular de falta de glucosa en el medio, es el AMPc, el cual activa una proteína (conocida como proteína activadora de catabolito), que participa en el proceso de activación de la transcripción de los operones relacionados. Al contrario, en *S. cerevisiae*, existen evidencias genéticas y bioquímicas de que el AMPc no es el efector directo para la represión catabólica,^{16,29} pues se ha encontrado que el rol principal lo juegan los productos de tres genes, el HXK2 que codifica para una proteína hexocinasa PII, cuya función de sensor le permite reconocer los niveles de glucosa presentes en el medio; el gen regulador de la fermentación de la sacarosa (SNF1) cuyo producto es una proteincinasa y se requiere para la desrepresión de muchos genes represibles por glucosa y el MIG1 que codifica para una proteína represora, que se enlaza a las regiones de genes represibles por glucosa, tal como el SUC2 (que codifica para la invertasa).⁴⁰

Los productos de estos tres genes participan afectan el transporte de azúcares, lo que sugiere que la fosforilación de proteínas es el efector principal en el mecanismo de la represión catabólica en *S. cerevisiae*.⁹

La Fig. 2 muestra la ruta propuesta por Trumbly⁴⁰ en la que se involucra la participación de los genes mencionados en la expresión del gene SUC2, el cual pertenece a una familia de genes SUC que codifican para la enzima invertasa, que hidroliza la sacarosa a sus monosacáridos.



HXK2 = hexocinasa II, CID1, GRR1 y REG1= actividad bioquímica desconocida, SNF4 = proteínquinasa, SNF1 = proteínquinasa, MIG1 = proteína represora del complejo, CYC8 = proteína asociada en el complejo, TUP1 = proteína asociada en el complejo y SUC2 = enzima invertasa.

Se han logrado progresos enormes en el entendimiento de los sistemas específicos involucrados en este fenómeno, y el uso de análisis genéticos y bioquímicos ha permitido considerables avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan este fenómeno en *S. cerevisiae*.^{8,32,40}

Allen y colaboradores¹ aislaron y caracterizaron bioquímica y genéticamente a mutantes de *Neurospora crassa* resistentes a represión catabólica por la desoxiglucosa. Elorsa y Arst¹⁷ estudiaron mutantes de *A. nidulans* resistentes a la represión catabólica por sorbosa. Antier y colaboradores² estudiaron mutantes de *A. niger* C28B25 hiperproductoras de pectinasas, las cuales no están sujetas a represión catabólica. Torres y colaboradores³⁹ demostraron la existencia de un transportador de baja afinidad cuando se hace crecer a *A. niger* en medios con altas concentraciones de glucosa.

De los estudios llevados a cabo sobre represión catabólica en mohos, resaltan los de Bailey y Arst⁶ y Arst y Bailey,⁵ en los que se evidenció que la proteína codificada por el gen regulador que codifica la represión (CREA) en *A. nidulans* juega un rol de proteína represora en el mecanismo de regulación genética por represión catabólica. Dicho gen fue clonado y secuenciado.^{11,12} Asimismo, Drysdale y colaboradores¹³ aislaron el gene CREA de *A. niger*, por hibridación cruzada usando el gene clonado de *A. nidulans*, con el fin de obtener un mayor conocimiento en el análisis comparativo de la represión catabólica en dichas especies

de *Aspergillus*.

Sin embargo, faltan muchos estudios aún para que se eluciden los mecanismos involucrados en el fenómeno de represión-inducción de síntesis de enzimas.

INDUCCION ENZIMATICA Y REPRESION CATABOLICA EN CMS Y CML.

Como se mencionó anteriormente, existen aspectos llamativos entre las diferencias fisiológicas del fenómeno de inducción-represión de enzimas producidas por CMS o por CML. Estas variaciones, consisten básicamente en diferentes patrones de inducción-represión en CML y CMS.

