

## INDUCCION-REPRESION DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA EN *NECTRIA CATALINENSIS* (ASCOMYCOTINA)

Por ALEJANDRO G. PARDO\* Y FLAVIA FORCHIASSIN\*\*

**Summary** *Induction-repression of the cellulolytic activity of Nectria catalinensis.* The production of cellulolytic enzymes by *Nectria catalinensis* was investigated. Shake cultures gave better yields of endoglucanase as compared to stationary cultures, although exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase could be measured only in the last situation. The production of endoglucanase was induced by the presence of crystalline cellulose (probably by a soluble product of cellulose hydrolysis) and inhibited by the presence of glucose in the culture medium.

### INTRODUCCION

La importancia del estudio de la degradación de celulosa reside en el hecho de que este material, el compuesto más abundante de la naturaleza, componente principal de las paredes celulares de los vegetales, es lenta y difícilmente degradado. La degradación de celulosa implica por parte de los organismos celulolíticos, la producción de un sistema enzimático múltiple, exocelular, capaz de desorganizar la estructura cristalina del polímero e hidrolizarlo hasta unidades de glucosa. Las celulasas son un sistema multienzimático constituido básicamente por tres grupos de enzimas: 1- Endoglucanasas (1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolasas), que actúan al azar sobre la cadena celulósica y producen una disminución del grado de polimerización. 2- Exoglucanasas, representadas por dos grupos: 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas y 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolasas, que liberan respectivamente celobiosa o glucosa a partir de extremos no reductores. 3- Celobiasas ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasas), pertenecientes al grupo más amplio de las  $\beta$ -glucosidasas, que clivan al dímero celobiosa en dos glucosas. Todas las celulasas fúngicas estudiadas contienen una multiplicidad de componentes enzimáticos (isoenzimas) (Wood y García-Campayo, 1990; Coughlan, 1985). El número real de componentes depende de la cepa y de la forma en que ésta ha sido cultivada (Wood y García-Campayo, *op. cit.*). *Nectria catalinensis* es una espe-

cie perteneciente al orden Hypocreales, que vive sobre troncos muertos de *Gleditsia triacanthos* (Lima *et al.*, 1988). El hecho de crecer sobre madera y estudios preliminares (método de screening para hongos celulolíticos, Mercuri, 1987) mostraron su potencial actividad celulolítica. El objetivo de este trabajo fue obtener una primera aproximación sobre la producción del sistema celulolítico de *Nectria catalinensis* in vitro.

### MATERIALES Y METODOS

*Organismo:* *Nectria catalinensis* Lima. BAFC 30700. Los cultivos se mantuvieron a 5°C en medio APG (agar-papa-glucosado). *Medios de cultivo:* Medio de cultivo basal:  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,5g;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,6 g;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 0,11 g;  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 mg;  $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,09 mg;  $\text{BO}_4\text{H}_2$ , 0,07 mg;  $\text{MoO}_4\text{Na}_2$ , 0,02 mg;  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , 1 mg;  $\text{Cl}_2\text{Zn}$ , 10 mg; tiamina, 0,1 mg; tween 80, 2 ml; agua bidestilada hasta 1l.

Fuentes de carbono: Glucosa (G) y/o celulosa cristalina (CC); en concentraciones variables, según se indica en cada experiencia.

Fuentes de nitrógeno: Urea (U), 0,5 g/l o asparagina (A), 4 g/l; ambas a una concentración de 0,75 g de N/l.

El medio de cultivo basal y la fuente de carbono fueron autoclavados a 121° C y 1,2 atm., por 20 minutos.

La fuente de nitrógeno fue esterilizada separadamente por filtración a través de membrana de nitrocelulosa y adicionada en condiciones estériles. Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico. Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 125 ml, con 50 ml de medio en el caso de cultivos en agitación o 25 ml de medio en el caso de cultivos

\* Becario CONICET.

