

ACTIVIDAD CELULOLITICA DE CEPAS DE *Aspergillus niger* y *A. flavus* AISLADAS DE SUELOS CON CULTIVO DE TRIGO Y TRATAMIENTO HERBICIDA

(*Cellulolytic activity of Aspergillus niger and A. flavus strains isolated from soils with wheat cultivation and herbicide treatment*)

Tell, V. S. A.¹; Bottai, H. M.²

¹ CEREMIC (Centro de Referencia de Micología)
Fac. Cs. Bioq. y Farm. - Universidad Nacional de Rosario
Rosario, Santa Fe. Argentina

² Cátedra de Estadística. Fac. Cs. Bioq. y Farm. - Universidad
Nacional de Rosario. Rosario, Santa Fe. Argentina

Palabras Clave: Actividad celulolítica, trigo, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, herbicidas.

Key words: Cellulolytic activity, wheat, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, herbicides.

RESUMEN

Se estudia la actividad celulolítica de cepas de *Aspergillus niger* y *A. flavus* aisladas de suelo del sur de la provincia de Santa Fe, sembrado con trigo y tratado con Metsulfurón-metil+Dicamba. Dichas cepas fueron las más frecuentes en un muestreo que abarcó distintas etapas del cultivo de trigo en 1994 y mostraron a su vez, variaciones en su frecuencia a lo largo del mismo. Nuestro objetivo fue conocer si dichas variaciones de frecuencia se correlacionan con cambios en la actividad celulolítica de las mismas. Se trabajó con 3 cepas de *A. niger* y 2 de *A. flavus*. En los filtrados de los cultivos, se determinó: peso seco, proteínas solubles, producción de exoglucanasas frente a la celulosa cristalina, endoglucanasas frente a carboximetilcelulosa y celobiasas extracelulares.

En *A. niger*, no hubo una correlación clara entre frecuencia y actividad enzimática, sólo se observó que las cepas de *A. niger* de mayor frecuencia (superior al 50%) tuvieron también mayor actividad. En *A. flavus*, en cambio, se observó una correlación inversa.

INTRODUCCION

Los hongos celulolíticos pueden degradar la celulosa mediante la acción sinérgica de un sistema multienzimático extracelular que cataliza la hidrólisis del polímero a unidades de glucosa y está sujeto a inducción

SUMMARY

We studied the cellulolytic activity of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains isolated from soil sown with wheat and treated with Metsulfuron-methyl+Dicamba, in the South of the Province of Santa Fe. These strains were the most frequent in a sampling which included different stages of wheat cultivation in 1994, and they, in turn, showed some variations in their frequency all throughout. Our purpose was to know whether the said variations in frequency of these strains are correlated with changes in their cellulolytic activity. We worked with three strains of *A. niger* and two *A. flavus*. In the culture filtrates we determined: dry weight, soluble proteins, production of exoglucanases in front of crystalline cellulose, endoglucanases in front of extracellulare carboxymethylcellulose and cellobiases.

There was no a clear correlation between frequency and enzymatic activity in *A. niger* yet it could be observed that those *A. niger* strains with the highest frequency (higher than 50%) revealed a greater activity. On the contrary, a reverse correlation could be observed in *A. flavus*.

y represión catabólica, siendo el inductor real un producto soluble de la hidrólisis de celulosa (1, 3, 5, 19, 21, 25, 27). Así se ha comprobado que el agregado de celulosa en los medios de cultivo de hongos, tiene efecto inductor y el agregado de glucosa produce represión catabólica (6, 19).

La inducción in vitro de celulasas por celobiosa, se ha comprobado para diversos hongos: *Trichoderma reesei* (11, 12, 14, 25), *Sporotrichum thermophile* (4) entre otros, aunque para el caso de *T. reesei* se ha comprobado que, dependiendo de la concentración, la celobiosa puede actuar como inductor o como represor de la síntesis de celulasas (30). Sternberg (27), determinó que no se producen celulasas cuando *T. reesei* crece con celobiosa como fuente de C. La lactosa (13) y sacarosa (26), han sido citados como inductores de celulasas.

Respecto de la represión por catabolitos resultantes de la hidrólisis de la celulosa, se ha comprobado que la glucosa o la celobiosa, limitan o inhiben la producción de enzimas celulolíticas en *Verticillium albo-atrum* (5), *Trichoderma viride* (17), *T. reesei* (26), *Sporotrichum thermophile* (4).

Para *Aspergillus niger*, se comprobó que las celulasas sufrieron represión catabólica en presencia de glucosa y glicerol, acompañada por una brusca caída del pH en el medio de fermentación, y que esta inactivación podía subsanarse mediante la suplementación de fuentes nitrogenadas (7).

Las celulasas fúngicas están constituidas básicamente por tres grupos de enzimas:

1. Endoglucanasas (1,4-beta-D-glucan 4-glucanohidrolasas), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa por cortes al azar sobre la cadena glucosídica de la fracción amorfa, liberando cadenas más cortas de oligosacáridos.

2. Exoglucanasa (1,4-beta-D-glucan celobiohidrolasas y 1,4- -D glucan glucohidrolasas), que liberan respectivamente celobiosa o glucosa a partir de los extremos no reductores de la región cristalina de la celulosa.

