

Desarrollo de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en un sustrato con base en la goma de *Anacardium occidentale*. Producción de α -D-galactosidasa

Growth of Aspergillus niger ATCC 11414 in a media with Anacardium occidentale gum.
Production of α -D-Galactosidase

**Mesa C., Luz Mila¹; Graterol, Eugenia ²;
Rodríguez -Valero, Sofía ¹; Araujo, Karelen³;
Clamens, Carmen² y León-Pinto, Gladys²**

¹Laboratorio de Micología, Escuela de Bioanálisis,
Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

²Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales,
Facultad de Humanidades y Educación de La Universidad del Zulia.

³Laboratorio de Fermentaciones Industriales, Escuela de Ingeniería
Química, Facultad de Ingeniería de La Universidad del Zulia,
Maracaibo, Venezuela. E-mail: luzmila.mesa@gmail.com

Resumen

Aspergillus niger ATCC 11414 en un medio de cultivo con base en la goma de *Anacardium occidentale* mostró las características morfológicas (macro-y microscópicas) que permiten su identificación. Se estudiaron varias condiciones de crecimiento en comparación con el medio de referencia Czapeck Dox Agar. El mejor crecimiento del hongo, observado en pH 4,5 y 6,2 y en presencia de iones magnesio, se seleccionó para estudiar la interacción hongo-sustrato, la cual se demostró por la actividad enzimática. La producción de α -D- galactosidasa, está de acuerdo con la presencia de α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- Galp en las ramificaciones de la estructura de la goma de *A. occidentale* y sugiere que la galactosa es usada por el hongo como fuente de carbono. Los resultados muestran que el medio con base en la goma de *A. occidentale* es adecuado para el crecimiento de *A. niger* y podría ser útil en aplicación biotecnológica.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, *Anacardium occidentale* , medio de cultivo, α -D- galactosidasa.

Recibido: 02-05-07 / Aceptado: 29-05-07

Abstract

Aspergillus niger ATCC 11414 in a media with *Anacardium occidentale* gum showed the morphological characteristics (macro- and microscopic) that led its identification. It was studied many growth conditions in comparison with Czapeck Dox Agar. The best growth of the fungus, observed at given conditions (pH 4.5; 6.2, presence of magnesium ions), was chosen to study the interaction fungus-gum which was demonstrated by the enzymatical activity. The production of α -D-galactosidase, supports by the presence of α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-Galp in the branches of *A. occidentale* gum structure, may suggest that galactose is used as carbon source by the fungus. The results showed that the media with *A. occidentale* gum is a good one for *A. niger* growth and may be useful for biotechnology application.

Key words: *Aspergillus niger*, *Anacardium occidentale* gum, culture media, α -D-galactosidase.

Introducción

Aspergillus niger, miembro del grupo de los Aspergilli negros, es una especie utilizada en las industrias alimentaria, farmacéutica, textil y química (1, 2, 3). Se ha reportado la producción de diferentes enzimas como glucosidasa, galactosidasa, amilasa, lacasa, fitasa y xilanasa (4, 5).

La cepa ATCC 11414 de *A. niger* se ha caracterizado en sustratos con base en exudados gomosos de especies localizadas en Venezuela, como *Cedrela odorata*, *Cercidium praecox* y *Acacia glomerosa* (6, 7). El crecimiento adecuado de *A. niger* en estos sustratos sugiere que existe, probablemente, una interacción hongo-sustrato, que podría ser de interés biotecnológico.

Anacardium occidentale, especie nativa de América, localizada en Venezuela, produce una goma clara y muy soluble en agua. Esta goma, hidocoloide, es un heteropolisacárido ácido constituido por β -D-galactopiranosas, α -D-glucopiranosas, α -L-arabinofuranosas, α -L-ramnopiranosas y ácido β -D-glucurónico y su 4-O-metil derivado. Su estructura contiene también, un material proteínaceo minoritario (8, 9). Se han reportado rasgos estructurales del polisacárido de esta goma

de especímenes localizados en la India (10) y recientemente, se han corroborado algunos de estos rasgos en gomas de especímenes de Brasil y se han aislado y caracterizado los oligosacáridos α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Galp y α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Galp (9).

