

Biota

Revista de Ciencias Biológicas

VOLUMEN XVII N° 99 - 1999

Fundador: Jaroslav Soukup SDB
Directora: Magdalena Pavlich H.
P.E. ISSN 0006 - 3584

DETERMINACIÓN DE PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE CELULASAS PRODUCIDAS EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA POR *Trichoderma reesei* LM-UC4

Roberto Ramos Ch¹, M. Gutiérrez-Correa

Resumen

Celulasas producidas por *Trichoderma reesei* LM-UC4 en fermentación sumergida fueron separados por electroforesis en gradiente de densidad y los geles fueron evaluados utilizando zimogramas para las diferentes actividades enzimáticas. Se observó la formación de complejos enzimáticos que mostraron actividad enzimática específica y también se observó algunas bandas con actividad enzimática no específica.

Summary

Trichoderma reesei LM-UC4 cellulases produced by submerged fermentation were subjected to density gradient polyacrylamide gel electrophoresis and the gels were evaluated by using zymograms for the different enzyme activities. Some enzyme complexes were observed showing specific enzyme activities. Some bands with non-specific enzyme activities were also found.

INTRODUCCIÓN

El estudio del sistema enzimático celulasa es importante toda vez que existe actualmente un gran interés en utilizar estas enzimas en varios procesos industriales, ya sea convencionales como en el tratamiento de basura, en la conversión de desechos vegetales en fertilizantes o alimentos para animales, o en nuevos procesos como en la textilería o la fabricación de detergentes (11, 13, 18, 28, 31).

Para comprender la importancia y mecanismo de acción de cada enzima en la hidrólisis de la celulosa, es necesario el fraccionamiento y aislamiento de los componentes individuales de la celulosa en sus formas purificadas (1, 9, 19, 28).

Las técnicas electroforéticas representan en el momento las herramientas adecuadas para tales fines (9, 15, 21) dado que permiten trazar perfiles moleculares de los mutantes y permiten también hacer un seguimiento de la cantidad y tipo de isoenzimas que se secretará durante el curso de una fermentación (4, 11, 32).

El objetivo del presente trabajo de investigación es determinar el patrón electroforético de formación de enzimas celulolíticas de la cepa mutante de *Trichoderma reesei* LM-UC4 en relación al tiempo de fermentación sumergida.

Materiales y métodos

Preparación del inóculo

La cepa *Trichoderma reesei* LM-UC4 (16) se cultiva en agar papa dextrosa por 5 días a 30° C para lograr su esporulación. En condiciones estériles se resuspende las esporas en solución Tween 80 al 0.1%. Se toma 2×10^7 esporas/ml, se agrega al medio de inóculo y se coloca el sistema en el agitador de baño maría a 30° C a 200 RPM durante dos días. El medio de inóculo consiste en las sales de Reese & Mandels (29), glicerol 0.1%, peptona 0.2%, bagacillo de 0.5 mm de diámetro 0.4% y Tween 80 al 0.1%, autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Instalación de la Fermentación

Fermentación sumergida

La fermentación sumergida se realizó en erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de sales de Reese & Mandels (29), Tween 80, 0.1%; glicerol, 0.1%; bagacillo pretratado (27), 1% y torta de soya para mantener la tasa C:N de 10:1. Se autoclava a 121° C por 15 minutos y a 15 lb de presión, luego en condiciones estériles se agrega 2 ml de inóculo. Se incuba en baño maría a 30° C en agitación constante de 180 RPM.

¹ Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú Ap. 456 Lima 100
e-mail: roberto@lamolina.edu.pe

Extracción de las fracciones solubles

Las fracciones solubles de la fermentación sumergida se obtuvieron directamente por filtración. Luego se midió el pH y se centrifugó a 4000 RPM durante 15 minutos. Se seca la fracción insoluble a 105°C por 24 horas y se toma registros de los pesos.

Análisis Bioquímicos de la fracción soluble

Análisis enzimáticos

La actividad de celulasa se determinó como actividad sobre papel de filtro, según el método de Mandels *et al* (24). Los azúcares reductores liberados se cuantifican por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de Miller (10, 26). La actividad endoglucanasa se determinó usando carboximetilcelulosa 1% (w/v) como sustrato e incubando por 30 minutos a 50° C (10, 7). La actividad β -glucosidasa se midió según el método de Kubicek (20) utilizando p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido como sustrato. La actividad xilanasa se determinó usando xilano 1% (w/v) como sustrato e incubando por 30 minutos a 50° C (7). Una unidad internacional (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar una micromol de producto (glucosa para papel de filtro y endoglucanasa; xilosa para xilanasa; p-nitrofenol para β -glucosidasa) por minuto.

Evaluación de la secreción de proteínas solubles

Las proteínas solubles se evaluaron según el método de Bradford (3), usando albúmina sérica bovina como estándar.

Concentración de la fracción soluble

Las fracciones solubles obtenidas anteriormente se concentran por ultrafiltración hasta un décimo de su volumen inicial. Para ello se empleó una cámara de ultrafiltración, con membrana de retención (PM 10⁴), en agitación y a 4°C. La fracción concentrada se dispensa en viales de 1.5 ml y se guarda en congelación (<12°C).

Separación electroforética de las muestras concentradas

Para la separación electroforética de las muestras concentradas se utilizó el sistema discontinuo de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (DISCPAGE) con gradientes de concentración de 3 a 15 % y a un pH de 8.8 (25, 23). El mismo procedimiento se utilizó bajo condiciones no denaturantes y denaturantes con sodio dodecil sulfato sin calentamiento (34). Las bandas de proteína en los geles fueron detectadas mediante tinción azul de Coomassie (23).

Zimogramas electroforéticos

Después de la electroforesis los geles de poliacrilamida fueron sujetos a zimogramas para evidenciar las bandas con actividad enzimática. La detección de celulasa, endoglucanasa y xilanasa se realizó mediante la técnica de réplica de agar (2). La detección de β -glucosidasa se realizó directamente sobre los geles de poliacrilamida de acuerdo con Kwon *et al* (17).