3. Celobiasas (beta-D glucósido glucohidrolasas) que separan la celobiosa en dos unidades de glucosa, y se incluyen dentro del grupo más amplio de las beta-glucosidas.

La principal diferencia entre endo y exocelulasas es el grado en el cual sus sitios activos son accesibles al sustrato (24).

Además, todas las celulasas fúngicas estudiadas hasta el momento presentan isoenzimas, dependiendo el número de éstas de la cepa utilizada y de la forma en que la misma ha sido cultivada (31).

Esta actividad enzimática está condicionada por múltiples factores variables como: temperatura, humedad, pH, presencia de otros carbohidratos, proporción de lignina relacionada al tipo de estructura en el material vegetal (20), presencia de cationes metálicos (19), fuente nitrogenada (18), grado de cristalinidad de la celulosa (10), entre otros.

Alvarez & Rossi (2), estudiaron la producción de celulasas en cepas de *A. niger* y *Trichoderma harzianum*,

aisladas de suelos tratados con Fluroxypyr (herbicida post-emergente), en los cuales habían registrado una disminución de la frecuencia de dichas cepas en relación a la alcanzada en muestras testigo. No encontraron diferencias en la actividad celulolítica de *A. niger* pero sí en *T. harzianum*, que mostró una disminución de dicha actividad en suelo con Fluroxypyr.

En este trabajo, se estudió la actividad celulolítica de cepas de *A. niger* y *A. flavus* aisladas de suelo de parcelas sembradas con trigo, que recibieron la aplicación del herbicida post-emergente Metsulfurón, metil+ Dicamba, para conocer si dichas variaciones en la frecuencia de estas cepas se correlacionan con alguna variación en la capacidad celulolíticas de las mismas. Dichas cepas resultaron ser las de mayor frecuencia durante el muestreo realizado en 1994, abarcando distintas etapas del cultivo de trigo, desde el macollaje hasta la post-cosecha. Tanto las cepas de *A. niger* como las de *A. flavus* mostraron variaciones en su frecuencia a lo largo del muestreo.

MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron tres cepas de *A. niger* (denominadas 1, 2 y 3) y dos de *A. flavus* (denominadas 4 y 5) correspondientes a distintos tiempos del muestreo y que presentaban variaciones de frecuencia en el tiempo. Estas son, para *A. niger*: **cepa 1**: aislada en el momento de aplicación del herbicida (tiempo 0), con 100% de frecuencia; **cepa 2**: aislada 14 días después de aplicado el desmalezante, con una frecuencia del 67% y **cepa 3**: correspondiente a los 90 días posteriores a la incorporación del agroquímico, con la menor frecuencia registrada: 33%. Para *A. flavus* se trabajó con: **cepa 4**: aislada una semana después de aplicado el herbicida, con 22% de frecuencia y **cepa 5**: con una frecuencia del 100%, correspondiente a 90 días posteriores a la aplicación del agroquímico.

Determinación de actividad del complejo celulasa

Para el estudio de la actividad celulolítica, las colonias de *A. niger* y *A. flavus* se mantuvieron en Agar Czapek durante un período de 5 y 7 días respectivamente a 25° C. De acuerdo a curvas de crecimiento realizadas previamente, se observó que el valor máximo de la fase exponencial se alcanzó al 5° día para *A. niger* y al 7° día para *A. flavus*, tiempo que se tuvo en cuenta para la preparación del inóculo de siembra para los ensayos enzimáticos. Ese inóculo consistió en una suspensión de conidios en agua destilada estéril con una concentración de 1×10^4 a 1×10^5 conidios por ml.

El desarrollo de las cepas y la inducción del complejo celulasas, se hizo por siembra de 1 ml de ese inóculo por duplicado en 50 ml del medio base de Theodorou

et al. (28), con un pH final de 5,5 reemplazando la carboximetilcelulosa por celulosa cristalina (CC) 500 mg en el medio indicado, que se distribuyó en Erlenmeyer de 125 ml. Se incubaron a 28° C, en agitador mecánico a 120 r.p.m., durante 10 días. Cada 48 horas se procedió al filtrado de los cultivos mediante membrana Sartorius 0,2µm. Se determinó el peso seco, las proteínas solubles por filtrado, las exoglucanasas, endoglucanasas (carboximetilcelulasas) y beta- glucosidasas (celobiasas).

Determinación del peso seco

Representa el peso micelial por cultivo (50 ml del medio inductor por Erlenmeyer), previamente secados en estufa a 37°C hasta peso constante y se calcula en mg / tiempo de desarrollo.

Dosaje de proteínas solubles de los filtrados de cultivo.

Las proteínas solubles fueron dosificadas por el método de Henry (9) y se expresan como mg/ ml de filtrado.

Medición de la actividad enzimática

Las cepas seleccionadas fueron *A. niger* y *A. flavus*.