Las α - y β -D-galactosidasas son enzimas que se encuentran comúnmente en la naturaleza y son capaces de remover α - o β -D-galactosa enlazada a una variedad de compuestos. Se han purificado algunas α -galactosidasas provenientes de *Aspergillus* spp (11).

El trabajo se refiere al desarrollo de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en un medio de cultivo con base en la goma de *Anacardium occidentale* y a la producción de α -D-galactosidasa.

Materiales y Métodos

Origen de las muestras

La goma de *Anacardium occidentale*, conocida en Venezuela como cauñil o merey, se colectó en época no lluviosa (Enero-Marzo, 2005) y fue suministrada por el Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación. La cepa de *Aspergillus niger* ATCC 11414, donada por el laboratorio de

Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales, Facultad de Ingeniería, La Universidad del Zulia, se conservó en el medio CzapeckDox Agar.

Preparación del medio de cultivo

El exudado gomoso de *A. occidentale*, crudo y pulverizado, se disolvió en agua destilada (1% p/v) con agitación constante. Se filtró por gasa y se le adicionó peptona (1% p/v). Se tomaron alícuotas del medio (pH 6,2) y se ajustaron a determinados pH (4,5 y 6,8) por la adición de soluciones de HCL (0,1M) y NaOH (0,1M). La presencia de cloruro de magnesio (0,05% p/v) se evaluó. El medio sólido se preparó por la adición de agar (1,5% p/v) y se calentó a ebullición. El medio de referencia, Czapeck Dox Agar, preparado por la técnica tradicional, está constituido por sacarosa (30g), nitrato de sodio (2g), bifosfato de potasio (1g), sulfato de magnesio (0,5g), cloruro de potasio (0,5g), sulfato ferroso (0,01g), agar (15g): Estos reactivos se disuelven en agua destilada (hasta completar 1000mL). La esterilización de los medios se realizó en autoclave (15 lb, 15 min).

Preparación del inóculo

La cepa de *A. niger* ATCC 11414 se cultivó en el medio Czapeck en tubos de ensayo (28°C, 5 días), se añadió agua destilada estéril (10 mL). El líquido se decantó en una fiola estéril (solución stock). El conteo de las esporas, en una cámara de Neubauer, permitió la preparación de la solución del inóculo (1×10^6). El avance del micelio se determinó con un inóculo, obtenido por un sacabocado, a partir del cultivo del hongo en placa de Petri.

Características morfológicas

El hongo se inoculó en placas de Petri en el medio de referencia y en el sustrato a ensayar (*Anacardium occidentale*- Agar), (AOA) a diferentes condiciones (pH 4,5; 6,2; 6,8,

presencia o ausencia de cloruro de magnesio). Las placas se guardaron en estufa (28°C, 5 días) para la observación macroscópica. La morfología microscópica se determinó mediante la técnica de cultivo en lámina (28°C, 3 días). Lactofenol se utilizó como líquido de montaje.

Avance del micelio

Se usaron las mismas condiciones experimentales descritas para la determinación de las características morfológicas. El inicio del crecimiento del hongo se tomó como criterio para determinar el avance del micelio sobre los cuatro radios y posteriormente, se midió el crecimiento a determinados tiempo (3,5, 7 días). El cálculo del área del micelio se hizo mediante la técnica tradicional (12).

Cinética de crecimiento

Cultivo por carga: Se inocularon, por duplicado, alícuotas (2,5 mL) de la solución del inóculo preparado (1×10^6) en matraces que contenían el medio con base en la goma de *A. occidentale* (1%, 25 mL). Se ensayaron diferentes condiciones experimentales (pH 4,5 ; 6,2 y 6,8, velocidad de rotación 200 y 250 rpm y presencia de iones magnesio). Los cultivos se incubaron (28°C). La determinación de la biomasa se hizo por la técnica convencional (13).

