

PRODUCCION DE CELULASAS POR HONGOS AISLADOS DE MADERA Y SUELOS DEL SUR DE CHILE

Musalem, S.M., Steiner, W.J., Contreras, O.I.

Departamento de Ciencias Farmacológicas (IDIEF)
Departamento de Bioquímica, Fac. de Ciencias Básicas
y Farmacéuticas, U. de Chile.
Vicuña Mackenna 20 - Santiago

RESUMEN

Se aislaron 24 cepas de hongos con capacidad celulolítica a partir de 20 muestras de madera y suelos de la IX y X Región. Para ello se utilizó un medio de cultivo sólido que contenía celulosa como única fuente de carbono. Las cepas fueron clasificadas en 5 géneros y 15 especies.

Cada cepa aislada se cultivó en agar con celulosa pretratada con ácido fosfórico, con el objeto de visualizar la hidrólisis del sustrato. El medio de cultivo contenía además diferentes inhibidores del desarrollo micelial, lo que permitió detectar celulastas extracelulares por formación de halos transparentes alrededor de las colonias desarrolladas.

Los halos de hidrólisis de mayor diámetro correspondieron a: *Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride*, *Penicillium* sp. A., *P. citreo-viride*.

Además se determinó la producción de las actividades celulolíticas endo y exoglucanasas, β -glucosidasa y papel filtro en sobrenadantes de cultivos crecidos en medio de sales con papel filtro.

Los mejores productores de todas las actividades del complejo celulasa fueron: *Trichoderma harzianum* I, *T. harzianum* III, *T. harzianum* V, *T. aureoviride*, *Penicillium citreo-viride*.

INTRODUCCION

La bioconversión de los residuos celulósicos representan una fuente potencial en la producción de azúcares solubles, utilizables para la obtención de proteínas unicelulares, productos químicos y etanol (1, 2).

La biodisponibilidad de celulastas con alta actividad es esencial para obtener una adecuada sacarificación de la celulosa. Aunque se ha aislado una gran variedad de bacterias y hongos capaces de utilizarla, no todos pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares que permitan degradar la celulosa insoluble a azúcares fermentables "in vitro" (3, 4). Entre los hongos podemos citar algunos

SUMMARY

[Cellulases production by fungi isolated in wood and soils from South of Chile]

Twenty four strains of fungi displaying cellulolytic activity were isolated from 20 wood and soil samples taken from the IX and X Regions of Chile. A solid media containing cellulose as sole carbon source was used. The isolated strains belong to 5 genera and 15 species.

Each isolated strains was grown on a solid media to which fosforic acid-swollen cellulose was added in orden to visualize the substrate hydrolysis. The growth media also carried different micelial growth inhibitors that allowed the detection of extracellular cellulases by the formation of clearing zones around the colonies.

The largest clearing zones were obtained by: *Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride*, *Penicillium* sp. A and *P. citreo-viride*.

In addition, the supernatants of the cultures grown on filter paper-mineral salts media were assayed for cellulolytic activities: endo and exoglucanases, β -glucosidase and filter paper activity.

The best cellulase complex producers were: *Trichoderma harzianum* I, *T. harzianum* III, *T. harzianum* V, *T. aureoviride*, *Penicillium citreo-viride*.

tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Chrysosporium* (5, 6, 11).

Las celulastas fúngicas son enzimas inducibles (5, 21) que se producen cuando el medio de cultivo contiene celulosa o sus productos de hidrólisis, especialmente celobiosa (9, 10, 21).

En la literatura nacional existe escasa información sobre este tema (6, 11, 12, 13), es por eso que nos hemos propuesto la búsqueda de hongos celulolíticos en ambiente terrestre, especialmente en suelos y maderas, para: a) determinar en ellos la capacidad de producir celulastas con la finalidad futura de aumentar su producción enzimática mediante la obtención de mutantes regulatorias (7, 8) y b) seleccionar un medio de cultivo sólido, en el cual el tamaño de las zonas de hidrólisis del sustrato

celulósico refleje la capacidad celulolítica de los hongos y que permita el desarrollo de un gran número de colonias en forma simultánea.

MATERIAL Y METODO

1. Recolección de muestras y aislamiento de los hongos celulolíticos en medios sólidos.

Se recolectaron 7 muestras de tierra vegetal y 13 de madera en descomposición. Ambas muestras fueron extraídas mediante espátulas estériles y llevadas al laboratorio en bolsas plásticas de polietileno.