En todos los casos se utilizaron alícuotas de los sobrenadantes de cultivos.

a) Exoglucanasas: 2 ml de cada filtrado llevado a pH 4,8, con 2 ml de buffer de citrato con un pH 4,8 y 20 mg de celulosa cristalina (CC), se incubaron a 50°C durante 60 minutos (2). Previa centrifugación, en el sobrenadante se dosificaron los azúcares reductores por el método de Somogyi (23)-Nelson(16), utilizando glucosa 1 mg/ml como standard. Los azúcares reductores se expresaron como µmoles de glucosa por ml de filtrado (2).

b) Endoglucanasas (carboximetilcelulasas): 2 ml de cada filtrado, más 1 ml de carboximetilcelulosa (Grado B-50 I.C.I. Ltd. Cheshe IK) al 2%, a 50°C durante 60 m. Los azúcares reductores se valoraron como en el ensayo anterior y se expresaron como micromoles de glucosa por ml de filtrado (2).

c) Beta-glucosidasas (celobiasas): 5 ml de cada filtrado, más 5 ml de celobiosa 2% en buffer acetato de sodio 0.1 M pH=5, se incubaron a 50°C durante 60 m. Con una alícuota se determina glucosa residual por el método de glucosa oxidasa (Wiener lab.) por colorimetría de Trinder (29). Los resultados se expresan como µmoles de glucosa por ml de filtrado.

Estudio estadístico.

Los factores estudiados fueron: cepa (1,2 y 3 para *A. niger*, y 4 y 5 para *A. flavus*) y tiempo de incubación del cultivo (48, 96, 144, 192 y 240 horas).

Las variables estudiadas para ambas especies de *Aspergillus* fueron: peso seco del micelio (mg/filtrado de

cultivo), proteínas del sobrenadante (mg/ml) para medir crecimiento y concentración de azúcares reductores (µmol/ml), producidos por tres enzimas celolíticas: endo-celulasa (carboximetilcelulasas), exocelulasas y glucosidasas (celobiasas).

Con estas variables, para cada cepa y cada tiempo de incubación, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significación variable, especificado para cada caso.

En caso de ser necesario, se aplicó la técnica de comparaciones múltiples de Scheffé (22).

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de peso seco

Las curvas de crecimiento de las cepas estudiadas de acuerdo a los datos promedio del peso seco micelial, se observan en la Figura 1 para *A. niger* (panel A) y para *A. flavus* (panel B).

a) Crecimiento de *A. niger*. El mayor crecimiento para *A. niger* corresponde a la cepa 2 y el menor a la 1. El tiempo de agotamiento del sustrato se observó después de las 192 horas, al cabo de las cuales se registra una disminución de crecimiento para las tres cepas.

La tabla ANOVA permite concluir la existencia del efecto interacción entre cepa y tiempo de incubación ($p < 0,0005$).

Se prosiguió el análisis estadístico probando el efecto del factor cepa en cada uno de los tiempos considerados.

Del cuadro correspondiente, se desprende la existencia de una diferencia significativa en los valores de peso seco promedio de las tres cepas, para los distintos tiempos, excepto a las 96 h.

La aplicación de la técnica de Scheffé (22) permite concluir que el promedio de la variable en estudio es significativamente mayor en la cepa 2 que en las 1 y 3, no existiendo diferencia significativa entre estas últimas para todos los tiempos, excepto a las 144 h.

b) Crecimiento de *A. flavus*. La cepa 5, muestra un crecimiento levemente superior y el tiempo de agotamiento del sustrato sería también después de las 192 horas.

De la tabla ANOVA correspondiente se desprende que existe variación entre cepas ($p < 0,01$).

Contenido de proteínas solubles en los filtrados del cultivo

La Figura 2, representa el contenido de proteínas solubles en los filtrados de cultivo para cepas de *A. niger* (panel A) y *A. flavus* (panel B). Se puede observar que, tal como ocurre con el peso seco, las cepas de *A. flavus* registran valores menores que las de *A. niger*.

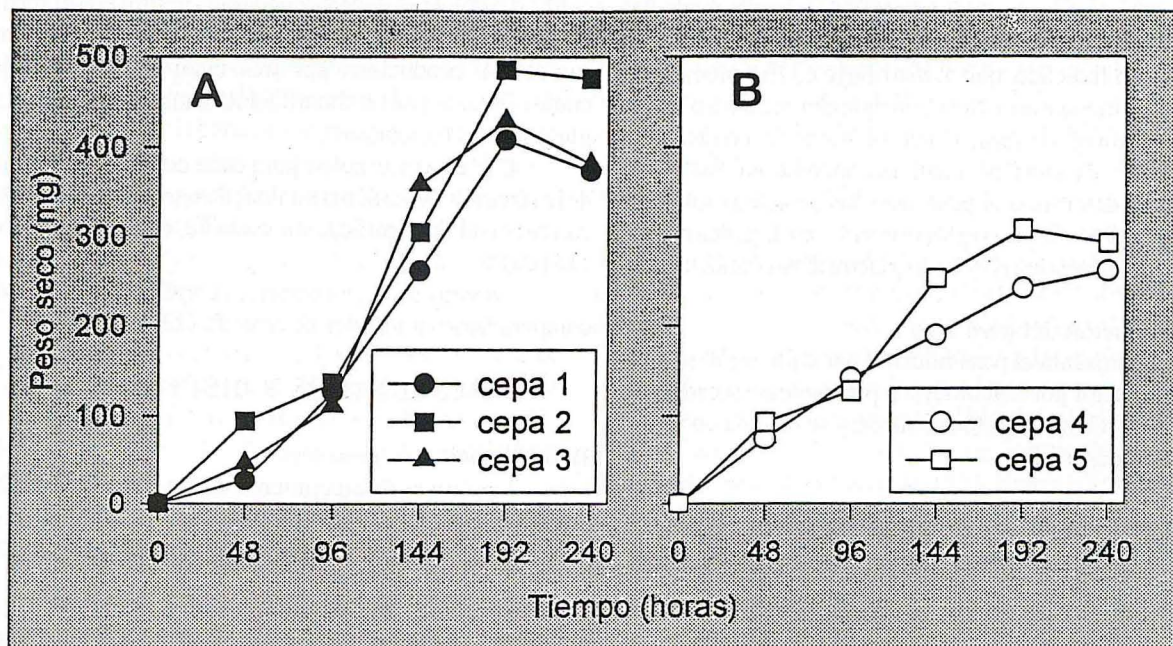


Fig. 1: Peso seco de la masa micelial correspondiente a *Aspergillus niger* (Panel A) y *A. flavus* (Panel B)