Los resultados obtenidos para la producción en CMS de α -amilasa por *B. licheniformis* M27,³⁴ de pectinasas por *A. niger*,³⁷ de tanasa por *A. niger* PKL 104²⁵ y los hallazgos recientes de George y colaboradores²⁰ al estudiar la producción de proteasas por *B. amyloquefaciens*, reflejan una aparente ausencia de la represión catabólica. Incluso en una contribución más reciente, Lekha y Lonsane²⁶ basándose en los estudios de Knudson en 1913²⁴ consideran que la producción de la tanasa no está sujeta a represión catabólica. Knudson²⁴ también reportó que la síntesis de la tanasa en *A. niger* no se reprime en presencia de sacarosa a una concentración de 0.3 M.

En estos trabajos, se ha hecho notar la capacidad de CMS para minimizar de forma muy significativa la repre-



TABLA 1 Resultados comparativos de los títulos de producción de enzimas microbianas por CML y CMS

Enzima	Microorganismo	CML (U/mL)	CMS	CMLS ^d (U/mL)	Referencia
α -amilasa	<i>Bacillus licheniformis</i> M27	570	19,550 U/ml	*	Ramesh y Lonsane, 1991 ³⁴
endo-poligalacturonasa	<i>Aspergillus niger</i> CH4	0.30	10.0 U/g soporte	*	Solis-Pereira y col., 1993 ³⁷
exo-poligalacturonasa	<i>Aspergillus niger</i> CH4	1.8	34.0 U/g soporte	*	Solis-Pereira y col., 1993 ³⁷
Tanasa	<i>Aspergillus niger</i> PKL 104	50	150.0 U/ml	30	Lekha y Lonsane, 1994 ²⁵
Proteasa	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	40	250,000 U/g soporte	*	George y col., 1997 ²⁰

sión catabólica, nunca antes reportada.

La Tabla 1 resume los principales resultados reportados en la literatura, y en la cual se observa que la glucosa, potencial causante de la represión catabólica, puede adicionarse a concentraciones muy elevadas sin que se presente la represión catabólica en CMS. Cabe mencionar que la glucosa es una de muchas moléculas represoras. En los estudios referidos en la Tabla 1, el tiempo de fermentación para alcanzar los mayores títulos de producción enzimática fue notablemente inferior en CMS que en el CML. La concentración de glucosa utilizada en ambos sistemas de fermentación, varía considerablemente en dichos estudios, ya que en CML, concentraciones superiores a 0.055-0.16 M, provocan una represión catabólica de las enzimas estudiadas, mientras que en CMS, se pudieron emplear concentraciones de glucosa superiores a 0.55 M. Las explicaciones existentes sobre este tipo de patrón del fenómeno de inducción-represión en CMS son escasas, y tal vez ninguna de éstas, por si solas puedan justificar completamente la presencia de este tipo de patrones, sino más bien, puede ser el resultado de varias o casi todas estas explicaciones.

Para el entendimiento de las causas que originan patrones de inducción-represión diferentes en CMS y CML, es necesario conocerlos primero. Con los resultados obtenidos por Ramesh y Lonsane³⁴ sobre la producción de α -amilasa, en el presente trabajo exponemos los patrones de inducción y represión en los sistemas de fermentación que evaluaron. La Figura 3, muestra un esquema con valores experimentales, obtenidos al dividir la actividad α -amilasa basal (medio control sin adición de glucosa) entre los niveles de producción obtenidos con las diferentes concentraciones de glucosa a un tiempo de 78 h. A medida que aumenta la concentración de la glucosa, la relación de inducción aumenta considerablemente, hasta llegar a un punto en que la relación de inducción cae drásticamente debido a la represión catabólica. Al comparar el patrón obtenido por CMS con el de CML, es importante hacer notar la capacidad de CMS para disminuir considerablemente la represión cata-

bólica de la síntesis de la α -amilasa. En CML, al aumentar la concentración de glucosa (superior a 0.5%) la represión es total, provocando una desadaptación total, pues se llega a valores inferiores que la actividad basal.