Producción de α -D-galactosidasa:

Se inocularon alícuotas (10 mL) de la suspensión del inóculo preparado (1×10^6) en matraces (500mL) que contenían el medio con base en la goma de *A. occidentale* (1%, 100mL) en las condiciones experimentales seleccionadas (pH 4,5, 30°C, 250 rpm y presencia de magnesio). Los cultivos se incubaron por tiempos definidos (15, 24, 48, 72, 96, 120h).

Extracción de la α -D-galactosidasa

Se tomó una muestra de cada medio fermentado (10mL) y se centrifugó (8.000g, 20 min). El sobrenadante se separó para determinar la actividad extracelular y el residuo (biomasa) se trató con una solución buffer de acetato de sodio (10 mL, 0,075M, pH 4,5). El proceso de sonicación de la biomasa (30 min) se hizo en varias etapas (5 min) con un período de reposo (1 min) entre cada etapa. El homogeneizado se centrifugó (8000g, 15 min). El sobrenadante se usó para determinar la actividad enzimática intracelular.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la α -D-galactosidasa se determinó según la metodología reportada previamente (14). Se usó como sustrato p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (1mM, PNP Gal) en una solución de citrato de sodio (0,05M, pH 5,3).

La muestra (0,2mL), extracto libre de células, se mezcló con el sustrato (1,8mL) e incubó (50°C, 10 min). La reacción se detuvo por la adición de bicarbonato de sodio (1M, 1 mL). La cantidad de p - nitrofenol liberado se midió a 400 nm en un espectrofotómetro uv-visible (Cary 50 Probe Varian). Se preparó una curva patrón, con base en p- nitrofenol. Una unidad de α -D-galactosidasa es equivalente a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol del reactivo (PNPGal)), bajo las condiciones experimentales usadas en la determinación.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el avance del micelio fueron analizados mediante el programa SPSS Versión, 10.0. Se evaluó la comparación de medias mediante la prueba Análisis de Varianza (Anova) con el post hoc de Tamhane. El crecimiento (biomasa) obteni-

do en los medios de cultivo ensayado, fue analizado mediante Anova del programa mencionado.

Resultados

El cultivo de *Aspergillus niger* en un medio, con base en la goma de *Anacardium occidentale*, mostró las características microscópicas típicas del hongo, Tabla 1. El avance del micelio, observado en los medios de cultivo ensayados, a una determinada concentración de la goma (1%) , diferentes condiciones de pH (4,5; 6,2; 6,8), en presencia de iones magnesio y a diversos tiempos de incubación (3, 5, 7 días) se muestra en la Tabla 2.

La comparación del crecimiento del hongo en los medios con base en la goma de *A. occidentale* y en Czapeck y la cinética correspondiente se muestran en las Tablas 3 y 4; Figuras 1 y 2. La actividad enzimática de la α -D-galactosidasa a nivel extra- e intracelular en un periodo seleccionado (15, 24, 48, 72, 96, 120h), aparece en la Tabla 5.

Discusión

El cultivo de *Aspergillus niger*, en un medio con base en la goma de *Anacardium occidentale*, a los diferentes pH ensayados (4,4; 6,2; 6,8) mostró una colonia granulosa, blanca amarillenta que se tornó negra rápidamente. La incubación, a los 3 días, evidenció las características morfológicas microscópicas necesarias para su identificación, Tabla 1. *A. niger* se caracteriza por presentar hifas hialinas, septadas, conidióforos largos, de pared lisa e incoloros que se tornan oscuros hacia la vesícula globosa, con métulas y fiáldes de las que nacen conidias abundantes, globosas, de color marrón a negro, de pared rugosa. Este hallazgo coincide con lo reportado previamente para el crecimiento de este

Tabla 1. Características microscópicas de *A. niger* ATCC 11414 en los medios empleados*.