Técnica del fraccionamiento de geles de poliacrilamida

Para trazar el perfil electroforético de las enzimas celulasas se empleó también la técnica del fraccionamiento (4). La técnica consiste en cortar el gel de acrilamida cada 2 mm, estas fracciones se colocan en un tubo de ensayo, conteniendo buffer acetato de sodio 0.05 M, pH 4.8. Los tubos se dejan en refrigeración por 24 horas de tal modo que la enzima atrapada en el gel de acrilamida difunda al buffer. Luego de esta operación, se tiene las fracciones con las enzimas en solución, las que son analizadas para todas las actividades enzimáticas según se refirió anteriormente.

Determinación del peso molecular

Para determinar el peso molecular de las diversas bandas electroforéticas se empleó una mezcla de cinco proteínas de peso molecular conocido (High Molecular Weight Standard, Sigma).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la fermentación sumergida realizados en erlenmeyers sobre un medio con bagacillo como fuente carbonada y torta de soya como fuente nitrogenada se muestran en la figura N° 1. La producción de proteínas solubles (Figura N° 1-B) tiende a aumentar a medida que transcurre el tiempo de fermentación, llegando a su máximo valor a las 144 horas. El pH del medio (Figura N° 1-B) se mantiene estable hasta las 24 horas de fermentación y luego se eleva hasta un valor máximo de 7.16 a las 144 horas de fermentación. La actividad enzimática fue incrementándose a medida que transcurre el tiempo, obteniéndose la máxima actividad entre las 120 y 144 horas de fermentación (Figura N° 1-A).

Evaluación de los patrones electroforéticos

Zimogramas

Sistema no denaturante

Para identificar qué bandas de proteínas en el gel de acrilamida corresponden a las enzimas del sistema celulasa, se aplicó la técnica del agar réplica. Las endoglucanasas (EG) y celobiohidrolasas (CBH) son capaces de degradar celulosa ablandada. Sin embargo, las endoglucanasas degradan más fácilmente la carboximetilcelulosa; mientras que las celobiohidrolasas no son capaces de degradar carboximetilcelulosa. De esta manera, estas dos actividades pueden ser identificadas por diferencia (31).

a) Evaluación de la actividad celulasa total

A las 24 horas de fermentación no se observó ninguna zona de hidrólisis, es a partir de las 48 horas de fermentación que se observó una zona de actividad celulasa para luego llegar a identificar tres zonas a las 72 y 96 horas de fermentación y finalmente se observó cuatro zonas de hidrólisis a las 120 y 144 horas (Figura N° 2-A). Comparando este zimograma con el zimograma de endoglucanasas se deduce que CEL-2 presenta también actividad endoglucanasa (CMC-3). Sin embargo, la mayor actividad se observa en el zimograma para endoglucanasas, sugiriendo que CEL-2 es una endoglucanasa. Las zonas de hidrólisis CEL-3 y CEL-4 tienen el mismo R_f que las zonas de hidrólisis CMC-6 y CMC-7 del zimograma de endoglucanasas (Figura 2-B) siendo la intensidad de hidrólisis similares en ambos zimogramas, sugiriendo la posibilidad de una actividad “exo-endo” que se observa a partir de las 120 horas de fermentación. En efecto, Sprey y Bochem (34), purificaron de *T. reesei* un complejo endoglucanasa-celobiohidrolasa que presenta actividad alta hacia CMC y celulosa ablandada, indicando la acción sinérgica de ambas enzimas presentes en este complejo (34). La otra posibilidad a considerar es que las enzimas celobiohidrolasas (CBHI y CBHII) se encuentren contaminadas con pequeñas cantidades de endoglucanasas, obteniéndose así una actividad contaminante (5). De otro lado, si se considera que sólo existen dos celobiohidrolasas genéticamente diferentes (14) cabe la posibilidad que las otras dos zonas de hidrólisis que aparecen al final de la fermentación sean producto de la proteólisis de CBHI y CBHII, esto concuerda con el descubrimiento que en etapas tardías de la fermentación CBHI y CBHII llegan a ser parcialmente modificadas a componentes de pesos moleculares más bajos (14).

b) Evaluación de la actividad endoglucanasa

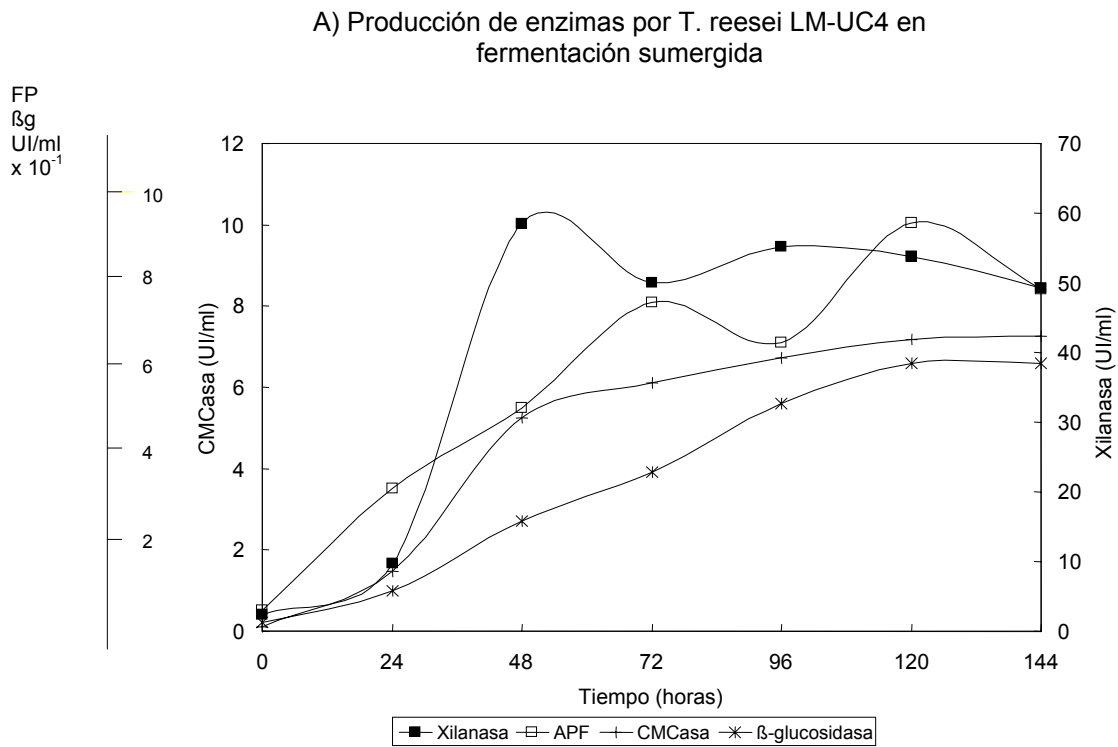
Las zonas que indican actividad endoglucanasa se empezó a observar a partir de las 24 horas de fermentación en la que se observó siete zonas de hidrólisis. A las 48 horas se observó nueve zonas de hidrólisis, las mismas que permanecieron hasta el final de la fermentación (144 horas) (Figura N° 2-B).

