

## HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR LES MOISSURES

### II. — PRODUCTION DE CELLULASES DE *TRICHODERMA HARZIANUM* PAR FERMENTATION EN MILIEU LIQUIDE

par S. Roussos et M. Raimbault (\*)

Laboratoire de Microbiologie ORSTOM,  
Centre de Recherche IRCHA BP n° 1,  
91710 Vert-le-Petit (France)

### SUMMARY

#### CELLULOSE HYDROLYSIS BY FUNGI

#### II. — Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in liquid medium fermentation

Microcrystalline cellulose (cellulose Avicel, Merck) supported growth of *Trichoderma harzianum* and induced production of cellulases in liquid cultures. After 50 h growth, the total cellulasic activities present in both the supernatant and the mycelium were 3,000 IU/l of carboxymethyl cellulose, 400 IU/l of filter paper activity, and 4 IU/l of cotton activity corresponding to 1.7 g/l of proteins. Cellulase production could be increased by a preliminary treatment of cellulose, and pH regulation during growth. The influence of inoculum concentration was studied and an optimum of  $3 \times 10^7$  conidia/g dry weight of substrate was demonstrated. Using a synthetic culture medium, a soluble factor of germination was demonstrated which could be leached out by 3 successive washings of conidia.

KEY-WORDS: *Trichoderma harzianum*, Cellulose, Cellulase; Inoculation, Conidie.

### INTRODUCTION

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les moisissures est un processus complexe qui exige la participation de plusieurs enzymes.

Manuscrit reçu le 12 décembre 1981, accepté le 19 juin 1982.

(\*) Adresse actuelle : Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología A. P. 55.535, Mexico 13, D. F.

29 NOV 1983

O. R. S. I. O. M. Fonds Documentaire

N° : 3966ex1

Cote B

B3966 ex1

Selon Pettersson [14], au moins trois enzymes (l'endo- $\beta$ -1,4-glucanase, l'exo- $\beta$ -1,4-glucanase et la  $\beta$ -1,4-glucosidase) seraient impliqués dans ce processus. Plus récemment, une représentation schématique des différentes étapes de l'hydrolyse de la cellulose microcristalline par *Trichoderma reesei* a été proposée [11]. Dans un premier temps, l'endoglucanase attaquerait la cellulose microcristalline dans les régions amorphes, créant des failles dans les chaînes linéaires. Cette action serait suivie par l'action — en ces points de rupture — de l'exoglucanase ou cellobiohydrolase, qui libère du cellobiose. L'action continue et combinée de ces deux enzymes (endo- et exoglucanases) entraîne la conversion complète de la cellulose en cellobiose et petits oligosides. La  $\beta$ -glucosidase ou cellobiase agit enfin sur le cellobiose et les oligosides pour donner du glucose.

Parmi les nombreux champignons mésophiles qui participent à la dégradation de la cellulose et des produits lignocellulosiques, les plus étudiés sont *T. reesei* [17, 19, 21], *T. koningii* [5, 22], *Sporotrichum pulverulentum* [2] et des mutants de *T. reesei* [12]. Dans une étude précédente [18] nous avons sélectionné une souche de *T. harzianum* pour ses performances à synthétiser des quantités élevées de cellulases et également pour son aptitude à produire des quantités élevées de spores, en vue de la culture en milieu solide selon la technique de fermentation en milieu solide [15].

Le présent travail concerne l'étude physiologique et biochimique de *T. harzianum* cultivé en milieu liquide sur cellulose microcristalline « Avicel ».

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1) *Microorganisme.*

La souche de *T. harzianum* (CCM F-470) provient de la collection Tchécoslovaquie de Microorganismes (CCM) de Brno.

### 2) *Milieux de culture.*

*T. harzianum* est maintenu sur milieu « Bacto-malt-extract-agar » (Difco réf. 0112) à pH 5,6. La température d'incubation est de 29° C pour la croissance et 4° C pour la conservation.

Les spores sont obtenues à partir d'une culture de 15 jours sur milieu de Mandels et Weber [7] qui contient :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,4 g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0 g ; urée, 0,3 g ;  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 g ;  $\text{MgSO}_4$ , 0,3 g ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,0 mg ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 mg ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mg ;  $\text{CoCl}_2$ , 2,0 mg ; tween 80, 1 g ; extrait de levure, 0,25 g ; peptone végétale, 0,25 g ; cellulose Avicel (Merck) ; 7,5 g ; « Agar Difco », 15 g ; eau distillée, 1 000 ml ; pH 5,6. Les spores sont mises en suspension dans de l'eau distillée stérile contenant 1 % de tween 80.

Pour l'étude de l'influence de la quantité d'inoculum sur la production de cellulases, nous avons utilisé un milieu entièrement synthétique contenant :

ACMC = activité carboxyméthylcellulose.  
AC = activité coton.  
APF = activité papier filtre.

SPS = substrat poids sec.  
UI = unité internationale.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g ; urée, 0,3 g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,3 g ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,12 g ;  $\text{MgSO}_4$ , 0,30 g ;  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 g ; solution d'oligoéléments <sup>(1)</sup>, 1 ml ; solution de vitamines <sup>(2)</sup>, 1 ml ; cellulose Avicel, 10 g ; eau distillée, 1 000 ml ; pH 5,6.

### 3) Influence de l'inoculum de spores.

Nous avons suivi la croissance de *T. harzianum* dans des cultures inoculées avec  $3,5 \times 10^3$  à  $3,5 \times 10^{10}$  spores/g de cellulose. Les cultures ont été réalisées en milieu liquide agité à 29° C. Des prélèvements ont été effectués toutes les 24 h, ce qui permet de suivre le taux de germination des spores et la cinétique de production des cellulases et des protéines ainsi que la dégradation de la cellulose.