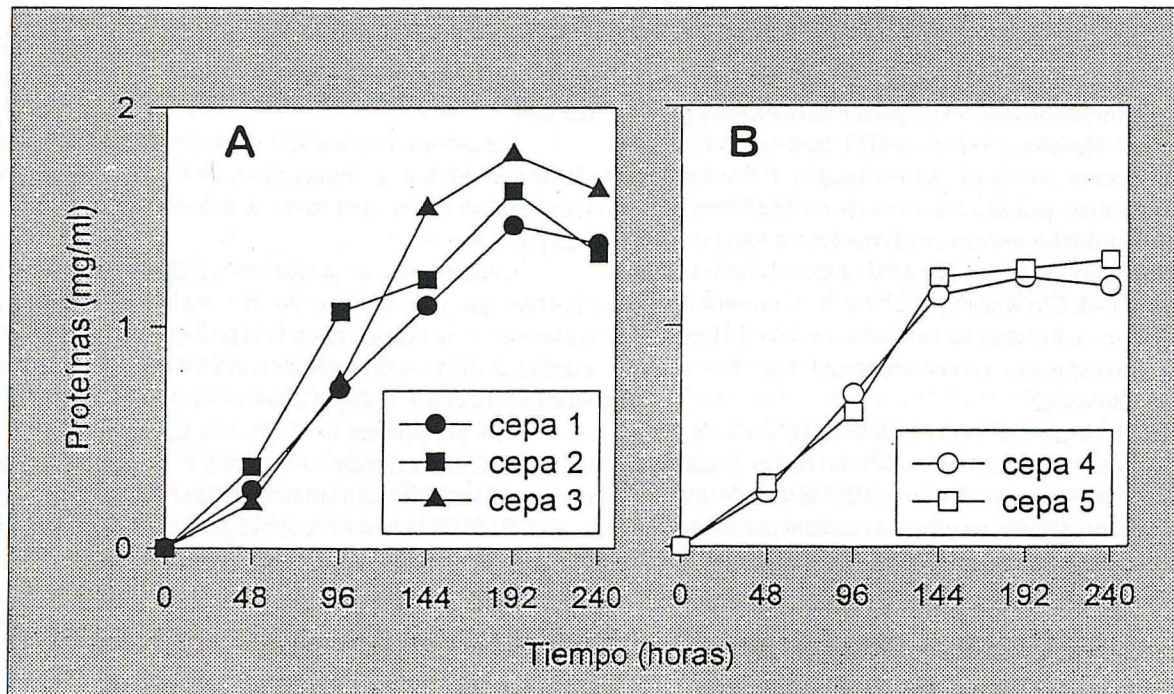


Fig. 2: Proteínas solubles en el filtrado de cultivo para *Aspergillus niger* (Panel A) y *A. flavus* (Panel B)