\*\* Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4° piso. 1428 Buenos Aires, Argentina. Investigador CONICET.

estáticos. La incubación tuvo lugar en cámara de cultivo New Brunswick G-27 a 23°C y agitación rotativa constante de 125 rpm, en el caso de cultivos en agitación. Para cultivos estáticos, excepto la última, se mantuvieron todas las demás condiciones de incubación. La cosecha del micelio fue realizada en los días prefijados en el caso de las curvas de crecimiento y al vigésimo día de cultivo para los demás experimentos. El micelio fue cosechado por filtración a presión reducida en embudo Buchner a través de papel de filtro. El micelio o sólidos de cultivo (micelio más celulosa cristalina no degradada al día de cosecha), retenidos fueron lavados con agua bidestilada, secados en estufa a 70°C durante 18 hs., pesados, molidos y guardados a -20°C. Los sobrenadantes de cultivo (Sn) fueron guardados a -20°C.

**Estimación del crecimiento:** Se utilizó como estimador el contenido de proteínas del micelio. Para ello se tomaron 100 mg de micelio o sólidos de cultivo, según el caso, y fueron hidrolizados durante 30 minutos a 100°C con NaOH 1N. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 1000 xg y las proteínas extraídas fueron dosadas, en el sobrenadante, por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA), 1 mg/ml en NaOH 1N, como estándar.

**Medición de las actividades enzimáticas:** En todos los casos se utilizaron alícuotas de los sobrenadantes de cultivo como fuente de enzima.

**Endo-β-D-1,4-glucanasa:** Se mezclaron 400 µl de carboximetil celulosa (CMC) (5 mg/ml en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8) con 100 µl de Sn de cultivo y se incubaron 30 min. a 37°C. Se midieron azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1944) utilizando glucosa 1 mg/ml como estándar.

**Exo-β-D-1,4-glucanasa:** Se mezclaron 800 µl de CC (10 mg/ml en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8) con 200 µl de Sn de cultivo y se incubó la mezcla 2 hs a 38°C. Luego se centrifugaron los tubos a 1000xg durante 20 min., se descartó el pellet de CC y en el Sn se midieron azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, op. cit.; Nelson, op. cit.), utilizando glucosa 1 mg/ml como estándar.

**Unidad de actividad:** en ambos casos la unidad de actividad enzimática (U. E.) es la cantidad de enzima requerida para liberar, en las condiciones del ensayo, 1 nmol/min. de azúcar reductor, expresado como equivalente de glucosa.

**β-glucosidasa:** Se mezclaron 900 µl de p-nitrofenil-β-D-1,4-glucopiranosido (0,2 mg/ml en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8) con 100 µl de Sn de cultivo y se incubó la mezcla 1 h a 50°C. La reacción se detuvo con el agregado de 2 ml de buffer Clark y Lubs pH = 9,8 (50 ml de ác. bórico 0,1 M en ClK 0,1 M más 40,8 ml de NaOH 0,1 N, y se lleva a 100 ml con

agua bidestilada) y se leyó la absorbancia a 430 nm. Se utilizó como estándar p-nitrofenol 1mM en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8.

**Unidad de actividad:** La unidad de actividad enzimática (U. E.) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1nmol de p-nitrofenol/min., en las condiciones del ensayo.

Todos los resultados presentados en este trabajo son el promedio de tres experimentos realizados por triplicado, con un error estándar menor al 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Crecimiento y producción enzimática en los medios de cultivo CC (0,8%)-G (0,2%)-U y CC (0,8%)-G (0,2%)-A*