Como se observa en la figura N° 2-B, existen tres halos de hidrólisis que también tienen actividad celobiohidrolasa (CBH); como se mencionó anteriormente, CEL-2 es en realidad una endoglucanasa. Las otras dos zonas de actividad endoglucanasa (CMC-6 y CMC-7) también muestran actividad celobiohidrolasa (CEL-3 y CEL-4), que como ya se mencionó, puede tratarse de un complejo que muestra actividad endoglucanasa-celobiohidrolasa (34).

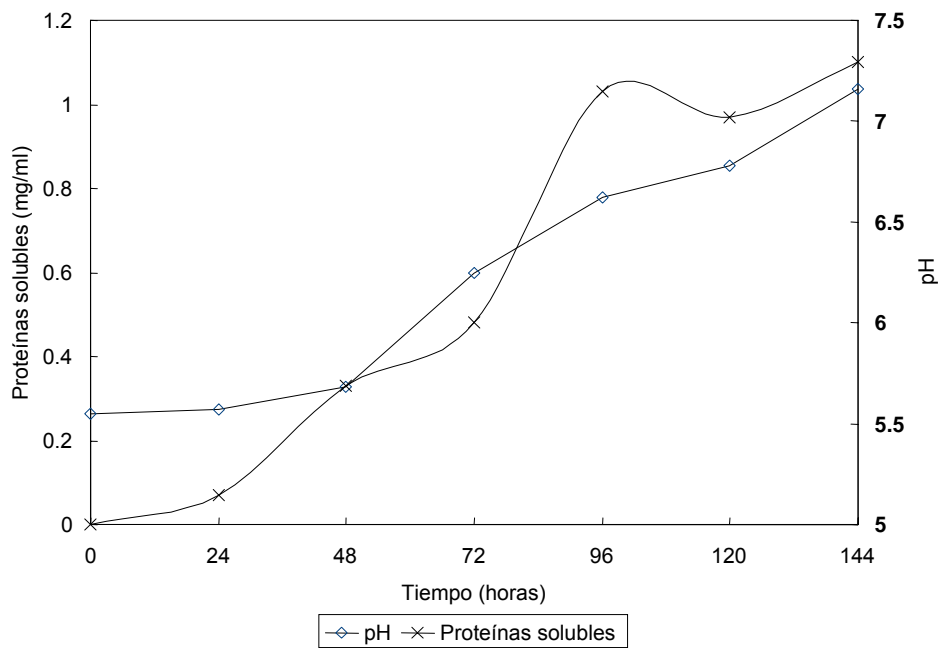
Un detalle importante a considerar es que las múltiples zonas de hidrólisis observadas se presentan en gran número desde el primer día de fermentación (Figura N° 2-B), es decir, no se puede afirmar que estas múltiples formas de enzimas sean producto de la actividad proteolítica de una enzima precursora sino que es una propiedad inherente del sistema celulasa de *Trichoderma sp.* y no se puede considerar solamente como un resultado de la modificación proteolítica postsecrecional de enzimas extracelulares secretadas (8, 22, 33, 35).

Del zimograma obtenido se puede decir que *T. reesei* secreta formas múltiples de enzimas prácticamente desde el inicio de la fermentación y que en el primer día hubo una actividad endoglucanasa relativamente baja para ser considerado como precursor de otras enzimas (22). Sprey & Lambert (33), mencionan que después de la separación con IEF formas moleculares múltiples de celulasas están presentes en una etapa muy temprana de la fermentación, un hecho que parece excluir la interpretación de que la heterogeneidad se debe exclusivamente a modificaciones postsecrecionales de las enzimas.

Figura N° 1 Producción de celulasas, proteínas solubles y pH de *Trichoderma reesei* LM-UC4 en fermentación sumergida



B) Secreción de proteínas solubles y comportamiento del pH de *T. reesei* LM-UC4 en fermentación sumergida



La posibilidad de que estas múltiples actividades endoglucanasas sean producto de una proteólisis parcial es menos probable dado que como se mencionó anteriormente, éstas aparecen desde el primer día de fermentación, además, Hagspiel *et al.*, (14) observaron que las endoglucanasas junto con las β -glucosidasas son más resistentes contra el ataque proteolítico; encontraron además, que estas proteínas necesitan altas concentraciones de tripsina o papaína para su proteólisis parcial (14).

c) Evaluación de la actividad β -glucosidasa

Las muestras del cultivo filtrado retiradas en varios tiempos durante la fermentación sumergida se sometieron a electroforesis en gradientes de concentración y luego se tiñó para actividad β -glucosidasa tal como se indicó en materiales y métodos (17). Se encontraron en el filtrado tres formas de β -glucosidasas (Figura N° 2-C). De acuerdo al orden decreciente de su peso molecular se les llamó como β -glucosidasa I, β -glucosidasa II y β -glucosidasa III.