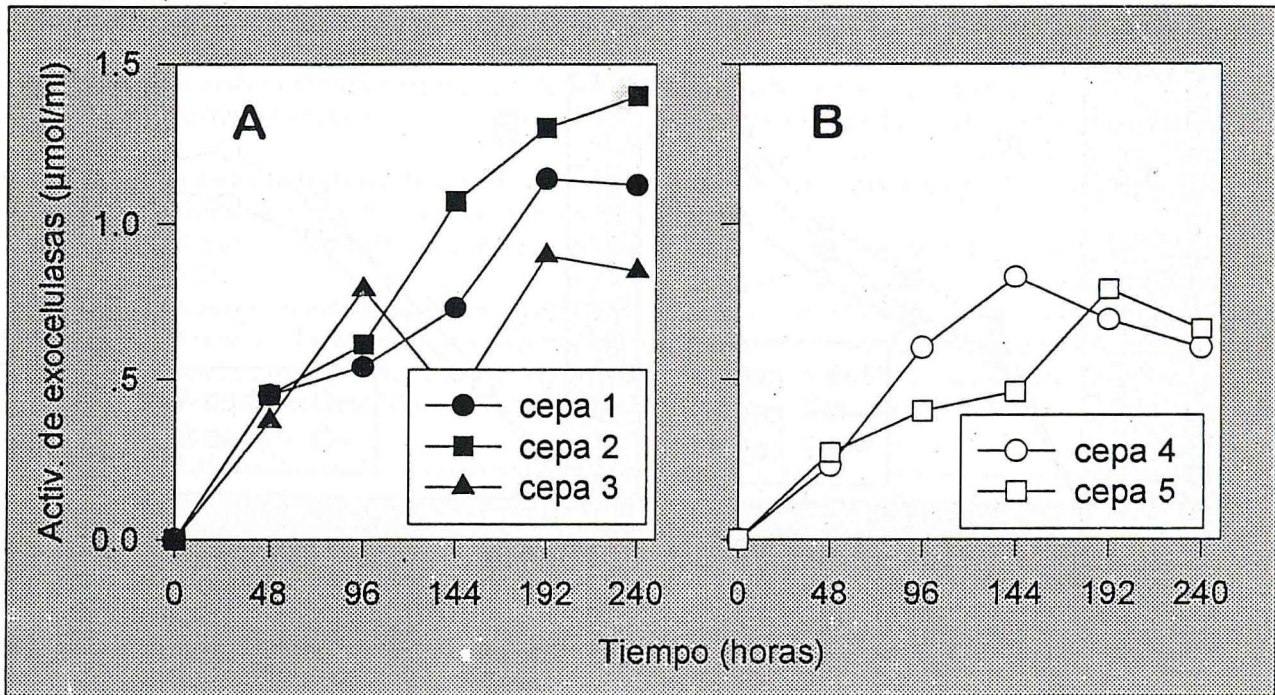


Fig. 3: Actividad de exocelulasas producidas por *A. niger* (A) y *A. flavus* (B)

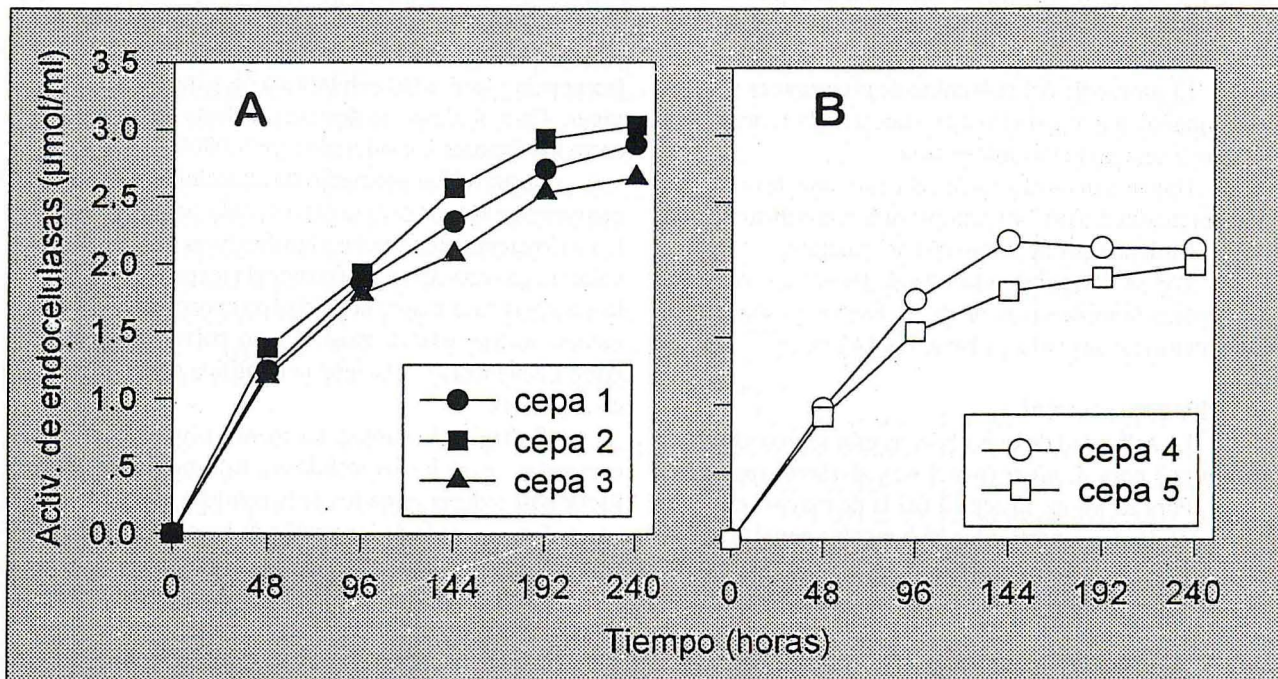


Fig. 4: Actividad de endocelulasas producidas por *A. niger* (A) y *A. flavus* (B)