Las muestras de suelos (10 g) fueron agitadas durante 1 hora con 90 ml de solución salina estéril como agente dispersante adicionado con 0,25 mg/mL de Cloranfenicol para inhibir el desarrollo bacteriano. (14). A partir de esta dilución (10^{-1}) se sembraron alícuotas de 0.1 mL en series paralelas de placas de Petri en agar celulosa, descrito por Mandels y colaboradores (2), cuya composición es:

KH_2PO_4 - 2.00 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1.40 g/L, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.30 g/L, Ca Cl_2 - 0.30 g/L, $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5.00 mg/L, $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 1.56 mg/L, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2.49 mg/L, $\text{Co Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 3.66 mg/L, Agar - 15.00 g/L, Celulosa - 7.50 g/L.

Las placas se incubaron a 28°C por 14 días observándose su desarrollo cada 4 - 5 días.

Las muestras de madera (trozos) fueron colocadas en superficie de agar celulosa (2), cultivadas y observadas en el mismo lapso de tiempo.

Las estructuras fructificantes obtenidas se traspasaron a placas de agar papa dextrosa adicionado con 0.25 mg/mL de Cloranfenicol con objeto de eliminar posibles contaminantes bacterianos, incubándose por un período de 1 a 3 semanas con el objeto de obtener cepas puras.

Estas fueron clasificadas en medios específicos (agar Malta, agar Czapek, agar Papa Dextrosa) basándose en sus características macro y microscópicas.

2.- Producción de celulasas en medios líquidos.

A partir de las colonias obtenidas en agar papa dextrosa se prepararon inóculos de los hongos aislados. Para esto, se sembraron matraces con 100 mL de medio líquido de Mandels y Andreotti (15) con sales y 7.5 g/L de papel filtro como fuente de carbono. Los inóculos se cultivaron durante 3 días a 28°C con agitación orbital a 150 r.p.m. en un incubador (New Brunswick Modelo RW-650). Luego, estos cultivos se sembraron en matraces con 900 mL del mismo medio de sales con papel filtro, los que se incubaron durante 5 días a 28°C . Los cultivos se filtraron al vacío a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F). En los filtrados se determinaron

las actividades: endoglucanasa (carboximetilcelulasa), exoglucanasa (avicelasa), celobiasa (β -glucosidasa) y actividad sobre papel filtro. Los ensayos enzimáticos se realizaron según métodos descritos por Aguirre, A. 1984 (11), expresándose las actividades en unidades internacionales por mL (U/mL), que se definen como micromoles de azúcares reductores expresados como glucosa producida por minuto.

3.- Producción de celulasas extracelulares en medios sólidos.

Con objeto de visualizar la hidrólisis de la celulosa en medio sólido, ocasionada por organismos productores de celulasas, se usaron placas de agar con 5 g/L de celulosa, pretratada con ácido fosfórico según el método de Tansey (16). Se utilizaron los siguientes inhibidores en forma independiente, con el objeto de obtener un moderado desarrollo de la colonia en crecimiento y apreciar entre todos ellos el que arrojará mejores resultados.

Rosa de bengala	0,05 mg/mL (14)
Rosa de bengala (0.05 mg/mL) con Fosfón D (Cloruro de tribencil-2-4-dicloro bencil fosfónico)	0.25 mg/mL (9)
Rosa de bengala (0.05 mg/mL) con B-Nine (ácido n-dimetilamino succinámico).	0.4 mg/mL
Bilis de buey	20 mg/mL (9)
Bilis de buey 15 mg/mL con Fosfón D	0.25 mg/mL (9)
Bilis de buey 15 mg/mL con B-Nine	0.4 mg/mL
Bilis de buey 15 mg/mL con Saponina	0.4 mg/mL (17)

Las placas se sembraron con suspensiones de conidios de los distintos hongos, preparadas según el método de AOAC (18) y se incubaron a 28°C durante 4 a 8 días. Luego se dejaron a 50°C por 12 horas para acelerar la acción de las celulasas extracelulares y así desarrollar más rápidamente zonas de aclaramiento de la celulosa alrededor de las colonias.

RESULTADOS Y DISCUSION

Debido al alto número de colonias presentes en los primeros aislamientos, se seleccionaron los hongos de mayor frecuencia que se agruparon en 5 géneros y 15 especies (Tabla 1).

El género *Trichoderma* presenta los índices de

aislamientos más altos, seguido del género *Penicillium*, encontrándose las cepas con mejores capacidades degradativas en dichos géneros.

Algunas de las especies de los hongos estudiados presentaron un grado diferente de actividad enzimática. Para obviar este problema, cuando correspondía, éstas fueron enumeradas con los números romanos del I al V.