El número de enzimas β -glucosidasa encontrados en el cultivo sumergido fueron tres, el cual está de acuerdo con los descubrimientos de Gong *et al.* (12) quienes aislaron tres componentes de β -glucosidasa de una preparación comercial de celulasa de *T. viride*. Farkas *et al.*, (9) también obtuvieron tres formas de β -glucosidasa en *T. reesei* QM 9414. Mc Hale *et al.* (25) obtuvieron tres formas de β -glucosidasas del hongo termofílico *Talaromyces emersonii*. Sakamoto *et al.* (30) aislaron tres β -glucosidasas de *Aspergillus aculeatus* N° F-50.

Las bandas teñidas para la actividad β -glucosidasa se hacen más intensas a medida que transcurre el tiempo de fermentación, además, la β -glucosidasa I aparece a las 72 horas, la misma que permanece hasta el último día de fermentación. A las 24 horas de cultivo no se observó ninguna banda teñida para β -glucosidasa lo que es consistente con la falta de tal actividad sobre las muestras ensayadas de los filtrados obtenidos en este tiempo (Figura N° 1-A). Debe mencionarse también que teniendo en cuenta la intensidad de coloración de las bandas, β -glucosidasa II presenta mayor actividad enzimática que las otras dos β -glucosidasas, haciéndose muy intensa al final de la fermentación.

Se observó también que la β -glucosidasa I, la β -glucosidasa II y la β -glucosidasa III presentan actividad endoglucanasa, además, β -glucosidasa II presentó actividad celobiohidrolasa (Figura N° 2-C y 2-B). Estos resultados podrían sugerir que las enzimas del sistema celulasa estarían formando un complejo celulasa que presenta actividades endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa y xilanasas (34, 6, 5), sin embargo, esto no es posible porque la distancia migrada por el supuesto complejo presenta un bajo peso molecular (alrededor de 60,000 daltons).

La otra posibilidad es que las enzimas endoglucanasas no específicas sean las que estén presentando esta actividad β -glucosidasa (21).

Esta múltiple función de las β -glucosidasas puede ser explicada también en base a los descubrimientos de que ellas también catalizan la eliminación exohidrolítica de residuos de glucosa de los extremos no reductores de oligosacáridos con enlaces β (5). Sakamoto *et al.* (30) hallaron que las β -glucosidasas fueron ligeramente activas sobre carboximetilcelulosa y celulosa ablandada pero que mostraron fuerte actividad hacia celooligosacáridos insolubles.

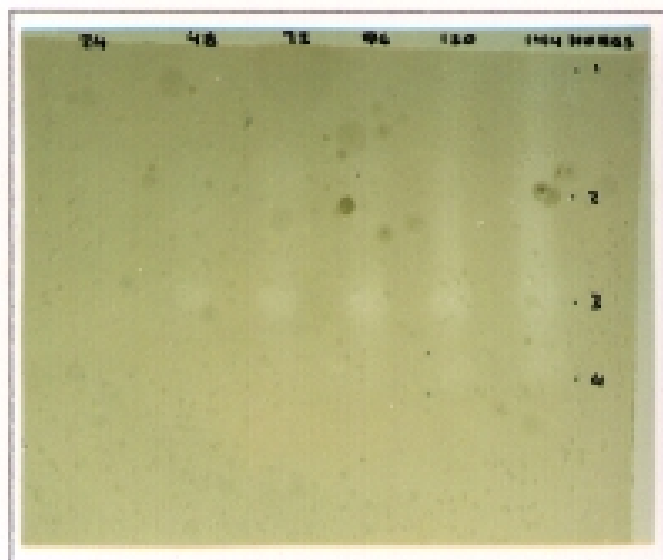
d) Evaluación de la actividad xilanasa

El zimograma para la enzima xilanasa muestra siete zonas de hidrólisis (Figura N° 2-D), las mismas que son similares con los patrones de formación de las enzimas endoglucanasas, a excepción de dos zonas que no forman parte del patrón (CMC-3 y CMC-9) (Figura N° 2-B y 2-D). Estas zonas corresponderían a endoglucanasas específicas (21) las cuales actúan sobre enlaces glicosídicos internos de la cadena de celulosa únicamente, mientras que las otras zonas de hidrólisis corresponderían a endoglucanasas no específicas que son también capaces de hidrolizar xilano y enlaces heterosídicos de MeUmb(Glc)₂ y pNPL (21). La posibilidad que las enzimas celulasas estarían formando complejos enzimáticos que presentan todas las actividades enzimáticas del “sistema” celulasa, inclusive actividad xilanasa (5, 6, 22) se hace menos probable frente a lo planteado por Kyriacou *et al.* (21).

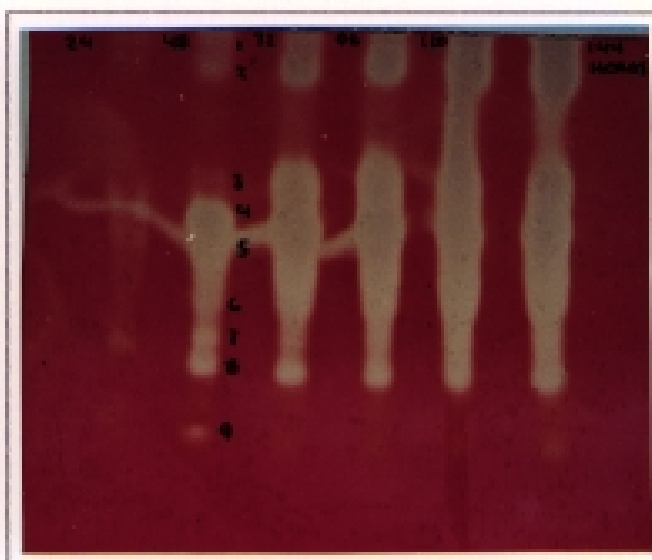
Se ha descubierto también que glucanasas no específicas de *Trichoderma spp.* que hidrolizan xilano pueden también atacar celulosa, carboximetilcelulosa, p-nitrofenil- β -glucósido, celooligómeros, celobiosa, p-nitrofenil- β -celobiósido y laminarán (36). Esto podría explicar por qué una fracción de las enzimas del sistema presenta actividades: endoglucanasa, β -glucosidasa y xilanasa (Figura N° 5).