Sustratos		Morfometría, μ			
		Vesícula (dm)	Métula (lg x a)	Fiálide (lg x a)	Conidias (dm)
Goma de <i>Anacardium occidentale</i>	pH				
	4,5	9,9-22	4,4x2,2-3,3	5,5-6,6x 2,2	3,3-5,5
	4,5**	19,8-24,2	4,4x2,2-3,3	5,5x2,2	3,3-4,4
	6,2	13,2-27,5	4,4 x 2,2	5,5-7,7x 2,2	3,3- 5,5
	6,2**	14- 27,2	4,4-5,5x2,2	7,7-8,8	2,2-4,4
	6,8	18-275	4,4-5,5 x3,3	6,6-7,7x2,2	3,3-4,4
	6,8**	13,5-27	4,4-5,5x2,2-3,3	6,6-9,9x 2,2-3,3	3,3-4,4
Czapeck Dox	7,3	14-24	5,5-6,6x3,3	5,5-8,8x2,2-3,3	3,3-5,5

* Las observaciones se hicieron a los 3 días de incubación.

** Los experimentos se realizaron en presencia de cloruro de magnesio.

Tabla 2. Comparación de las medias del avance del micelio de *A. niger* ATCC 11414 en los sustratos con base en la goma de *A. occidentale* y en Czapeck.

Sustratos		Intervalo de confianza, 95%			
		Media	Error típico	Limite inferior	Limite superior
Goma de <i>Anacardium occidentale</i>	pH		Micelio, cm		
	4,5	2,053	,095	1,865	2,242
	4,5*	2,850	,121	2,610	3,090
	6,2	2,378	,115	2,152	2,605
	6,2*	2,850	,121	2,610	3,090
	6,8	2,382	,097	2,189	2,574
	6,8*	2,152	,094	1,966	2,338
Czapeck Dox	7,3	1,598	,115	1,371	1,825

* Los experimentos se realizaron en presencia de cloruro de magnesio.

Tabla 3. Comparación de las medias del crecimiento de *A. niger* ATCC 11414 en los sustratos con base en la goma de *A. occidentale* y en Czapeck*.

		Tiempo, h						Media
Sustratos		24	48	72	96	120	144	
Goma de <i>Anacardium occidentale</i>	<i>pH</i>	Biomasa, mg/mL						
	4,5	0,558	1,028	2,996	1,984	3,716	4,72	1,60359
	4,5**	0,614	0,624	1,188	1,528	2,764	3,01	1,04307
	6,2	0,192	0,586	1,614	2,152	3,38	3,042	1,28470
	6,2**	1,486	2,782	2,852	3,686	2,634	2,934	0,71132
	6,8	0,396	1,24	1,692	2,362	2,466	3,126	0,97971
	6,8**	0,46	2,258	3,34	4,188	3,01	4,376	1,44222
Czapeck Dox	7,3	0,68	1,102	4,119	7,136	7,312	11,1	4,03487
Media		0,62657	1,37429	2,54300	3,29086	3,61457	4,61543	2,09846

* Los experimentos se realizaron a 200 rpm.

**El estudio se realizó en presencia de cloruro de magnesio.

Tabla 4. Comparación de las medias del crecimiento de *A. niger* ATCC 11414 en los sustratos con base en la goma de *A. occidentale* y en Czapeck*.

		Tiempo, h						Media
Sustratos		24	48	72	96	120	144	
Goma de <i>Anacardium occidentale</i>	<i>pH</i>	Biomasa, mg/mL						
	4,5	1,260	1,398	2,722	3,606	3,764	4,846	2,932
	4,5**	0,782	1,375	3,244	3,390	4,456	5,236	3,080
	6,2	0,472	0,640	1,150	1,212	2,134	2,110	1,286
	6,2**	0,624	1,032	1,492	0,582	0,348	0,786	0,823
	6,8	1,192	1,198	2,288	2,836	2,708	1,964	2,031
	6,8**	1,040	1,550	3,072	3,474	4,028	4,075	2,873
Czapeck Dox	7,3	0,784	1,336	3,962	6,550	4,484	8,644	4,293
Media		0,879	1,218	2,561	3,092	3,131	3,962	

* El estudio se realizó a 250 rpm.