Debido a que en los trabajos mencionados anteriormente se evaluó el fenómeno de inducción-represión enzimática, en función de los títulos obtenidos de las enzimas estudiadas, en trabajos futuros el aspecto más relevante será la búsqueda experimental de los parámetros (relación y potencial de inducción, velocidad diferencial de síntesis enzimática, etc.) que modifican los patrones de producción en sistemas de CML y CMS, para lo cual, será necesario considerar los siguientes aspectos:

Cualquier microorganismo que sea seleccionado como modelo de estudio presentará una fisiología diferente en CMS y CML, debido a que las condiciones medioambientales difieren totalmente. En estudios relacionados sobre aspectos fisiológicos y bioquímicos de CMS, deben considerarse parámetros tales como la movilidad de agua libre, grado de empaque, actividad acuosa, entre otros, que influyen marcadamente en la constante de difusión de solutos, la cual se modifica y al final se resume en un problema de transporte de nutrientes. En este caso, se pueden formar zonas de baja concentración de sustrato, alrededor de las zonas catalíticas (las hifas para los mohos y las células vegetativas para levaduras y bacterias). Robson y colaboradores,³⁵ demostraron experimentalmente a nivel macroscópico y Giorgi y Shuler²¹ teóricamente, la formación de gradientes de glucosa alrededor de la colonia microbiana, debido a que el microorganismo consume el sustrato con el que se encuentra en contacto; en este caso, se pueden formar zonas de baja concentración del compuesto (halos) alrededor de las zonas catalíticas (en este caso, las hifas). López-Isunza y colaboradores,²⁸ reportaron que la evaluación de la formación de dichos gradientes en soportes sólidos es factible si se usan modelos matemáticos microscópicos en placas de agar, y resaltan que aun no se ha puesto en evidencia de forma experimental. Es importante remarcar

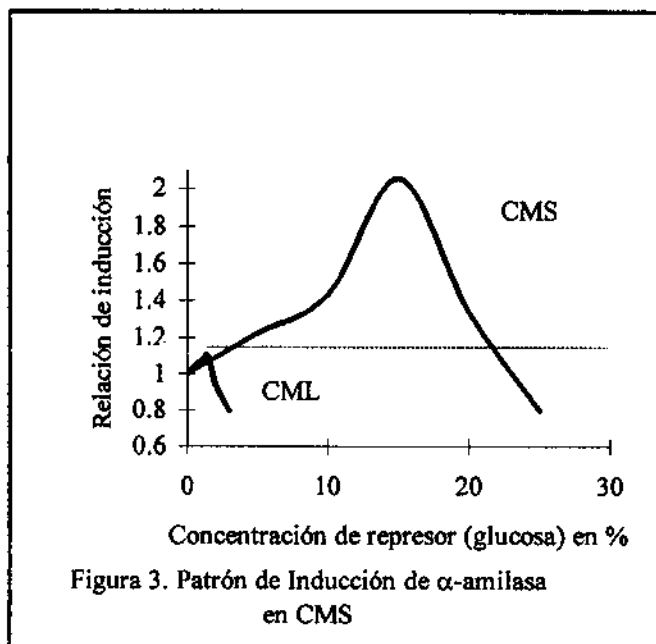


Figura 3. Patrón de Inducción de α -amilasa en CMS

que hasta el momento se desconoce el orden de concentración de los gradientes, la dirección en que se orientan y como se estabilizan entre otras cosas más. Es importante aclarar que para el CML se parte de que no hay formación de microgradientes, debido a la agitación inherente.

Se cree que la existencia de patrones de inducción-represión de la síntesis de enzima en CMS tan llamativos, se debe a diferencias entre los valores de velocidad de difusión y de consumo de los sustratos presentes, y esto se apoya con los resultados obtenidos por López-Isunza y colaboradores,²⁸ quienes suponen que los microgradientes del sustrato se forman si la velocidad de difusión del mismo en el medio es inferior a la velocidad de su consumo por el microorganismo.

Si en posteriores estudios se evalúa la influencia de factores tales como, la densidad del empaque de los reactores usados en el CMS, de la actividad de agua, de la concentración real de los sustratos en la vecindad de las células, de la afinidad de las enzimas por tales sustratos (inductores/represores catabólicos) sobre el patrón de inducción-represión de enzimas, se esperaría una modificación entre los valores y la relación de las velocidades de difusión y de consumo de sustratos. Una vez establecidos los valores de difusión y de consumo del sustrato en el medio sólido los resultados así obtenidos, detallarán la influencia que tiene cada factor evaluado en el CMS sobre los patrones de inducción-represión de la síntesis de enzimas.