Sin embargo, este no sería el caso para el zimograma de xilanasas, dado que si se compara con el zimograma de endoglucanasas, éste presenta mayor halo de hidrólisis lo que estaría indicando mayor actividad enzimática confirmando la idea de que se trataría de endoglucanasas inespecíficas las que están mostrando actividad xilanasa (Ver Figura N° 2-B y 2-D).

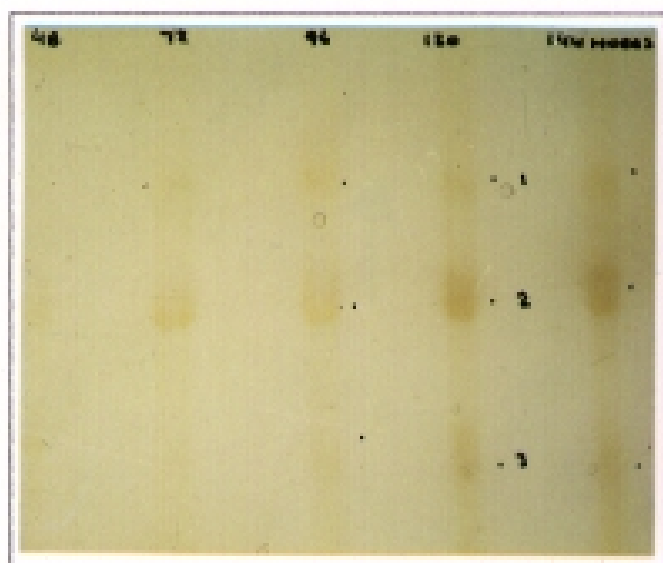
Figura N° 2 Zimogramas de celulasas de *T. reesei* LM-UC4 en fermentación sumergida - Sistema no denaturante



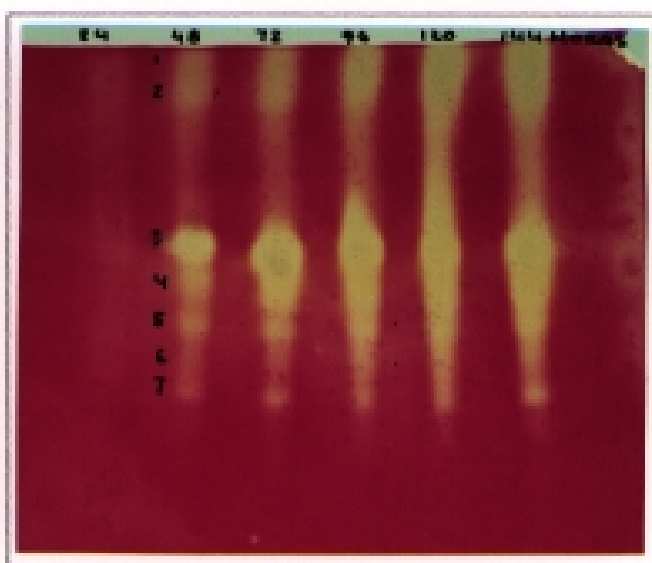
A) Zimograma de actividad hacia celulosa ablandada.



B) Zimograma de actividad endoglucanasa



C) Zimograma de actividad β-glucosidasa

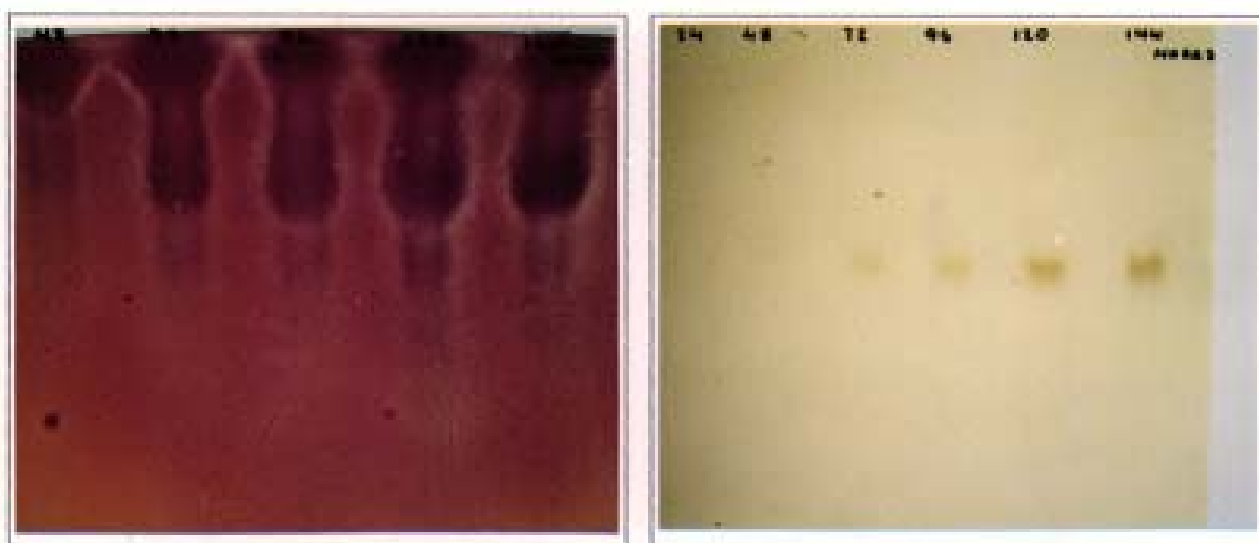


D) Zimograma de actividad xilanasa

Sistema denaturante

Los zimogramas obtenidos en el sistema denaturante para la actividad celulasa total y para la actividad xilanasasa se vieron afectados por la presencia del detergente sodio dodecil sulfato (SDS), no se observaron halos de hidrólisis. El zimograma obtenido para la actividad β -glucosidasa (Figura N° 3-B) fue diferente al zimograma obtenido en condiciones no denurantes, sólo se observó una banda con actividad β -glucosidasa, evidentemente la presencia del detergente afectó la actividad de la enzima. El zimograma para la enzima endoglucanasa (Figura N° 3-A) tendió a mostrar el mismo patrón que el zimograma obtenido en condiciones no denaturante.