Como una primera aproximación para inducir la síntesis del sistema celulolítico de *N. catalinensis* en cultivo se utilizaron dos medios que contenían celulosa cristalina (CC), 0,8%, como fuente de C e inductor del sistema enzimático; glucosa (G), 0,2%, como fuente de C para permitir el crecimiento del hongo hasta una cierta biomasa crítica, capaz luego de ser inducida a producir celulasas y urea (U) o asparagina (A), como fuentes de N. En las figs. 1 y 2 se muestran los resultados. Puede observarse que en ambos medios de cultivo el máximo crecimiento se obtuvo alrededor del día veinte, así como los máximos de producción de proteínas extracelulares y endoglucanasa. El medio que contenía urea como fuente de N fue mejor para la producción de endoglucanasa (fig. 1), mientras que el medio que contenía asparagina permitió una mayor producción de proteínas extracelulares y biomasa (fig. 2). Se ensayaron además las actividades de exoglucanasa y β-glucosidasa pero no fueron detectadas en estos medios. Debido a esto se cultivó a *N. catalinensis* en el medio CC(0,8%)-G(0,2%)-U en condiciones estáticas (fig. 3). En este caso se detectó actividad de exoglucanasa y β-glucosidasa pero la actividad endoglucanasa fue inferior a la obtenida en el mismo medio en condiciones de agitación. Una posible explicación a estos resultados es que en condiciones de agitación constante las partículas de celulosa se encuentran en suspensión y las hifas fúngicas en íntimo contacto con ellas; por lo tanto las enzimas del complejo celulasa se encontrarían adsorbidas en la interfase hifa-partícula de celulosa y por ello en su mayoría quedarían retenidas en los sólidos de cultivo durante la filtración; en el caso de la endoglucanasa, ésta se habría podido medir en los sobrenadantes de los cultivos citados, por ser sintetizada en mayor cantidad que las otras dos enzimas. En cambio, en condiciones de cultivo estático, dado que la celulosa precipita y las hifas del hongo per-

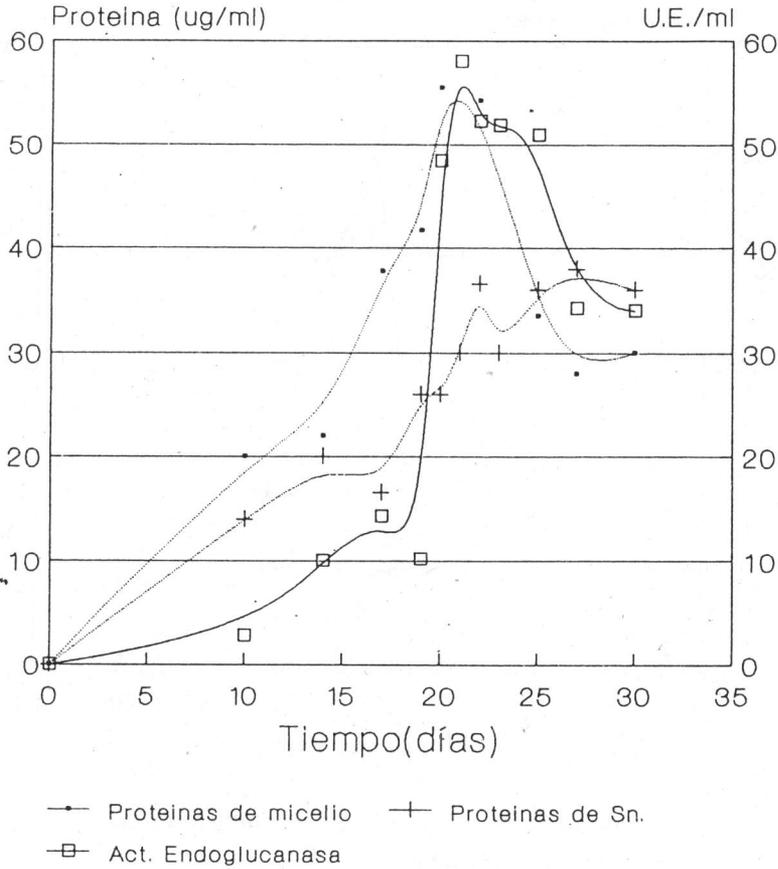


Fig. 1.— Cinética de crecimiento (proteínas de micelio), de producción de proteínas extracelulares y de endoglucanasa en *Nectria catalinensis*, creciendo en medio: celulosa cristalina (0,8%) - glucosa (0,2%) - urea. Incubación con agitación.

manecen cerca de la superficie del líquido, por ser el  $O_2$  un factor limitante en estas condiciones, no existiría una estrecha interfase hifa-partícula de celulosa, como en el caso de agitación, y por lo tanto estaría facilitada la difusión de las enzimas celulolíticas para poder degradar al polímero.