** Los experimentos se realizaron en presencia de cloruro de magnesio.

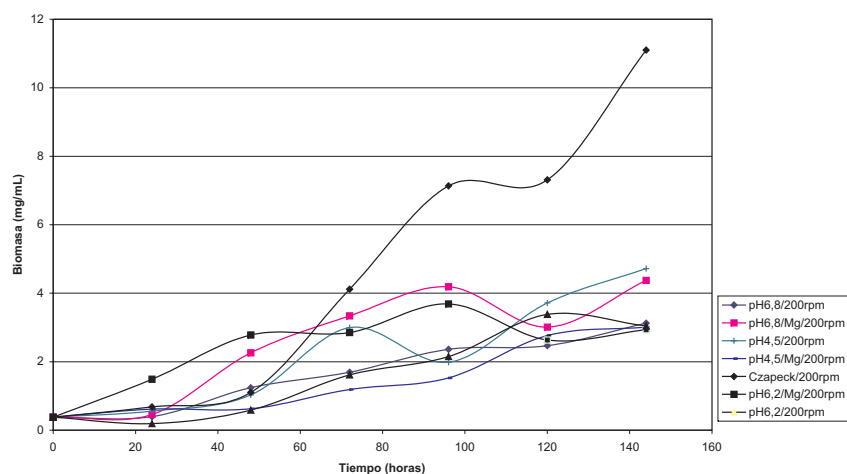


Figura 1. Cinética de crecimiento de *A. niger* ATCC 11441 en los sustratos ensayados y en Czapeck.

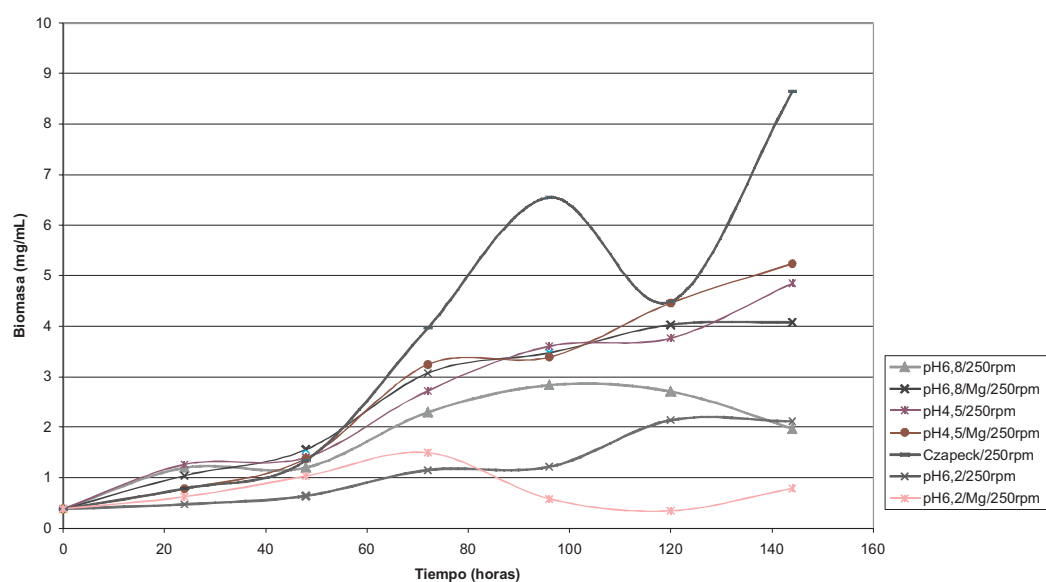


Figura 2. Cinética de crecimiento de *A. niger* ATCC 11441 en los sustratos ensayados y en Czapeck.

Tabla 5. Actividad de α -D-galactosidasa de *A. niger* ATCC 11414 en sustrato con base en la goma de *A. occidentale*.