Figura N° 3 Zimogramas de celulasas de *T. reesei* LM-UC4 en fermentación sumergida - Sistema denaturante



A) Zimograma de endoglucanasa.

B) Zimograma de β -glucosidasa

Proteínas totales

La figura N° 4-B muestra el perfil electroforético de proteínas totales para fermentación sumergida, en ella se observan aproximadamente 20 bandas de proteínas (PROT-1 a PROT-20) que aparecen desde el primer día de fermentación, de las cuales sólo algunas presentan actividad celulasa. El perfil de proteínas totales es similar en todo el proceso de fermentación, es decir, el número de proteínas se mantiene constante desde el primer día hasta el final de la fermentación. Este perfil apoya la idea de que las múltiples zonas de hidrólisis que se observan en los zimogramas no es producto de una proteólisis parcial de una enzima precursora sino que es una propiedad inherente de las enzimas celulasas.

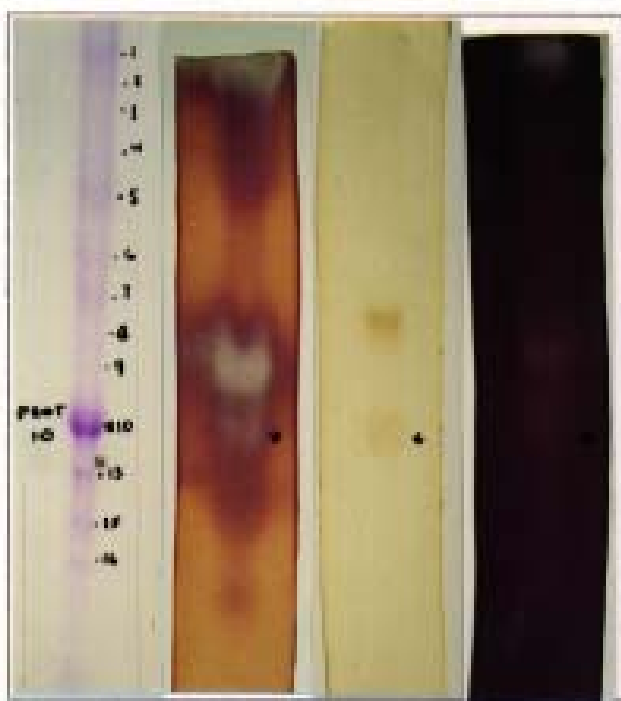
Las proteínas PROT-1, PROT-5, PROT-10 y PROT-14 mostraron actividad exoglucanasa, estas enzimas tienen un peso molecular de 600,000; 280,000; 110,000 y 70,000 daltons, respectivamente. Las proteínas PROT-1, PROT-3, PROT-5, PROT-8, PROT-9, PROT-10, PROT-14, PROT-15 y PROT-18 presentaron actividad endoglucanasa. Los pesos moleculares de estas proteínas son: 600,000; 510,000; 280,000; 165,000; 120,000; 110,000; 70,000; 64,000 y 39,000 daltons, respectivamente. Las proteínas PROT-8, PROT-10 y PROT-15 son las identificadas como β -glucosidasa I, β -glucosidasa II y β -glucosidasa III respectivamente, estas enzimas tienen un peso molecular de 165,000; 110,000 y 64,000 daltons respectivamente. Las proteínas PROT-1, PROT-3, PROT-8, PROT-9, PROT-10, PROT-14 y PROT-15 presentaron actividad xilanasasa. Los pesos moleculares de estas proteínas son: 600,000; 510,000; 165,000; 120,000; 110,000; 70,000 y 64,000 respectivamente.

Las proteínas obtenidas en fermentación sumergida tienen pesos moleculares muy altos, alcanzando en algunos casos hasta 600,000; sin embargo, también se ha obtenido proteínas con pesos

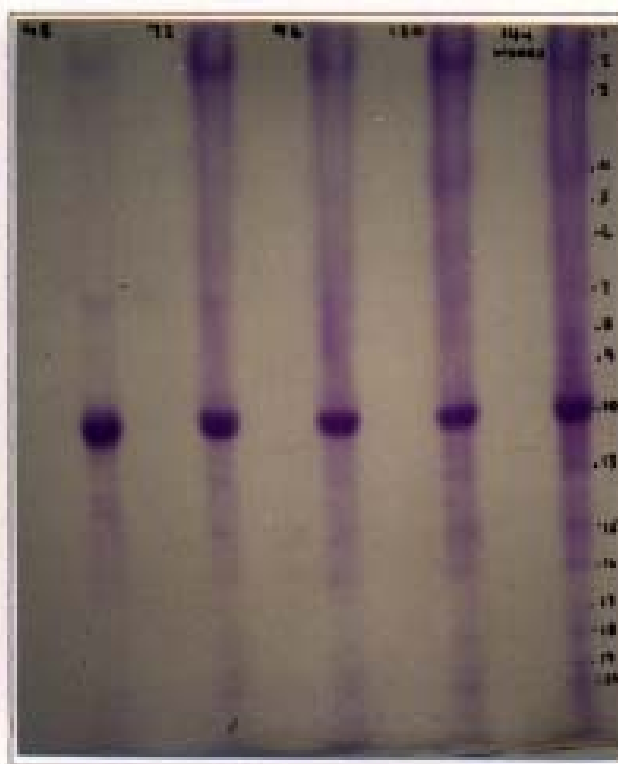
moleculares inferiores a 100,000 daltons. Las proteínas de alto peso molecular, correspondería a los probables complejos enzimáticos que estarían formando las enzimas del “sistema” celulasa.