Actualmente se cree que al menos algunas celulasas fúngicas se encuentran unidas a la pared hifal o se hallan en una asociación estrecha con la hifa fúngica, por ejemplo, contenidas en una matriz o vaina polisacáridica, rodeando a la hifa. Esto se ha sugerido para el caso de hongos de pudrición blanca y de pudrición blanda, los cuales degradan la celulosa dentro de la madera sólo a una distancia limitada de las hifas (Markham y Bazin, 1991). Existen citas de una unión directa entre enzimas celulolíticas y la

pared hifal, por ejemplo, la  $\beta$ -glucosidasa de *Sporotrichum pulverulentum* (Eriksson, 1978) y la de *Trichoderma reesei* (Jackson y Talburt, 1988).

El nivel más bajo de endoglucanasa observado en condiciones estáticas puede deberse a problemas en la aireación de los cultivos y por lo tanto limitación de  $O_2$ , lo que influiría negativamente en la síntesis de endoglucanasa. No se encontró variación respecto de las proteínas de micelio, entre las condiciones estáticas o de agitación. Sin embargo, el contenido proteico de los sobrenadantes de cultivo fue mayor en condiciones de cultivo estático, hecho que puede explicarse por lo expuesto anteriormente para las celulasas, ya que serían éstas las que marcan la diferencia de contenido de proteínas de los sobrenadantes entre las dos condiciones de cultivo. Por último obsérvese que

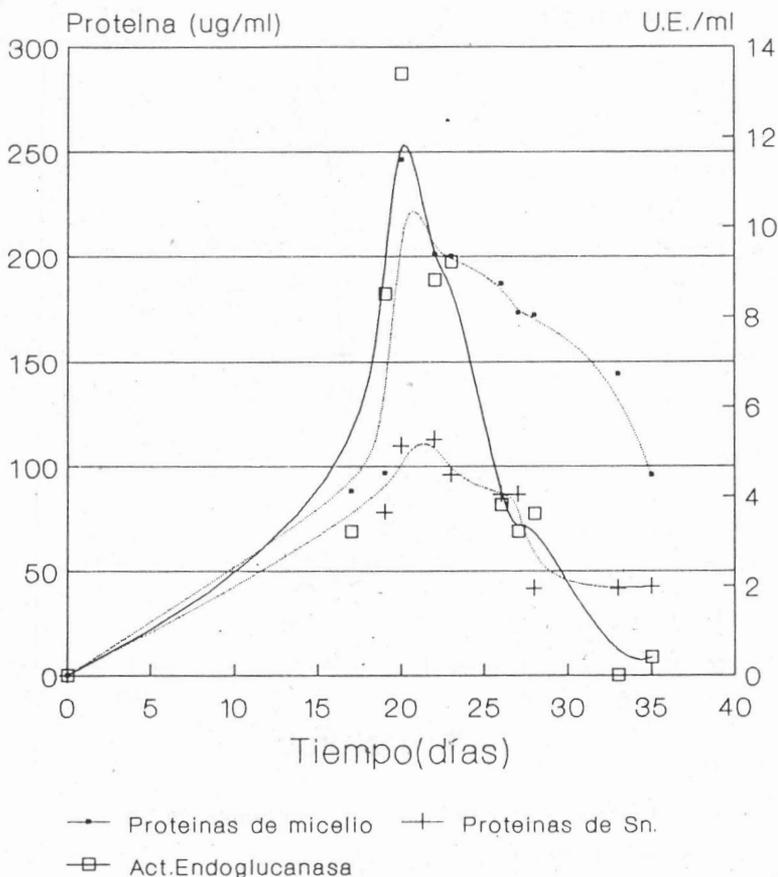


Fig. 2.— Cinética de crecimiento (proteínas de micelio), de producción de proteínas extracelulares y de endoglucanasa en *Nectria catalinensis*, creciendo en medio: celulosa cristalina (0,8%) - glucosa (0,2%) - asparagina. Incubación con agitación.