Trichoderma harzianum I y V, *T. aureoviride* II, *T. pseudokoningii*, *Penicillium citreo-viride*, presentaron los mejores niveles determinados de las actividades celolíticas.

T. harzianum III, *Penicillium* sp. A, mostraron altos niveles endoglucanasa (Cx), exoglucanasa (C₁) y de actividad sobre papel filtro (FP), pero muy bajos niveles de la actividad celobiasa (β -glucosidasa) (Tabla 1).

Penicillium citreo-viride y *P. purpurogenum*, presentaron los niveles más altos de la actividad celobiasa, siendo ésta generalmente muy baja para el género *Trichoderma*.

Las especies *T. viride* (I, II y III), *T. longibrachiatum* I, *Cunninghamella elegans*, *Mucor hiemalis* y *Absidia glauca*, no produjeron actividades celolíticas extracelulares, o estas fueron muy bajas, por lo tanto, estos hongos aunque son capaces de crecer en celulosa, no secretan al medio las enzimas necesarias para degradar los materiales celulósicos. (Tabla 1)

En relación al segundo objetivo de nuestro estudio, observamos la acción de los inhibidores Rosa de Bengala y Bilis de buey en distintas especies de los géneros *Trichoderma* y *Penicillium* que, como ya dijimos, presentaron los mayores números de aislamientos en este estudio. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Para *T. pseudokoningii*, Rosa de Bengala permite solamente visualizar zona de aclaramiento de la celulosa, pero no restringe suficientemente el tamaño de las colonias (Fotografías 1a a 1c). En cambio Bilis de buey, sólo o combinado con B-Nine, permite controlar efectivamente el desarrollo fúngico, obteniéndose colonias de reducida expansión, de 2,9 mm. de diámetro promedio, con halos claros de hidrólisis alrededor de éstas. (Fotografías 1d a 1f). Con B-Nine hay mayor nitidez de los halos de hidrólisis (Fotografía 1c) y con Fosfón D, se inhibió la fructificación del hongo y la hidrólisis de la celulosa (Fotografía 1f).

Para *T. aureoviride* I, la Bilis de buey es efectiva en la restricción del crecimiento, obteniéndose colonias aisladas rodeadas de halos claros de hidrólisis. Sin embargo, el diámetro de las colonias varía entre 8 y 12 mm. lo que es bastante mayor que las colonias de *Trichoderma pseudokoningii*, en las mismas condiciones de cultivo. (Fotografías 2b a 2d).

El inhibidor Fosfón D, fue sustituido eficazmente por Saponina (17) (Fotografía 2c), dando resultados similares a la combinación Bilis de buey con B-Nine (Fotografía 2d).

En Tabla 2 se puede comparar el rango en los tamaños de las zonas de hidrólisis que obtuvimos al usar inhibidor. Bilis de buey sin y con adición

de B-Nine, para las distintas especies del género *Trichoderma*.

Se observa que *T. harzianum* I, II, III, *T. aureoviride* II, *T. pseudokoningii* y *T. koningii* II, son las especies más activas, presentando halos entre 2 y 3 mm. *T. aureoviride* I y *T. longibrachiatum* II presentan halos intermedios entre 1 y 2 mm. y *T. viride* I, II, III, *T. longibrachiatum* I y *T. harzianum* IV, no mostraron halos de hidrólisis del sustrato o no crecieron en estos medios.

Se compararon además los valores de la actividad endoglucanasa, enzima que actúa sobre celulosa soluble, y actividad sobre papel filtro (21), que mide la capacidad celolítica general sobre celulosa cristalina, observándose correlación positiva significativa entre dichas actividades y las zonas de hidrólisis, en medio sólido (valores entre 0.83 y 0.92) (Tabla 2).

Para las cepas aisladas del género *Penicillium* la combinación de Bilis de buey con Saponina resultó muy adecuada para evidenciar la producción de celulasas, (Fotografía 3a), obteniéndose halos de hidrólisis más nítidos y de mayor tamaño que en los medios adicionados con Bilis de buey solo o con B-Nine (Fotografía 3b).

Las cepas del género *Penicillium* a 28° C necesitan mayor tiempo de incubación que las especies del género *Trichoderma*, dependiendo de la cepa en estudio y no de la capacidad celolítica del hongo. El período de incubación requerido en cada caso se determinó visualmente hasta la aparición de las primeras estructuras fructificantes entre 4 y 10 días.