Además para comprender perfectamente las diferencias en los patrones de inducción y represión de la síntesis enzimática se deberán considerar otros aspectos importantes como lo son los relacionados con la presencia de actividades proteolíticas que destruyan las enzimas inducidas y las diferencias en los coeficientes respiratorios en ambos procesos, además de los estudios dirigidos genéticamente

(obtención de mutantes resistentes a la represión catabólica) que permitan una mayor comprensión de estos fenómenos.

COMENTARIOS FINALES

Los estudios aquí presentados han reportado que los altos títulos de producción enzimática en la CMS se debe a una reducción de la represión catabólica. En ellos, se hacen sugerencias como las aquí discutidas, pues se desconocen aspectos tan importantes tales como, los patrones y relaciones de inducción y represión catabólica, así como las tasas diferenciales de síntesis enzimática de los sistemas comparados.

Esto sugiere que para poder establecer diferencias concretas al comparar sistemas tan marcadamente diferentes, primero deben considerarse los aspectos presentados en este trabajo. Una vez que se haya establecido la influencia de los diferentes factores mencionados se deberá ejecutar la búsqueda experimental que lleve a encontrar las respuestas sobre las cuales se logre un mayor entendimiento sobre los altos títulos obtenidos en la producción de enzimática en la CMS.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó durante el Programa de Doctorado en Biotecnología de la UAM-I con financiamiento del CONACYT y bajo la tutoría del Dr. Gustavo Viniestra-González (UAM-I), Dr. Christopher Augur (ORSTOM) y Dr. Ernesto Favela-Torres (UAM-I). El autor agradece los valiosos y críticos comentarios del Dr. Arnulfo Albóres del Departamento de Toxicología y Farmacología del CINVESTAV-IPN U. Zacatenco y el apoyo ofrecido por el M. B. Juan Romano Machado de la UAM-I.

REFERENCIAS

1. Allen, K. E., M. McNally, H. S. Lowendorf, C. W. Slayman, and S. J. Free. 1989. Deoxiglucosa-resistant mutants of *Neurospora crassa*: isolation, mapping and biochemical characterization. *J. Bacteriol.* 171:53-58.
2. Antier, P., A. Minjares, S. Roussos, M. Raimbault, and G. Viniestra-González. 1993a. Pectinase-hiperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28 B35 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 15:254-260.
3. Antier, P., A. Minjares, S. Roussos and G. Viniestra-González. 1993b. New approach selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation. *Biotechnol. Adv.* 2:53-58.
4. Anwar, M. N., M. Suto and F. Tomita. 1996. Isolation of mutants of *Penicillium purpurogenum* resistant to catabolite repression. *J. Microbiol. Biotechnol.* 5:684-687.
5. Arst, H. N. and C. R. Bailey. 1977. The regulation of



- carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. En J. E. Smith and J. A. Pateman (Eds). Genetic and physiology of *Aspergillus nidulans*. Academic Press, London, p131-146.
6. Bailey, C. R. and H. N. Arst. 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Eur. J. Biochem. 51:573-577.
 7. Bailey, J. E. and D. F. Ollis. 1977. Biochemical engineering fundamentals. McGraw-Hill Kogakusha, LTD. Tokyo, Japan.
 8. Carlson, M. 1987. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. J. Bacteriol. 169:4873-4877.
 9. Celenza, J. L. and M. Carlson. 1986. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein-kinase. Science. 233:1175-1180.
 10. Crabtree, B. and E. A. Newsholme. 1987. A systematic approach to describing and analyzing metabolic control systems. Trends Biochem. Sci. 12:4.
 11. Dowzer, S. D. and J. M. Kelly. 1989. Cloning of CreA gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. Curr. Genet. 15:457-459.
 12. Dowzer, S. D. and J. M. Kelly. 1991. Analysis of the CreA gene a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. 2:5701-5709.
 13. Drysdale, M. R., S. E. Kolse and J. M. Kelly. 1993. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, CreA. Gene 130:241-245.
 14. Emanvilova, E. I. and K. Toda. 1984. Alpha amilase production in batch and continuous culture by *Bacillus clodolyticus*. Appl. Microbiol. Technol. 19:301-305.
 15. Entian, K. D. 1986. Glucose repression: a complex regulatory system in yeast. Microbiol. Sci. 3:366-371.
 16. Eraso, P. and J. M. Gancedo. 1984. Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of cAMP. Bull. Biochem. 141:195-198.
 17. Elorsa, M. and V. Arst. 1971. Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genetic. 111:185-193.
 18. Falvey, E. and U. Schibler. 1990. How are the regulators regulated?. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J. 5:309.
 19. Gancedo, J. M. and C. Gancedo. 1986. Catabolite repression in mutants of yeast. FEMS Microbiol. Rev. 32:179-187.
 20. George, S., V. Raju, V. Subramanian and K. Jayaraman. 1997. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. Bioprocess Eng. 16:381-382.
 21. Gorgiou, G. and M. L. Shuler. 1986. A computer model for growth and differentiation of a fungal colony on solid substrate. Biotechnol. Bioeng. 28:405-416.
 22. Gottschalk, G. 1982. Bacterial metabolism. Regulation of metabolism in bacteria. Ed, Mir, Moscú, Rusia
 23. Jacob, F. and J. Monod. 1961. Genetic Regulatory mechanisms in protein systems. J. Mol. Biol. 3:318-356.
 24. Knudson, L. 1913. J. Biol. Chem. 14:159-207.
 25. Lekha, P. K. and B. K. Lonsane. 1994. Comparative titres, location and properties of tanni acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid state, liquid surface and submerged fermentations. Proc. Biochem. 29:497-503.
 26. Lekha, P. K. and B. K. Lonsane. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. Adv. Appl. Microbiol. 44:215-260.
 27. Livshits, V. A. and V. G. Debabov. 1988. Modern methods of creation of microbiological strains of industrial interest. Ed. Alta Escuela. Moscú, Rusia, p33-38.
 28. López-Isunza, F., C. P. Larralde-Corona and G. Viniégra-González. 1997. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. Chem. Eng. Sci. 52 15:2629-2639.
 29. Matsumoto, K., T. Yoshimatsu and Y. Oshima. 1983. Recessive interactions conferring resistance to carbon catabolite repression of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 153:1405-1414.
 30. Magazanick, J. 1942. Modern methods of creation of microbiological strains of industrial interest. En Series in Biotechnology. Debabov y Livshits (Ed.). De. Alta Escuela, Moscú, Rusia.
 31. Monod, J., F. Jacob and F. Gros. 1942. In the structure and biosynthesis of macromolecules. Biochem. Soc. Symp. 21. Cambridge University Press.
 32. Mwesigye, P. and J. P. Barford. 1996. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Appl. Microbiol. 42:297-306.
 33. Ramesh, M. V. and B. K. Lonsane. 1987. Solid state fermentation for production of α -amilasa by *Bacillus megaterium* 16M. Biotechnol. Lett. 9:323-328
 34. Ramesh, M. V. and B. K. Lonsane. 1991. Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amilase production by *Bacillus licheniformis* M27. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:591-593.
 35. Robson, G. D., S. D. Bell, P. J. Kuhn and A. P. J. Trinci. 1987. Glucose and penicillin concentrations in agar medium below fungal colonies. J. Gen. Microbiol. 133:361-367.
 36. Scrimgeour, K. G. 1977. Chemistry and control of enzyme reactions. Academic Press, Inc. London.
 37. Solís-Pereira, S., E. Favela-Torres, G. Viniégra-González and M. Gutierrez-Rojas. 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:36-41.
 38. Torres, N. V., J. M. Riol-Cimas, M. Wolscheck and C. P. Kubicek. 1996. Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentration. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44:790-794.
 39. Trumbly, R.J. 1991. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 173:15-21.
 40. Viniégra-González, G. 1997. Strategies for the selec-



tion of molds strains geared to produce enzymes on solid substrates. En E. Galindo and O. T. Ramirez (Eds),

Advances in Bioprocess Engineering. II, 123-135. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.