los máximos de producción enzimática, proteínas extracelulares y crecimiento de los cultivos estáticos se dieron alrededor del vigésimo día.

*Efecto de la variación de la relación celulosa cristalina/ glucosa (CC/G)*

Con el objetivo de determinar la influencia de la relación entre la concentración de celulosa cristalina y glucosa sobre la síntesis de endoglucanasa se cultivó a *N. catalinensis* en distintos medios de cultivo, en los cuales se varió la relación entre las concentraciones de CC y G; estos medios fueron los siguientes: CC(1%)-U, CC(0,8%)-G(0,2%)-U, CC(0,6%)-G(0,4%)-U, CC(0,2%)-G(0,8%)-U, y G (1%)-U. Los resultados obtenidos (fig. 4) indican que a medida que aumenta la concentración de celulosa cristalina en el medio de cultivo y por lo tanto disminuye la de glucosa, la producción de endoglucanasa aumenta. Esto de-

muestra dos cosas: 1- Que la CC es capaz de inducir la síntesis de endoglucanasa, ya que se observa un aumento en los niveles de ésta al comparar los resultados obtenidos en un medio de cultivo sin CC (G(1%)-U) con uno con CC (CC(0,2%)-G(0,8%)-U). 2- Que la glucosa actuaría como represor catabólico sobre la síntesis de endoglucanasa, ya que a medida que la concentración de G disminuye se detecta más actividad de endoglucanasa.

Podría argumentarse en contra de esta hipótesis que la glucosa no sea un represor catabólico, sino que a medida que disminuye la concentración de G del medio aumenta la de CC que es el inductor de la endoglucanasa y por lo tanto induce a ésta. Consideramos que esto es falso, ya que en ninguno de los medios que tenían celulosa ésta fue totalmente consumida hacia el final del período de crecimiento, y por lo tanto no fue factor limitante en la inducción, sino que, si bien la celulosa actuó como inductor,