La Tabla 3 muestra los tamaños de las zonas de hidrólisis producidos por las especies del género *Penicillium* comparada con las actividades celolíticas endoglucanasa y actividad papel filtro. Los valores obtenidos en medio de Bilis con Saponina concuerdan con los de las actividades enzimáticas. Bilis de buey con B-Nine fueron menos adecuados ya que la correlación entre el tamaño de los halos y las actividades fue baja, no significativa.

En la Tabla 4 se observa que: *Absidia glauca*, *A. cylindrospora*, *Cunninghamella elegans* y *Mucor hiemalis*, no presentaron halos de hidrólisis en medio sólido con Bilis de buey sola o con B-Nine, resultados que concuerdan con los valores de las actividades celolíticas determinadas en medio líquido. (Tabla 1).

A pesar que la visualización de la producción de celulasas en medio sólido presenta dificultades debido a la naturaleza recalcitrante de la celulosa (9) y al crecimiento extensivo de los micelios de algunos hongos que cubren a veces completamente la placa de agar, los medios usados permitieron una digestión rápida del sustrato celulósico, restringieron el crecimiento fúngico con la obtención de colonias pequeñas y por otro lado, acortaron el período necesario para obtener un aclaramiento de la celulosa.

TABLA 1

Actividades celulolíticas de hongos nativos*

C E P A	C _x (U/mL)	FP (U/mL)	C ₁ U/mL)	C _β (U/mL)
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	0.00	0.000	0.000	0.000
<i>Absidia glauca</i> Hagem	0.00	0.000	0.000	0.007
<i>Cunninghamella elegans</i> Lender	0.00	0.000	0.000	0.000
<i>Mucor hiemalis</i> Wehner	0.06	0.000	0.003	0.003
<i>Penicillium citreo-viride</i> Biourge	3.67	0.044	0.128	0.573
<i>Penicillium miczynskii</i> Zaleski	1.27	0.018	0.067	0.037
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	0.60	0.014	0.072	0.250
<i>Penicillium</i> sp. A	3.44	0.054	0.258	0.047
<i>Penicillium</i> sp. B	0.44	0.007	0.040	0.053
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai I	0.77	0.030	0.030	0.013
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai II	3.18	0.050	0.133	0.183
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai I	4.00	0.059	0.178	0.120
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai II	1.55	0.054	0.061	0.087
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai III	4.66	0.096	0.204	0.036
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai IV	0.00	0.000	0.000	0.000
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai V	3.58	0.052	0.164	0.103
<i>Trichoderma koningii</i> Audem	1.44	0.033	0.050	0.027
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai I	0.00	0.000	0.000	0.000
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai II	0.71	0.034	0.072	0.010
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai	3.00	0.048	0.140	0.106
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex. Gray I	0.02	0.000	0.050	0.030
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex. Gray II	0.00	0.000	0.004	0.000
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex. Gray III	0.02	0.000	0.004	0.003

* : cultivos crecidos durante 5 días en medio líquido.

C_x: Endo - β - 1,4 glucanasa

FP: Actividad papel filtro

C₁: Exo - β - 1,4 glucanasa

C : β - glucosidasa (celobiasa)

TABLA 2

Tamaño de las zonas de aclaramiento de las especies del género *Trichoderma* en agar celulosa pretratada, comparado con las actividades celulolíticas Cx y FP.

ESPECIES FUNGICAS	Tamaño zonas de hidrólisis (mm)		Actividades celulolíticas* (U/mL)	
	Medio adicionado con Bilis de Buey	Medio adicionado con Bilis de Buey y B-Nine	Endoglucanasa (Cx)	Actividad papel filtro (FP)
<i>T. harzianum</i> III	3.0	3.2	4.66	0.096
<i>T. aureoviride</i> II	2.9	1.5	3.18	0.050
<i>T. harzianum</i> I	2.6	2.9	4.00	0.059
<i>T. harzianum</i> V	2.6	2.0	3.58	0.052
<i>T. pseudokoningii</i> I	2.5	2.7	3.00	0.048
<i>T. koningii</i> I	2.4	2.7	1.44	0.033
<i>T. harzianum</i> II	2.3	2.0	1.55	0.054
<i>T. aureoviride</i> I	1.6	1.2	0.77	0.030
<i>T. longibrachiatum</i> II	1.3	2.0	0.71	0.034
<i>T. viride</i> I	0.4	0.2	0.00	0.000
<i>T. viride</i> II	S.D.	S.D.	0.02	0.000
<i>T. longibrachiatum</i>	0.0	0.0	0.00	0.000
<i>T. harzianum</i> IV	S.D.	S.D.	0.00	0.000
<i>T. viride</i> III	0.1	0.1	0.02	0.000

*: cultivos de 5 días de desarrollo en medio líquido.
S.D.: no hubo desarrollo en 21 días a 28°

TABLA 3

Tamaño de las zonas de aclaramiento de las especies del género *Penicillium* en agar celulosa pretratada, comparado con las actividades celulolíticas Cx y FP.