Se puede advertir, también, que la proteína PROT-10 (Figura N° 4-B) mostró las actividades exoglucanasas, endoglucanasas, β -glucosidasas y xilanasas. Esta proteína es una banda gruesa que aparece desde el primer día de fermentación. Los resultados obtenidos aplicando la técnica de fraccionamiento de geles de poliacrilamida, además de los zimogramas desarrollados anteriormente, confirman esta observación (Ver Figura N° 4-A). En la figura N° 5 también se muestran los resultados obtenidos; en él se observa que los picos de endoglucanasa, β -glucosidasa y xilanasas coinciden los tres a la vez.

Figura N° 4 Proteínas totales y zimogramas de celulasas de *T. reesei* LM-UC4 en fermentación sumergida. Sistema no denaturante



A) Análisis de proteína extracelular por PAGE después de 120 horas de crecimiento de *T. reesei* LM-UC4 en bagacillo. De izquierda a derecha: Proteínas totales y zimogramas de endoglucanasa, β -glucosidasa y xilanasas.

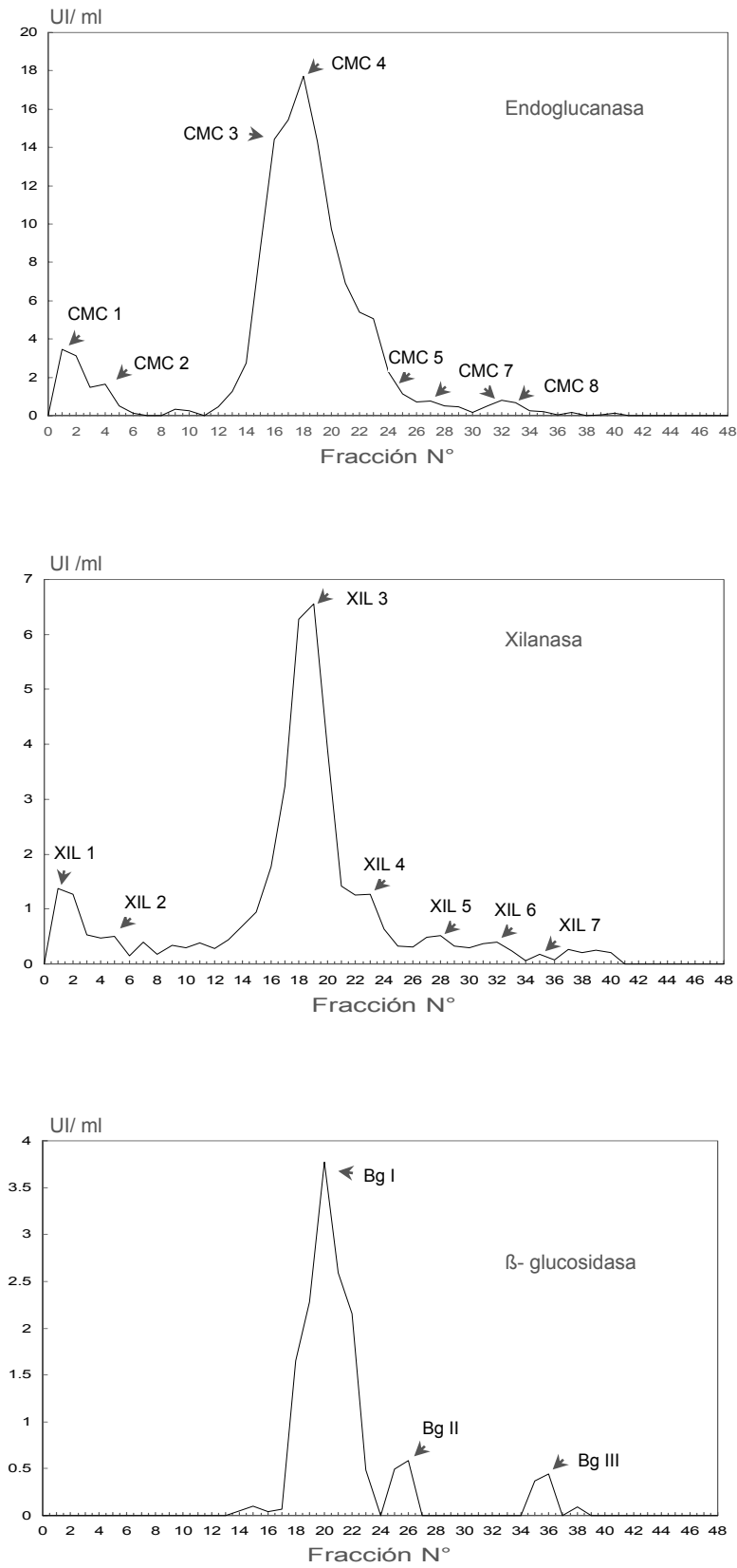


B) Análisis de proteína extracelular por PAGE después de crecimiento de *T. reesei* LM-UC4 en bagacillo. Las columnas corresponden a las horas de fermentación (De 48 a 144 horas)

CONCLUSIONES

- 1 Se identificó un complejo que presenta actividad endoglucanasa-celobiohidrolasa (complejo exo-endo)
- 2 Se identificaron nueve zonas de hidrólisis que presentan actividad endoglucanasa, de las cuales dos son endoglucanasas específicas
- 3 Se identificaron tres enzimas que presentan actividad β -glucosidasa: β -glucosidasa I, β -glucosidasa II y β -glucosidasa III
- 4 Se identificaron siete zonas de hidrólisis que presentan actividad xilanasas
- 5 No hay variabilidad temporal en el número de proteínas totales secretadas en fermentación sumergida

Figura N° 5 Actividad enzimática de las fracciones obtenidas de PAGGE
Fermentación sumergida *T. reesei* LM-UC4