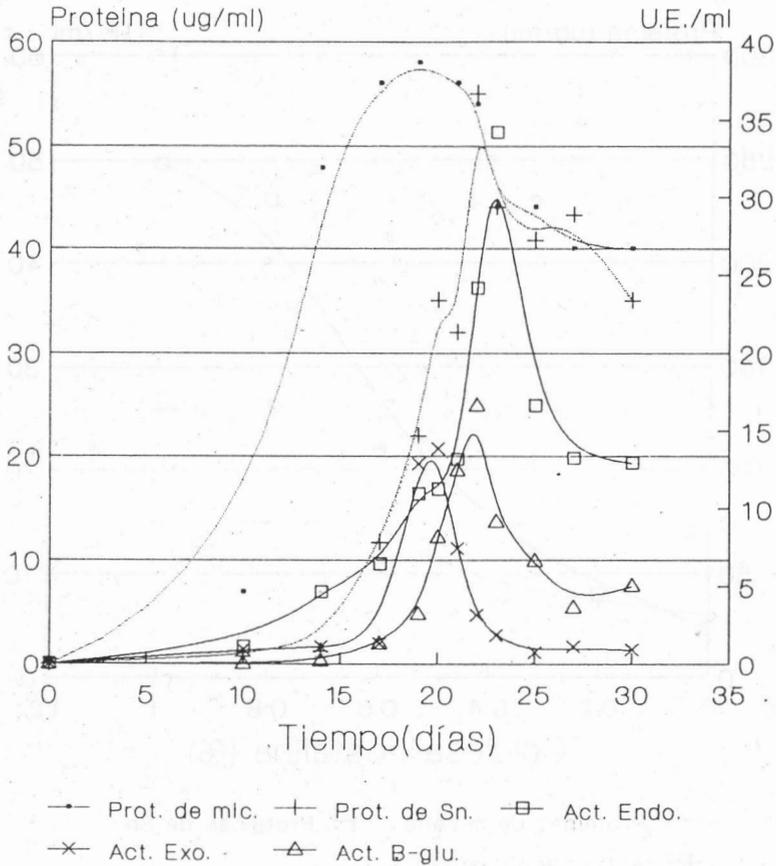


Fig. 3.—Cinética de crecimiento (proteínas de micelio), de producción de proteínas extracelulares y de producción enzimática (actividad endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa) de *Nectria catalinensis*, en medio CC-Glu-Urea. Incubación en condiciones estáticas.

además, la glucosa fue represor catabólico. Existen varias pruebas experimentales con diversas especies celulolíticas y es aceptado para hongos filamentosos que la producción de celulasas es regulada por inducción y represión catabólica (Sternberg, 1976; Brown, 1983; Ryu y Mandels, 1980; Canevascini *et al.*, 1979; Sternberg y Mandels, 1982), siendo el inductor real un producto soluble de la hidrólisis de la celulosa. Esta última es el inductor primario y es insoluble y por lo tanto no puede ser incorporada como tal a las células. De acuerdo con esta hipótesis se producirían constitutivamente bajas cantidades de celulasas que hidrolizarían una mínima porción de celulosa, cuyos productos detonarían el proceso de inducción. La inducción *in vitro* de celulasas por celobiosa se ha comprobado para diversos hongos: *Trichoderma* (Sternberg, *op. cit.*; Mandels y Reese, 1960; Illanes y Rossi, 1980), *Sporotrichum termophile* (Canevascini *et al.*, *op. cit.*), *Talaromyces emersonii* (Moloney *et al.*,

1983), entre otros; aunque para el caso particular de *Trichoderma reesei* se ha comprobado que, dependiendo de la concentración, la celobiosa puede actuar como inductor o como represor de la síntesis de celulasas (Whitaker, 1971). Sternberg (*op. cit.*) determinó que no se producen celulasas cuando *T. reesei* crece con celobiosa como fuente de C. Otros disacáridos han sido citados como inductores de celulasas: lactosa (Mandels, 1975) y sofrosa (Sternberg y Mandels, 1979; Loewenberg y Chapman, 1977). Se ha demostrado además la inducción de endoglucanasa por tiocelobiosa en *Schizophyllum commune* (Rho *et al.*, 1982) y de  $\beta$ -glucosidasa en *Trichoderma reesei* por metil- $\beta$ -glucósidos (Sternberg y Mandels, 1982). Respecto de la represión por catabolitos resultantes de la hidrólisis de celulosa se ha comprobado que glucosa o celobiosa limitan o inhiben la producción de enzimas celulolíticas en *Verticillium albo-atrum* (Cooper y