ESPECIES FUNGICAS	Tamaño de zonas de hidrólisis (mm)			Actividades celulolíticas* (U/mL)	
	Medio adicionado con Bilis de Buey y Saponina	Medio adicionado con Bilis de Buey	Medio adicionado con Bilis de Buey y B-Nine	Endoglucanasa (Cx)	Actividad papel filtro (FP)
<i>Penicillium citreo-viride</i>	1.9	1.0	1.6	3.67	0.044
<i>Penicillium</i> sp. A	1.3	1.4	0.2	3.44	0.054
<i>Penicillium miczynskii</i>	1.1	1.1	0.6	1.27	0.018
<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.0	1.0	0.9	0.60	0.014
<i>Penicillium</i> sp. B	0.0	0.0	0.0	0.44	0.007

*: cultivos de 5 días de desarrollo en medio líquido.

TABLA 4

Tamaño de las zonas de aclaramiento de las especies de **Mucorales** en agar celulosa pretratada, comparado con las actividades celulolíticas Cx y FP.

ESPECIES FUNGICAS	Tamaño de zonas de hidrólisis (mm)		Actividades celulolíticas* (U/mL)	
	Medio adicional con Bilis de Buey	Medio adicional con Bilis de Buey y B-Nine	Endoglucanasa (Cx)	Actividad papel filtro (FP)
<i>Absidia glauca</i>	0.0	0.0	0.00	0.00
<i>Absidia cylindrospora</i>	0.0	0.0	0.00	0.00
<i>Cunninghamella elegans</i>	0.0	S.D.	0.00	0.00
<i>Mucor hiemalis</i>	0.0	0.0	0.06	0.00

*: cultivos de 5 días de desarrollo en medio líquido.
S.D.: no hubo desarrollo en 21 días a 28°.

CONCLUSIONES

En este trabajo se aislaron 5 géneros y 15 especies de hongos provenientes de muestras de suelo y madera del Sur de Chile. El género **Trichoderma** fue aislado con mayor frecuencia con 7 especies, seguido del género **Penicillium** con 5 especies.

Las cepas con mejores capacidades degradativas fueron **Trichoderma harzianum** III, I, V, **Penicillium citreo-viride** y **Trichoderma aureoviride** II.

El género **Trichoderma** siempre presentó baja actividad de celobiasa, incluso en aquellas especies con buenas actividades de endoglucanasa, exoglucanasa y actividad sobre papel filtro.

Penicillium citreo-viride presentó la mejor actividad de celobiasa.

El agar con celulosa pretratada combina con Bilis de buey o Bilis de buey con B-Nine restringió el tamaño de las colonias de **Trichoderma** y permitió la mejor visualización de los halos de hidrólisis de la celulosa.

El agar con celulosa pretratada adicionada de Bilis de buey con Saponina fue el mejor medio para las especies del género **Penicillium**.

Los tamaños de las zonas de aclaramiento de la celulosa en las placas de agar comparadas con las actividades celulolíticas determinadas en medio líquido presentaron una tendencia general donde a altas actividades endoglucanasa le correspondieron los mayores halos de aclaramiento de la celulosa y aquellos hongos que no producían dicha actividad detectable en los filtrados no presentaron zona de hidrólisis del sustrato alrededor de las colonias (correlación positiva), en especial en el género **Trichoderma**.

Los resultados concuerdan con los de otros autores (9, 19) quienes han encontrado que el tamaño de las zonas de hidrólisis en agar con celulosa puede ser utilizado como una medida semicuantitativa de las actividades celulósicas extracelulares y constituye un método eficiente de muestreo preliminar de hongos celulolíticos.

Estas conclusiones pueden ser de utilidad para posteriores estudios mutagénicos.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer al Dr. E. Piontelli L., y a la Dra. M.A. Toro S.M. de la Unidad de Micología, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, por su colaboración permanente en el estudio de los hongos, y por la ayuda prestada en su clasificación en este trabajo.