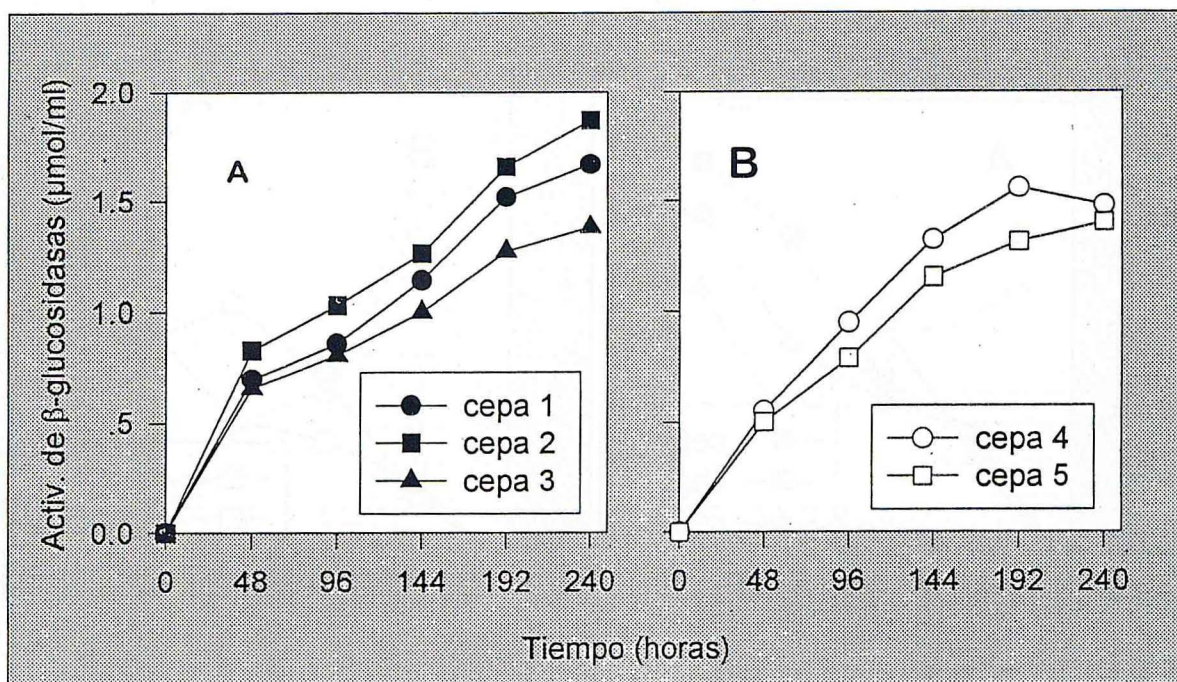


Fig. 5: Actividad de β -glucosidasas producidas por *A. niger* (A) y *A. flavus* (B)

Entre estas últimas, no parece notarse diferencia hasta las 48 horas, a partir de las cuales la cepa 3 exhibe la mayor velocidad de crecimiento. Esta diferencia entre cepas fue significativa ($p < 0.001$).

El promedio del contenido de proteínas es significativamente mayor para la cepa 3 que para la 1, ocupando la cepa 2 una posición intermedia.

Hay una disminución en el contenido de proteínas del sobrenadante a las 240 h, lo que indica una disminución del crecimiento por agotamiento del sustrato.

Por su parte, las cepas de *A. flavus* no muestran diferencias significativas entre sí. Ambas presentan un incremento en sus valores hasta las 144 horas.

Actividad de exocelulasas

La actividad de exocelulasas está representada en la Figura 3 para *A. niger* (panel A) y *A. flavus* (panel B).

Para *A. niger*, la cepa 2 fue la de mayor actividad de exocelulasas, excepto a las 96 h que fue para la cepa 3. Esta última, fue la que mostró menor actividad enzimática, y la cepa 1 ocupó una posición intermedia, según muestra la Figura 3 (panel A).

Se observó efecto de interacción significativo entre cepa y tiempo ($p < 0.00001$).

No existe efecto cepa para las 48 h, pero sí en los restantes.

La cepa de menor frecuencia (cepa 3 con 33%), fue

la que registró menor actividad de exocelulasas, pero la de mayor frecuencia (cepa 1 con 100%) no fue la de mayor actividad, sino que ocupó una posición intermedia.

Aparentemente no existe correlación entre frecuencia y actividad celulolítica de exocelulasas en *A. niger*. Para *A. flavus* se detectó un efecto de interacción entre los factores considerados ($p < 0.00005$).

La actividad promedio de exocelulasas es significativamente mayor para la cepa 4, sólo para las 96 y 144 h, no existiendo diferencias significativas en los restantes valores. La cepa de menor frecuencia (cepa 4 en 22%), fue la que registró la mayor actividad de exocelulasas y la 5 la menor, lo que parece mostrar una correlación inversa entre frecuencias y actividad celulolítica de exocelulasas en *A. flavus*.

Se registró siempre un menor nivel de actividad enzimática para las exocelulasas, tal vez debido a una fuerte adsorción enzimática de la celulosa cristalina (CC) o a un distinto grado de formación de las correspondientes enzimas.

La adsorción de las celulasas al sustrato se debe a interacciones hidrofóbicas y se comprobó que se da mayor adsorción de las celulasas a pH bajos, tal vez por la presencia de grupos carboxilo con carga negativa en la celulosa, que resulta en una interacción electrostática de la enzima con el sustrato (8).

Con respecto al uso de CC como sustrato, Hoshino

y col. (10) demostraron que las exocelulasas sacarificaron la celulosa con distinto grado de cristalinidad más efectivamente que las endocelulasas, y que la sacarificación aumentó para ambas enzimas a medida que decrecía el grado de cristalinidad de la celulosa.

Actividad de endocelulasas (carboximetilcelulasas)

La actividad de endocelulasas están representadas en la Figura 4, para las cepas de *A. niger* (panel A) y *A. flavus* (panel B).

Para *A. niger* se observa que la mayor actividad se registra en la cepa 2 y la menor en la 3. Las tres cepas presentan valores significativamente distintos entre ellas para todos los tiempos considerados, según se desprende del análisis estadístico.

Para *A. flavus* la cepa 4 tiene una actividad enzimática siempre mayor a la cepa 5, excepto a las 48 h. Esta diferencia es significativa ($p < 0,001$).