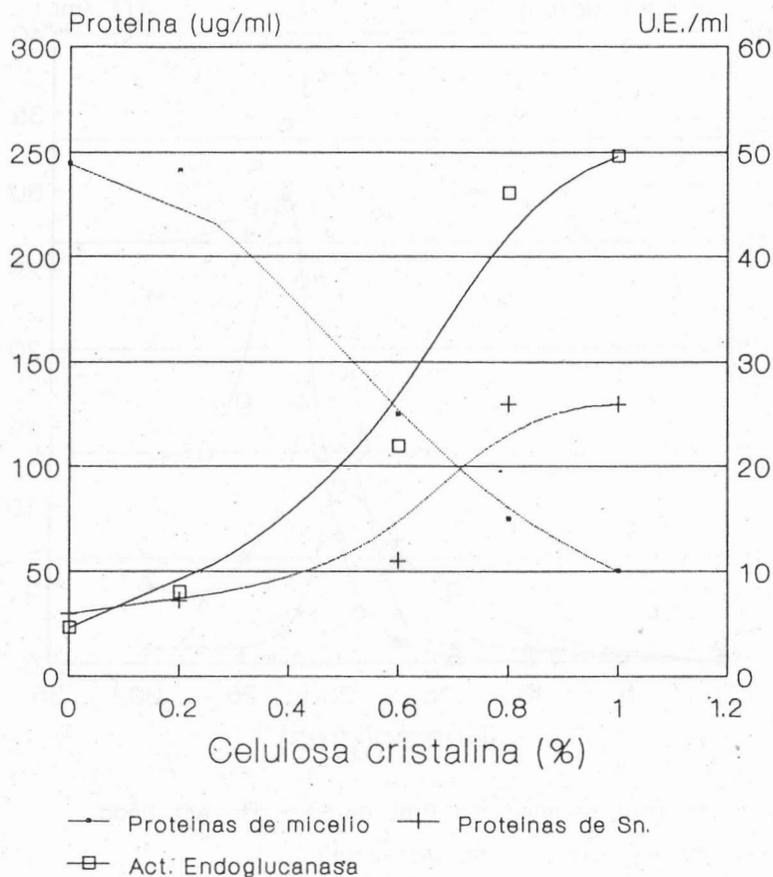


Fig. 4.—Crecimiento (proteínas de micelio), producción de proteínas extracelulares y actividad endoglucanasa de *Nectria catalinensis* a los 20 días de incubación en condiciones de agitación y con urea como fuente de N, en función la variación de las concentraciones relativas de celulosa cristalina y glucosa presentes en el medio de cultivo.

Wood, 1973), *Myrothecium verrucaria* (Hulme y Stranks, 1970; 1971), *Trichoderma viride* (Nisizawa et al., 1972), *T. reesei* (Sternberg y Mandels, 1982), *Penicillium italicum* (Santos et al., 1977), *Sporotrichum termophile* (Canevascini et al., op. cit.).

Volviendo a los resultados experimentales, las proteínas extracelulares mostraron un comportamiento similar a la endoglucanasa, ya que aumentaron a medida que el medio de cultivo fue más rico en celulosa cristalina y más pobre en glucosa; esto apoya la idea de una mayor síntesis de endoglucanasa en estas condiciones.

Un comportamiento inverso se observó en el caso de las proteínas de micelio; consideramos que esto se debe a que la glucosa es un hidrato de carbono más fácilmente aprovechable que la celulosa cristalina y por lo tanto los medios más ricos en glucosa permitieron un mayor crecimiento del hongo. Cabe mencionar que en el medio de cultivo sin CC (G(1%)-U)

*Nectria catalinensis* produjo cierta cantidad, aunque baja, de endoglucanasa. Esto está de acuerdo con el modelo de inducción-represión explicitado previamente; siendo esa cantidad de endoglucanasa medida en el medio G(1%)-U el nivel basal constitutivo de éstas.

#### CONCLUSIONES

Se comprobó en *Nectria catalinensis* la capacidad de producir el sistema enzimático celulolítico dependiendo de las condiciones de cultivo.

El crecimiento de *N. catalinensis* fue independiente de las condiciones de agitación en el medio de cultivo CC(0,8%)-G(0,2%)-U; sin embargo, la utilización de este medio en cultivo estático permitió la detección de las actividades exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa, además de la endoglucanasa, lo cual no fue posible en agitación. En cultivo estático existirían

condiciones más favorables para la difusión de las enzimas celulolíticas. Por otra parte, los niveles de endoglucanasa fueron más bajos en condiciones estáticas que en agitación, posiblemente debido a un déficit en el contenido de O<sub>2</sub> del medio de cultivo estático.