Actividad, μ mol/mL	Tiempo, h					
	15	24	48	72	96	120
Extracelular	121,5	174,6	270,4	432,1	373,6	234,2
Intracelular	456,9	538,5	601,8	362,6	344,4	148,6

hongo en medios con base en las gomas de *Cercidium praecox*, *Cedrela odorata* y *Acacia glomerosa* como fuente de carbohidratos (6, 7).

El comportamiento morfológico microscópico, es muy similar al observado en Czapeck, medio específico para el cultivo de los hongos del género *Aspergillus*. El desarrollo observado del hongo indica la capacidad para aprovechar los nutrientes del medio de cultivo, con base en la goma de *A. occidentale*, lo cual permite la formación de las estructuras vegetativas y de reproducción. Este hecho indica la posible competencia entre ambos sustratos, para la identificación de *A. niger*. La morfometría, en general, observada, Tabla 1, sugiere que el mayor aprovechamiento de los iones magnesio en el crecimiento del hongo requiere de un medio ácido (pH 4,5; 6,2). Por otra parte la presencia de estos iones en el medio ácido contribuyó al logro de un temprano desarrollo del micelio (3 días), Tabla 2. Un mayor desarrollo del micelio de *A. niger* ATCC 11414 respecto a Czapeck se observó también en un sustrato con base en la goma de *Acacia glomerosa* (7). Las pruebas estadísticas usadas, Anova y post hoc de Tamhane, corroboraron que en todos los medios con base en la goma se produjo un mayor avance de micelio con respecto a los valores obtenidos en Czapeck. Se destaca el óptimo crecimiento (2,850 cm) en medio ácido (pH 4,5), ligeramente ácido (pH 6,2) y en presencia de iones magnesio.

La comparación del crecimiento del hongo en el sustrato ensayado en las diferentes condiciones experimentales (pH 4,5; 6,2 y 6,8, presencia o ausencia de magnesio, 200 rpm) con el medio de referencia, Tabla 3, Figura 1, evidenció que el medio de referencia funciona más eficientemente, sin embargo, la prueba de Anova determinó que las diferencias entre los medios no son significativas.

Se observó que el medio con base en la goma de *A. occidentale* (pH 4,5) y en presencia de magnesio, permitió la producción de una biomasa equivalente en ambos medios a las 24 h. Esta biomasa incrementó más lentamente en el medio ensayado a las condiciones descritas, Tabla 3. Los resultados demuestran las bondades tanto de Czapeck como del medio ensayado para la producción de biomasa. El mismo efecto se observó cuando se aumentó la velocidad de rotación (250 rpm), Tabla 4, Figura 2. El comportamiento del hongo en ambos medios fue similar hasta las 72 h, pero, posteriormente se obtuvo una mayor biomasa en el medio de referencia, no obstante la prueba de Anova, determinó que las diferencias no son significativas.

El núcleo estructural de la goma de *A. occidentale* corresponde a un β -1-3-galactán. Las ramificaciones estructurales de la macromolécula están constituidas por unidades

de galactosa, glucosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos. Los residuos terminales de la estructura tienen mayor probabilidad para interaccionar con el hongo.

El crecimiento óptimo observado a determinadas condiciones (pH ácido y presencia de iones magnesio), se usó como criterio para evaluar la actividad enzimática producida en la interacción hongo-sustrato.

La actividad enzimática de la α -D- galactosidasa, Tabla 5, a nivel extracelular, se observó, inicialmente a las 15h de la interacción hongo-sustrato y experimentó un incremento con el tiempo(hasta 72h) y luego disminuyó (hasta las 120h). Estudios previos (15) han reportado valores de actividad específica de α -D- galactosidasa, a nivel extracelular después de 168 h de crecimiento de *A. niger* en la goma de *Cyamopsis tetragonolobus*. La actividad enzimática observada en el crecimiento de este hongo en la goma de *A. occidentale* se observó, aparentemente, a un

menor tiempo (72h). Es relevante destacar que la actividad enzimática intracelular fue mayor que la extracelular hasta las 48h de interacción y posteriormente disminuyó paulatinamente (72, 96, 120h).