BIBLIOGRAFÍA

- 1 BAGGA, P., D. SANDHU & S. SHARMA. 1990. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. Journal of Applied Bacteriology. 68: 61-68.
- 2 BEGUIN, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo red-stained agar replicas. Anal. Biochem. 131: 333-336
- 3 BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- 4 CANEVASCINI, G., D. FRACHEBOUD, AND H. MEIER. 1983. Fractionation and identification of cellulases and other extracellular enzymes produced by *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile* during growth on cellulose or cellobiose. Can. J. Microbiol. 29: 1071-1080.
- 5 CONNELLY, I. *et. al.* 1991. Novel carbohydrase "complex" from solid-state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum*. Enzyme Microb. Technol. 13:470-477.
- 6 COUGHLAN, M. P. AND L. G. LJUNGDAHL. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. Biochemistry and genetics of cellulose degradation. pp 11-30.
- 7 DUEÑAS, R., R.TENGERDY AND M. GUTIÉRREZ-CORREA. 1995. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 333-337.
- 8 FÅGERSTAM, L. G. AND L. PETTERSSON. 1979. The cellulolytic complex of *Trichoderma reesei* QM 9414. FEBS LETTERS. 98:363-367.
- 9 FARKAS, V., A. JALANKO AND N. KOLAROVA. 1982. Characterization of cellulase complexes from *Trichoderma reesei* QM 9414 and its mutants by means of analytical isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Acta. 706: 105-110.
- 10 GHOSE, T. (ED.). 1987. Measurement of cellulase activities. Pure & Appl. Chem., IUPAC. 59(2): 257-268.
- 11 GILBERT, M., C. BREUIL & J. N. SADDLER. 1992. Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B. Bioresource Technology. 39:147-154.
- 12 GONG, C., M. LADISCH AND G. TSAO. 1977. Cellobiase from *Trichoderma viride*: Purification, properties, kinetics and mechanism Biotechnology and Bioengineering. 19:959-981.
- 13 GUTIÉRREZ-CORREA, M. 1987 Bioconversión de residuos lignocelulósicos en etanol y proteína. En "Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Nacional", pp. 81-95, CONCYTEC, Lima-Perú.
- 14 HAGSPIEL K., D. HAAB AND C. KUBICEK. 1989. Protease activity and proteolytic modification of cellulases from a *Trichoderma reesei* QM 9414 selectant. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 61-67
- 15 JACKSON, M. AND D. TALBURT. 1988. Purification and partial characterization of an extracellular β -glucosidase of *Trichoderma reesei* using cathodic run, polyacrylamide gel electrophoresis. Biotechnol. Bioeng. 32: 903-909.
- 16 JULCA, M. Y M. GUTIÉRREZ-CORREA. 1987. Inducción y selección de mutantes hipercelulolíticos de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 mediante irradiación UV y cafeína. Boletín de Lima. 54:48-54.
- 17 KWON, K.S., J. LEE, H. G. KANG AND Y.C. HAH. 1994. Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. Appl Environ Microbiol. 60: 4584-4586.
- 18 KNOWLES, J., P. LEHTOVAARA AND T. TEERI. 1987. Cellulase families and their genes. Trends Biotechnol. 5: 255-261.
- 19 KOLBE, J. AND C.P. KUBICEK. 1990. Quantification and identification of the main components of the *Trichoderma* cellulase complex with monoclonal antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:26-30.
- 20 KUBICEK, C. 1983. β -glucosidase excretion in *Trichoderma* strains with different cell wall bound β -1,3-glucanase activities. Can. J. Microbiol. 29:163-169.
- 21 KYRIACOU, A., C. R. MCKENZIE AND R. J. NEUFELD. 1987. Detection and characterization of the specific and nonspecific endoglucanases of *Trichoderma reesei*: evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II. Enzyme Microb. Technol. 9: 25-32.

- 22 LABUDOVÁ, I. AND V. FARKAŠ. 1983. Multiple enzyme forms in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. *Biochim Biophys Acta*. 744:135-140.
- 23 LAEMMLI, U. 1970. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*. 227: 680-685.
- 24 MANDELS, M., STERNBERG, D. AND ANDREOTTI, R. 1975 Growth and cellulase production by *Trichoderma*. En "Proceedings of Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulase", eds. Bailey, M., Enari, T.M. and Linko, M., pp. 81-109, Helsinki, Finland: SITRA
- 25 McHALE, A. AND M. P. COUGHLAN. 1981. The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*. Identification of the various components produced during growth on cellulosic media. *Biochim. Biophys. Acta*. 662:145-151.
- 26 MILLER, G. L. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- 27 MUÑIZ, G., M. GUTIÉRREZ-CORREA AND R.P. TENDERDY. 1993. Solid substrate fermentation of potato cellulosic residues with *Chaetomium cellulolyticum*. En "Agro-Food-Industry Hi-Tech". January/ February . pp 33-34.
- 28 NIEVES, R. A., R. P. ELLIS, AND M. E. HIMMEL. 1990. Monoclonal antibody purification of *Trichoderma reesei* EG I. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25: 397-406.
- 29 REESE, E.T. AND MANDELS, M. 1966 β -glucanases other than cellulases. In *Methods in Enzymology*, Eds. Newfeld, E.F. and Ginsburg, V., New York: Academic Press 8:607-615.
- 30 SAKAMOTO, R., M. ARAI AND S. MURAO. 1985. Enzymic properties of three β -glucosidases from *Aspergillus aculeatus* N° F-50. *Agric Biol Chem.* 49:1283-1290.
- 31 SHEIR-NEISS, G. AND B. S. MONTENECOURT. 1984. Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 46-53.
- 32 SHOEMAKER, S. P. AND R. D. BROWN. 1978. Characterization of endo-1,4- β -D-glucanase purified from *Trichoderma viride*. *Biochim. Biophys. Acta.* 523: 147-161.
- 33 SPREY, B. AND C. LAMBERT. 1984. Heterogeneity of cellulase complexes from *Trichoderma reesei*: a preparative isoelectric focusing study of some extracellular hydrolases. *FEMS Microbiology Letters.* 23:227-232.
- 34 SPREY, B. AND H. BOCHEM. 1993. Formation of cross-fractures in cellulose microfibril structure by an endoglucanase-cellobiohydrolase complex from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters.* 106:239-244.
- 35 TILBEURGH, H. AND M. CLAEYSSSENS. 1985. Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. *FEBS Lett.* 187:283-288.
- 36 WONG, K. AND J. N. SADDLER. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. *Critical reviews in Biotechnology.* 12:413-435.