Se comprobó para *N. catalinensis* la inducción de endoglucanasa por celulosa cristalina y su represión por glucosa.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CONICET, por la financiación parcial de este trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

- BRADFORD, M. 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.
- BROWN, D. E. 1983. Lignocellulose hydrolysis. *Phil. Trans. Royal Soc. London* 300: 305-322.
- CANEVASCINI, G., M. R. COUDRAY, J. P. REY, R. J. G. SOUTHGATE & H. MEYER. 1979. Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *J. Gen. Microbiol.* 11: 291-303.
- COOPER, R. M. & R. K. S. WOOD. 1973. Induction of synthesis of extracellular cell wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. *Nature* 246: 309-311.
- COUGHLAN, M. P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3: 39-109.
- ERIKSSON, K. E. 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotech. Bioeng.* 20: 317-332.
- HULME, M. A. & D. W. STRANKS. 1970. Induction and the regulation of production of cellulase by fungi. *Nature* 226: 269-470.
- HULME, M. A. & D. W. STRANKS. 1971. Regulation of cellulase production by *Myrothecium verrucaria* grown on non-cellulosic substrates. *J. Gen. Microbiol.* 69: 145-155.
- ILLANES, A. & M. C. ROSSI. 1980. Inducción de celulasa en *Trichoderma reesei* en medios de cultivo definidos. *Rev. Arg. Microbiol.* 12: 79-86.
- JACKSON, M. A. & D. E. TALBURT. 1988. Mechanism for  $\beta$ -glucosidase release into cellulose-grown *Trichoderma reesei* culture supernatante. *Exp. Mycol.* 12: 203-216.
- LIMA, C. E., F. FORCHIASSIN & M. E. RANALLI. 1988. Systematic and biological study of Hypocreales of Argentina. IV. *Nectria catalinensis* sp. nova. *Nova Hedwigia* 46: 149-156.
- LOEWENBERG, J. R. & C. M. CHAPMAN. 1977. Sophorose metabolism and cellulase induction in *Trichoderma*. *Arch. Microbiol.* 113: 61-64.
- MANDELS, M. 1975. Microbial sources of cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 5: 81-105.
- MANDELS, M. & E. T. REESE. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* 114: 1-7.
- MARKHAM, P. & M. J. BAZIN. 1991. Decomposition of cellulose by fungi. En: Arora D. K. et al. (Eds.) "Handbook of Applied Mycology". Vol. 1. pp. 379-424. M. Dekker, Inc. New York, USA.
- MERCURI, O. A. 1987. Degradación biológica de celulosa por *Ascobolus furfuraceus*. Tesis Doctoral. FCEN, UBA.
- MOLONEY, A. P., P. J. CONSIDINE & M. P. COUGHAN. 1983. Cellulose hydrolysis by the cellulases produced by *Talaromyces emersonii* when grown on different inducing substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1169-1173.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biochem.* 153: 375-380.
- NISIZAWA, T. H. SUZUKI & K. NISIZAWA. 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* 71: 999-1007.
- RHO, D., M. DESROCHERS, L. JURASEK, H. DRIGUEZ & J. DEFAYE. 1982. Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* 149: 47-53.
- RYU, D. D. Y. & M. MANDELS. 1980. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 91-102.
- SANTOS, T., J. R. VILLANUEVA & C. NOMBELA. 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* glucanases. *J. Bacteriol.* 129: 52-58.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* 159: 19-23.
- STERNBERG, D. 1976. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 35-53.
- STERNBERG, D. & G. R. MANDELS. 1979. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 139: 761-769.
- STERNBERG, D. & G. R. MANDELS. 1982.  $\beta$ -glucosidase induction and repression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Exp. Mycol.* 6: 115-124.
- WHITAKER, D. R. 1971. Cellulases. En: P. D. Boyer (Ed). "The Enzymes", Vol. 1. cap. 9. Acad. Press, N. Y.
- WOOD, T. M. & V. GARCIA-CAMPAYO. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1: 147-161.