La interacción *A. niger* -sustrato con base en la goma de *A. occidentale* se evidenció por el crecimiento del hongo y la producción de α -D-galactosidasa. Estos hallazgos sugieren la posible participación de α -D-galactosa en el crecimiento del hongo; sin embargo, no se descarta la posibilidad de la producción de otras enzimas que faciliten el uso de otros azúcares, constituyentes de la goma como fuentes de carbono, en especial,

β -D-galactosa, α -L-arabinosa, α -L-ramnosa, residuos terminales del polisacárido de la goma de *A. occidentale* (8). La producción de α -D-galactosidasa en el medio de

cultivo ensayado está de acuerdo con los nuevos rasgos estructurales publicados para un espécimen de *A. occidentale* proveniente de Brasil. Se aisló y caracterizó el oligosacárido α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Galp (9).

Los resultados obtenidos apoyan la posible competencia del medio con base en la goma de *Anacardium occidentale* con Czapeck. La producción de α -D-galactosidasa en el medio de cultivo ensayado tiene importancia biotecnológica. La producción de β -D-galactosidasa y otras posibles enzimas requieren ser evaluadas.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES) por el soporte financiero de las investigaciones sobre los exudados gomosos. Al Dr. Rafael Villalobos, Profesor de la Facultad de Medicina, de LUZ, por el análisis estadístico de los resultados.

Referencias Bibliográficas

- (1) Monfort A, Blasco A, Prieto J, Sanz P. Construction of Baker's yeast strains that secrete different xylanolytic enzymes and their use in bread making. *J of Cereal Sci* 1997;26:195-199.
- (2) Cardoso J, Costa-Ferreira M. Aspergilli and lignocellulosics: enzymology and biotechnological applications. *Fems Microbiol* 1994; 13: 377-386.
- (3) Metidieri S, Souza A, Schrank A, Henning M. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol* 2006; 97:1217-1224.
- (4) Tellez-Jurado A, Arano-Cuenca A, González A, Viniegra-González G, Loera O. Expresión of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme Microb Technol* 2006; 38:665-669.
- (5) Viniegra G, Favela T, Aguilar C, Romero S, Díaz G, Augur C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng* 2003;13:157-167.
- (6) Mesa L, Rodríguez-Valero S, Beltrán O, Quintero J, Sánchez E, Páez-Fernández G, León-Pinto G. Comportamiento de *Aspergillus niger* en los exudados gomosos de *Cercidium praecox* y *Cedrela odorata*. *Bol Micológico* 1997;12:35-39.
- (7) Graterol E, Mesa L, Rodríguez-Valero S, Ortega J, Ávila D, León-Pinto G. Comportamiento de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en la goma de *Acacia glomerosa*. Aislamiento y caracterización de dos oligosacáridos. *Afinidad* 2005;62: 302-306.
- (8) Guerrero R, Rincón F, Clamens C, León-Pinto G. Parámetros analíticos de la goma de *Anacardium occidentale* L. y su potencial industrial. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 2003; 37:44-55.
- (9) Menestrita J, Iacomini M, Jones C, Gorin P. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum

- exudate of *Anacardium occidentale*. Phytochemistry 1998;47:715-721.
- (10) Anderson D, Bell P. Analytical and chemical characterization of *Anacardium occidentale* gum. Anal Chim Acta 1975;79:185.
- (11) Manzanares P, H-Graff L, Visser J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel α -galactosidase activity. Enzyme Microb Technol 1998; 22:383-390.
- (12) French E y F Hebert. Métodos de investigación Fitopatológica. Ed. Instituto Iberoamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica; 1980, 187 pp.
- (13) Pirt SJ. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. London (UK); 1975.
- (14) Rättö M, Poutanen K. Production of mannan-degrading enzymes. Biotechnol Lett 1998; 10:661-664.
- (15) Ademark P, Larsson M, Tjerneld F, Ståhlbrand. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. Enzyme Microb Technol 2001; 29: 441-448.