Nuevamente se observa en *A. niger*, una falta de correlación entre frecuencia y actividad de endocelulasas, pues la cepa 2 ocupa una posición intermedia en circunstancias que tiene la mayor frecuencia. En *A. flavus* vuelve a observarse una correlación inversa, pues la cepa de mayor frecuencia ($n^{\circ}5$), tiene la menor actividad de endocelulasas.

Actividad de beta-glucosidasas (celobiasas)

Según se observa en la Figura 5 para *A. niger* (panel A), la mayor actividad de beta-glucosidasas corresponde a la cepa 2 y la menor a la 3. En *A. flavus* (Fig. 5, panel B) la cepa 4 es la que presentó mayor actividad enzimática. Estas diferencias fueron significativas ($p < 0,001$).

Para *A. niger*, del cuadro ANOVA, se desprende la existencia del efecto interacción entre los factores ($p = 0,0001$). Se procedió a efectuar los dos estudios correspondientes, en base a los que podemos comentar que:

- Existe efecto tiempo para cada cepa. Luego de aplicada la técnica de contrastes, se concluyó que las cepas 1 y 2 presentaron un patrón de actividad enzimática similar.

- Existe efecto del factor cepa para todos los tiempos considerados.

Luego de aplicada la técnica de contrastes, observamos que la actividad promedio de b-glucosidasas a las 48 y 96 h, es significativamente mayor en la cepa 2 que en las restantes, que no difieren entre sí. A las 144, 192 y 240 h, difieren significativamente todas entre sí, siendo la cepa 2 la de mayor actividad, seguida por la 1 y la 3 en orden decreciente.

Para *A. flavus* el cuadro ANOVA permite detectar la existencia del efecto interacción entre los factores ($p = 0,0001$). Se procedió a analizarlos por separado, con

los siguientes resultados:

- Existe efecto tiempo en las dos cepas. La técnica de contrastes permite demostrar un patrón de actividad enzimática similar para ambas cepas.

- No existe diferencia significativa entre cepas a las 48 h. En todos los otros tiempos considerados, la actividad promedio de b-glucosidasas es significativamente mayor para la cepa 2.

También se observó la falta de correlación en *A. niger*, entre frecuencia y actividad de b-glucosidasas, pues la cepa 1 que tiene la mayor frecuencia presenta una actividad intermedia entre las otras cepas. En *A. flavus* sigue observándose una correlación inversa pues la cepa 4, que es la de menor frecuencia, presenta la mayor actividad enzimática.

La cepa 5, a pesar de haber presentado mayor crecimiento que la 4, según las curvas de peso seco, demostró tener menor actividad enzimática para todas las enzimas.

Se cree que al menos algunas de las celulasas fúngicas se encuentran unidas a la pared hifal (15). Tal vez esto puede haber ocurrido para la cepa 5, ya que de acuerdo al crecimiento observado, se esperaba una mayor actividad enzimática, pero las enzimas podrían haber quedado retenidas en los sólidos del cultivo, por lo que al realizar el dosaje en el sobrenadante, no se detectaron.

CONCLUSIONES

En *A. niger*, no se observó una correlación clara entre frecuencia y actividad enzimática, debido a la cepa 1 que siempre apareció en posición intermedia, teniendo la mayor frecuencia. En *A. flavus* en cambio, siempre se observó una correlación inversa entre estos 2 parámetros.

Las tres cepas de *A. niger* registraron, para exocelulasas y endocelulasas, niveles más altos de actividad que las cepas de *A. flavus*, lo que indica que la primera es una especie con muy buena capacidad celulolítica. Esta es una de las razones que explican su dominancia a lo largo del muestreo.

En general para *A. niger* a las 192 h, se registró el mayor crecimiento (mayor peso seco), mayor contenido de proteínas de sobrenadante y mayor actividad de exocelulasas. En cambio el máximo de actividad de endoglucanasas y beta-glucosidasas se registra a las 240h.

Considerando la frecuencia de cada una (cepa 1: 100%; 2: 67% y 3: 33%), podemos concluir que existe una cierta correlación entre frecuencia y actividad enzimática, pero sin duda entran en juego otras variables, desde las acciones antagónicas entre cepas, factores climáticos, condiciones fisico-químicas del suelo, agroquímicos, nivel de toxicidad y persistencia, etc.

Con respecto al tiempo de aplicación del herbicida,

la cepa 1 corresponde al tiempo 0, la 2 a los 14 días y la 3 a los 90 días posteriores. Si analizamos la correlación entre esta variable y la actividad enzimática, podemos deducir que el agroquímico no parece producir ninguna alteración en el sistema celulasas de *A. niger*, ni en la frecuencia del mismo, ya que en el momento de aplicación (tiempo 0) y a los 14 días posteriores, donde se supone un mayor efecto del herbicida, no se produce disminución en la frecuencia ni en la actividad enzimática del hongo. Esto nos conduce a pensar que su buena actividad, sería junto a otras características metabólicas y a una buena capacidad multiplicativa (esporulación abundante, como se sugirió de acuerdo a resultados anteriores), una estrategia eficaz para su dominancia en los suelos.

En *A. flavus*, no se observaron alteraciones en el

complejo celulasas en el tiempo de aplicación del herbicida, pero sí en su frecuencia.