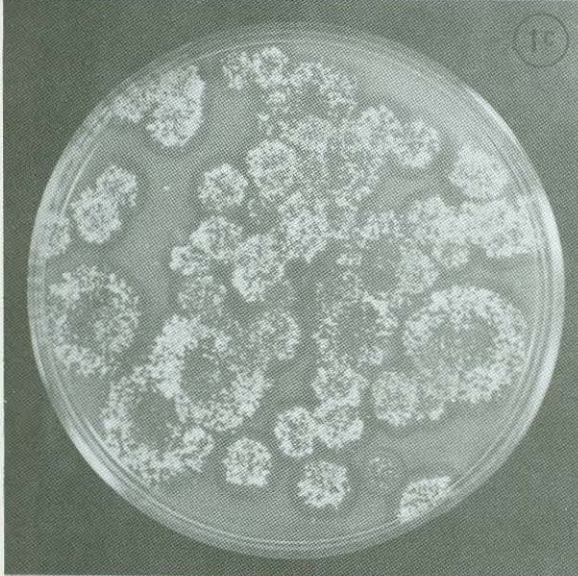
Este trabajo fue financiado por la Dirección General Académica, Proyecto B1864-8412, Universidad de Chile.



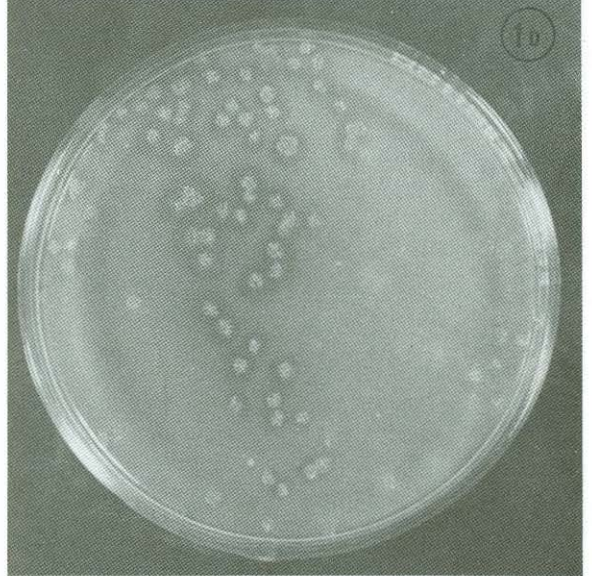
1a



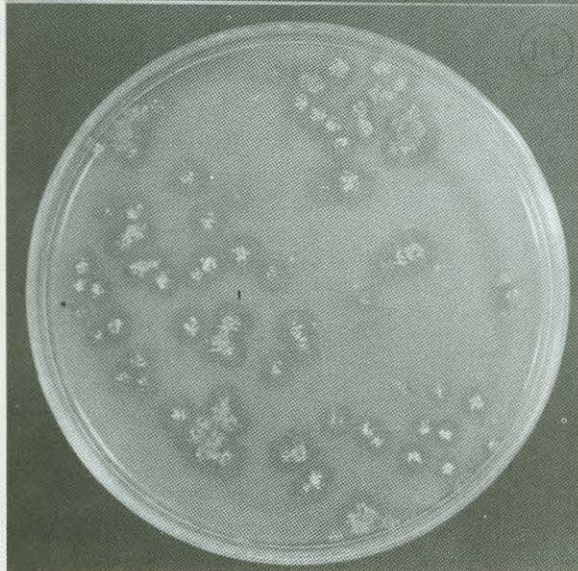
1b