No es representativo analizar una sola variable para explicar los cambios de frecuencia y de actividad enzimática en un sistema tan complejo como el suelo, por eso es fundamental considerar los otros factores mencionados anteriormente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parte de una Beca de Iniciación de CONICET.

Quiero agradecer especialmente a las Dras. Blanca C. de Bracalenti y Delia P. Alvarez, directora y co-directora de dicha beca, por su apoyo y colaboración, y por sus valiosos aportes, frutos de su vasta y reconocida trayectoria.

REFERENCIAS

1. Alexander, M. (1977). Introduction to Soil Microbiology. John Wiley & Sons. London
2. Alvarez, D.P. & Rossi, G.S. (1993). Producción de celulasas por cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* aisladas de suelo tratado s con Fluroxypyr. Estudio preliminar. I. Bol. Micol. 8:71-75
3. Brown, D. (1983). Lignocellulose Hydrolysis. Phil. Trans. Royal Soc. London 300:305-322
4. Canevascini, G.; Coudray, M.; Rey, J.; Southgate, R. & Meyer, H. (1979). Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. J. Gen. Microbiol 11:291-303
5. Cooper, R.M. & Wood, R.K. (1973). Induction of synthesis of extra cellular cell wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. Nature 246: 309-311
6. Chauduri, B. & Sahai, V. (1993). Production of Cellulase Enzyme from Lactose in batch and Continuous Cultures by a Partially Constitutive Strain of *Trichoderma reesei*. Enzyme and Microbiol. Technol. 15:513-518
7. Gokhale, D. (1992). Protection of *A. niger* Cellulases by Urea During Growth on Glucose or Glycerol Supplemented Media. Appl. Biochem. and Biotech. 37:11-17
8. Golovchenko, N.; Kataeva, I.; Akimenko, V. (1992). Analysis of the pH-Dependence of the Adsorption of *Clostridium thermocellum* Endoglucanase on Cellulose. Biochem. Russia 57:710-716
9. Henry, R. J. (1969). Química Clínica. tomo I. Edit. Jims. pp. 224-226
10. Hoshino, E.; Sasaki, Y.; Okasaki, M.; Nisizawa, K.; Kanda, T. (1993). Mode of Action of Exo-Type and Endo-Type Cellulases from *Irpex Lacteus* in the Hydrolysis of Cellulose with Different Crystallinities. J. of Bioche. 114:230-235
11. Illanes, A. & Rossi, M. C. (1980). Inducción de celulasas en *Trichoderma reesei* en medios de cultivos definidos. Rev. Arg. Microbiol. 12: 79-86
12. Mandels, M. & Reese, E. T. (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol. 144: 1-7
13. -----, (1975). Microbial sources of cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5: 81-105
14. -----, & Reese, E. T. (1974). Enzymatic Hidrolysis of Waste Cellulose. Biotech. & Bioengineering 16:1471-1493
15. Markham, P. & Bazin, M. (1991). Decomposition of cellulose by fungi. En: Arora D. et al. (eds) Handbook of Applied Mycology. Vol 1. M. Dekker Inc. N.Y., USA pp.379- 424
16. Nelson, N. (1944). A. Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 153:375-380
17. Nisizawa, T.; Suzuki H. & K. Nisizawa (1972). Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. J. Biochem. 71:99-107
18. Pardo, A. G. & Forchiassin, F. (1994). Inducción-represión de la actividad celulolítica en *Nectria catalinensis* (Fungi, Ascomycotina). Bol. Soc. Arg. Bot. 30:137-148
19. -----, (1995). Efecto de cationes sobre la producción y actividad del sistema celulasas de *Nectria catalinensis* (Ascomycotina). Bol. Soc. Arg. Bot. 30 : 43-49
20. Parr, J. F. & Papendick, R. J. (1978). Factors Affecting the Decomposition of Crop Residues by Microorganisms. In: W. R. Oschwald (ed.) Crop Residue Management Systems, pp. 101-129
21. Ryu, D. & Mandels, M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. Enzyme Microb. Technol. 2:91-102
22. Scheffé. (1984) En: D. Montgomery. Design and Analysis of Experiments. Second Edition. John Wiley & Sons. New York
23. Somogyi, M. (1952). Notes on Sugar Determination. J. Biol. Chem. 195: 119-23
24. Spezio, M.; Wilson D.; Karplus, P. (1993). Crystal Structure of the Catalytic Domain of a Thermophile Endocellulase. Biochem. Vol. 32, Iss.

38:9906-9916

25. **Sternberg, D.** (1976). Production of cellulase by *Trichoderma*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6:35-53

26. -----, & **Mandels, G. R.** (1979). Induction of cellulolytic enzyme in *Trichoderma reesei* by sophorose. J. Bacteriol. 139: 761-769

27. -----, (1982). Beta-glucosidase induction and repression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. Exp. Mycol. 6: 115-124

28. **Theodorou, M. K., Bazin, M. J., Trinci, A. P. J.** (1980). Cellulose Degradation in a Structured Ecosystem which is Analogous to soil. Trans. Br. mycol. 75:451-454

29. **Trinder, P.** (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6:24

30. **Whitaker, D. R.** (1971). Cellulases. En: P. D. Boyer (ed.) The enzymes. Vol. 1 cap. 9. Acad. Press. N. Y

31. **Wood, T. M. & Garcia Campayo, V.** (1990). Enzymology of cellulose degradation. Biodegradation 1: 147-161