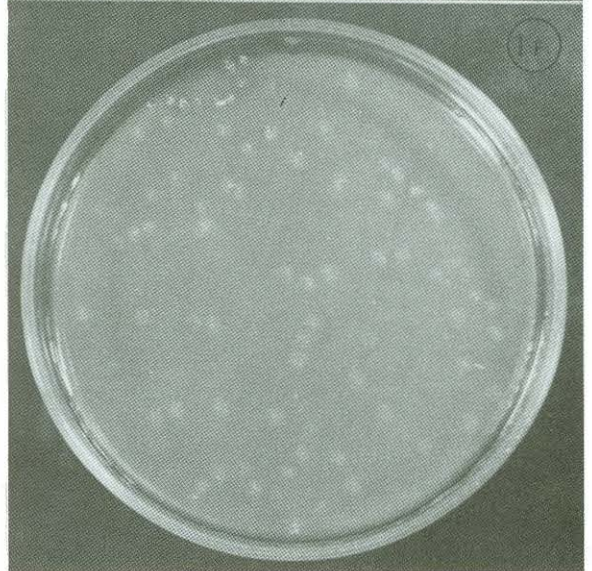
1c



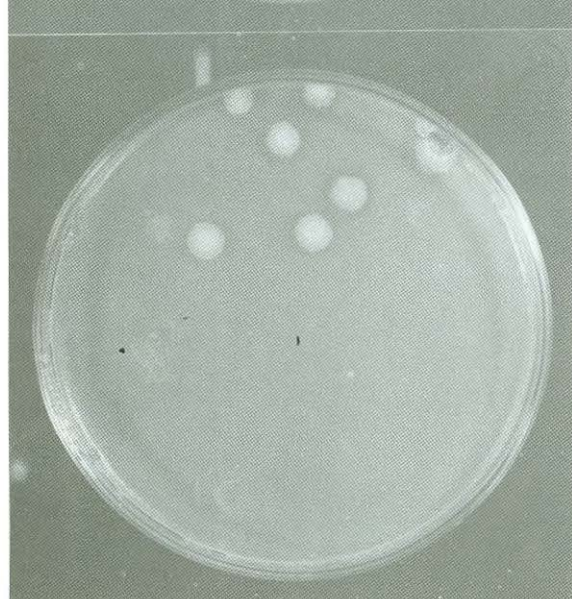
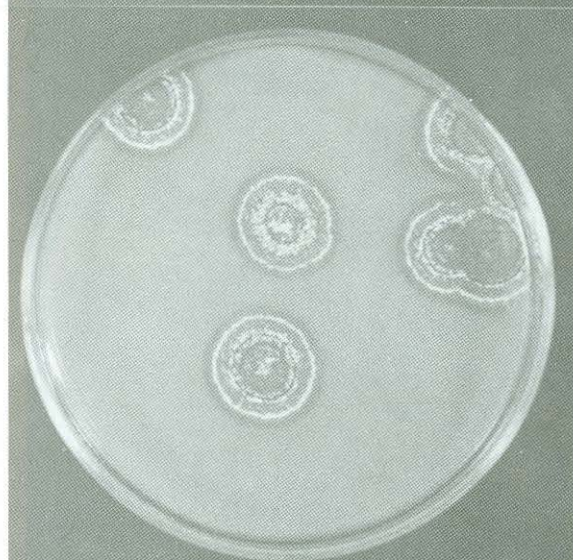
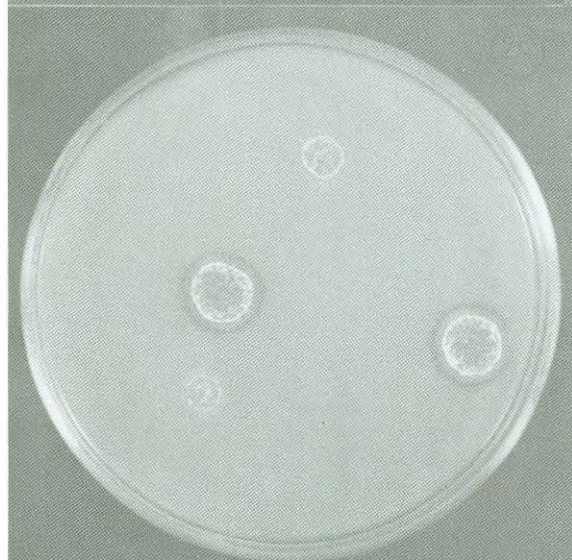
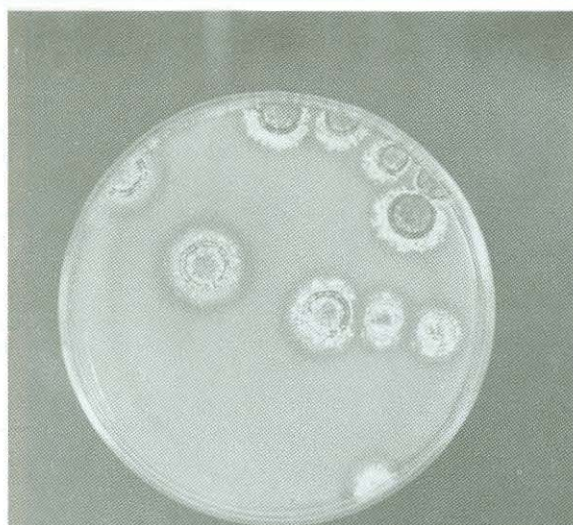
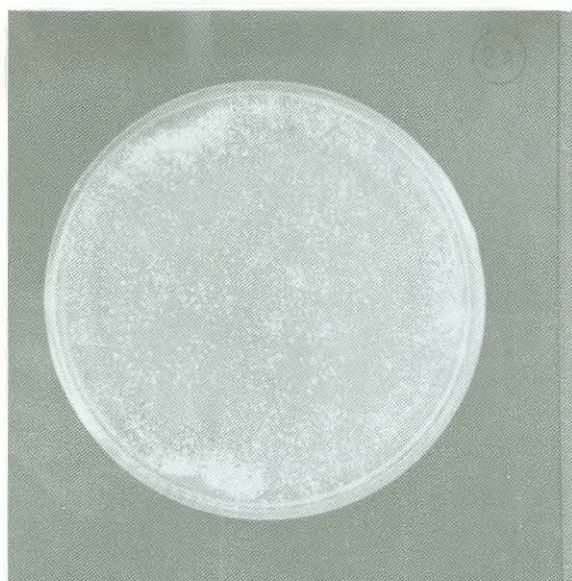
1d



1e



1f



BIBLIOGRAFIA

- 1.- A. Fiechter. (1977). Utilization of Cellulose Degradation Products. Proc. Bioconversion Symp. 11 T. Delhi, 535-542.
- 2.- Mandels, M. Hontz, L. and Nystrom (1974). J. Biotech. and Bioeng. 16, 1471-1493.
- 3.- Sternberg, David. (1976) Production of Cellulase by *Trichoderma*. Biotechnol. and Bioeng. Symp. Nº 6, 35-53.
- 4.- Mandels, Mary. (1975). Microbial Sources of Cellulase. Biotechnol. and Bioeng. Symp. Nº 5, 81-105.
- 5.- T.M. Enari and P. Markkanen (1979) Production of Cellulolytic Enzymes by Fungi. Technical Research Centre of Finland, Biotechnical Laboratory.
- 6.- B. Escobar, P. Ruiz (1977) Aislamiento de Microorganismos de degradan coqueta. Departamento de Tecnología Química. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. U. de Chile
- 7.- Sternberg, David. (1976). A Method for Increasing Cellulase Production by *Trichoderma viride*. Biotechnology and bioeng. Vol. XVIII, 1751-1760.
- 8.- S.M. Cuskey, E.M. Frein, B.S. Montencourt and D.E. Eveleigh (1982). Over-production of Cellulase-Screening and Selection. Czechoslovak Academy of Science.
- 9.- Montencourt, Bland S. and Eveleigh, Douglas, E. (1977) Semiquantitative Plate Assay for determination of Cellulase Production by *Trichoderma viride*. Applied and Environmental Microbiology 33, 178-183.
- 10.- Montencourt, Bland S. and Douglas E. Eveleigh. (1979) Selective Screening Methods for the Isolation of High Yielding Cellulase Mutants of *Trichoderma reesei*. Advances in Chemistry Series, Nº 181. American Chemical Society.
- 11.- Aguirre, A.X., (1984) Hidrólisis de Coqueta agotada de remolacha mediante celulasas de hongos nativos, obtención de azúcares, etanol y proteína unicelular. Tesis de grado para optar al título de Químico-Farmacéutico.
- 12.- González, R. (1980) Biodegradación de residuos celulósicos y producción de celulasa mediante hongos nativos. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico.
- 13.- Contreras, I., González, R., Ronco, A.M., Asenjo, J.A. (1982) Cellulolytic enzymes for the hidrolisis of Leached beet cosette. Biotechnology Letten, Vol. 4 1 51-56.
- 14.- Arrow, J.C.G. (1972) Rose bengal as a selective aid in the isolation of fungi and Actinomycetes from natural sources. Mycología 64 : 304-315.
- 15.- Mandels, M. and Andreotti, R.E. (1978) Problems and Challenges in the Cellulose to Cellulase fermentation. Porcess Biochem. 13 (5) 6-13.
- 16.- Tansey, M.R. (1971) Agar - Diffusion Assay of Cellulolytic ability of Thermophilie fungi. Arch. Mikrobiol. 77, 1 - 11.
- 17.- Gosh, V.K., Ghose, T.K. (1982) Gopalkishnan. Biotech and Bioeng. Vol. XXIV 244-243.
- 18.- AOAC. (1980) Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, p. 61. Qilliams Horwitz, 13ra. Ed.
- 19.- Saddler, J.N. (1982) Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme systems. Enzyme. Microb. Technol. 4: 414-418.
- 20.- Bissett, J. (1984) A revision of the Genus *Trichoderma* I. Section Longibrachiatum Sect. Nov. Can. J. Bot. 62 : 924-931.
- 21.- T.M. Enari and P. Markkanen (1979) Production of Cellulolytic Enzymens by Fungi. An Evaluation of Enzymatic Hydrolysis to Cellulosic Materials by M. Linko p. 25-48.