Des spores lavées trois fois à l'eau distillée et récoltées par centrifugation ont également été utilisées à des concentrations de  $2,3 \times 10^6$ ,  $2,3 \times 10^7$  et  $2,3 \times 10^8$  spores/g de cellulose.

### 4) Cultures en fermenteur.

Un fermenteur Biolafitte de 2 litres contenant 1 250 ml du milieu liquide de Mandels et Weber [7] additionné de 3 ml/l d'huile de colza (agent antimousse) a été stérilisé à l'autoclave à 110° C pendant 45 min. L'inoculation a été réalisée avec une suspension de spores à raison de  $3 \times 10^7$  spores/g de substrat carboné. Pendant la fermentation, la température a été maintenue à 29° C, l'aération à 10 l/h et l'agitation à 500 tours/min ; le pH n'a pas été régulé, mais la valeur de ce paramètre a été notée à chaque échantillonnage.

### 5) Méthodes de dosages.

Des prélèvements de 20 ml ont été effectués. Pour chaque échantillon, la valeur du pH a été notée, et l'évolution de la croissance de *T. harzianum* a été observée au microscope après coloration au bleu de Cotton. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 5 000 t/min pendant 15 min ; les culots ont été lavés et remis en suspension dans 20 ml d'eau distillée.

*Activité carboxyméthylcellulase (ACMC)*. — Un ml d'échantillon additionné de 1 ml d'une solution à 1 % en CMC dans du tampon citrate-phosphate 0,05 M, pH 4,8, est incubé pendant 30 min à 30° C.

*Activité papier filtre (APF)*. — Un ml d'échantillon additionné de 1 ml de tampon citrate-phosphate 0,05 M, pH 4,8 et de 50 mg de papier filtre Watman n° 1 (rectangle de 1 cm  $\times$  6 cm) est incubé pendant 60 min à 50° C.

*Activité coton (AC)*. — Un ml d'échantillon additionné de 1 ml de tampon citrate-phosphate 0,05 M, pH 4,8 et de 50 mg de coton hydrophile est incubé pendant 24 h à 50° C.

Pour chaque essai on a réalisé des témoins dans lesquels l'échantillon est remplacé par 1 ml d'eau distillée. On stoppe la réaction enzymatique en portant le tube à essai à 100° C pendant 3 min. La quantité de sucres réducteurs libérés dans chaque mélange réactionnel est estimée à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) [10]. Les activités cellulases sont exprimées en UI/ml (unité internationale : quantité d'enzymes nécessaire pour libérer 1  $\mu$ mole de glucose/min).

<sup>(1)</sup> Solution d'oligoéléments :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,0 g ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 g ;  $\text{CaCl}_2$ , 2 g ; eau distillée, 1 000 ml.

<sup>(2)</sup> Solution de vitamines : biotine, 20 mg ; acide folique, 20 mg ; pyridoxine-HCl, 50 mg ; riboflavine, 50 mg ; acide nicotinique, 50 mg ; D. L. pantothénate de Ca, 50 mg ; acide lipoïque, 50 mg ; eau distillée, 1 000 ml. Ce milieu a été réparti dans des fioles coniques (Bellco glass Inc. Vineland, New Jersey, USA, réf. 2510) de 250 ml à raison de 100 ml/fiole.

Le dosage des protéines dans les échantillons est réalisé à l'aide du réactif de Folin [6], le témoin étant de l'albumine de sérum de bœuf. Le dosage des sucres totaux est effectué à l'anthrone [1].

## RÉSULTATS

### 1) Influence de la quantité d'inoculum sur la production de cellulases

Dans les tableaux I et II on a rapporté les résultats concernant la valeur des différents paramètres mesurés respectivement après 90 et 160 h

TABLEAU I. — Influence de la concentration de l'inoculum sur l'hydrolyse de la cellulose : culture de « *T. harzianum* » en milieu synthétique à 1 % de cellulose, en Erlenmeyer agités à 29° C pendant 90 h.

Nb de spores 2,3 ×										Spores lavées		
	10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
pH	3,10	3,20	3,20	3,75	5,05	5,25	5,60	5,60	5,80	6,05	5,80	
Sucres réducteurs mg/l	74	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
APF UI/l	80	85	67	57	37	28	0	0	0	0	0	
ACMC UI/l	1 029	1 104	1 067	937	770	622	0	0	0	0	0	
Sucres totaux g/l	8,5	7,8	6,7	9,5	10	9,8	10	10	10	10	10	
Protéines mg/l	1 550	750	580	500	350	200	100	100	375	100	100	

TABLEAU II. — Influence de la concentration de l'inoculum sur l'hydrolyse de la cellulose : culture de « *T. harzianum* » en milieu synthétique à 1 % de cellulose, en Erlenmeyer agités à 29° C pendant 160 h.

Nb de spores 2,3 ×										Spores lavées		
	10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
pH	3,05	3,35	3,50	3,85	3,80	4,00	4,55	4,50	6,15	6,70	6,40	
Sucres réducteurs mg/l	52	20	20	20	20	20	20	20	10	10	10	
APF UI/l	93	83	70	57	41	37	65	93	0	0	0	
ACMC UI/l	755	851	814	759	630	630	852	722	100	80	80	
Sucres totaux g/l	5,7	4,0	4,20	4,0	5,0	6,0	7,4	7,7	10	10	10	
Protéines mg/l	2 000	1 000	625	580	700	850	850	880	580	400	100	

de culture à 29° C. Pour les plus fortes concentrations de spores ( $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$  et  $10^7$ ) par gramme du substrat poids sec (SPS), l'hydrolyse de la cellulose est pratiquement terminée après 90 h : le pH atteint les valeurs minimales ( $\approx 3,10$ ) ; les APF et ACMC ont atteint les valeurs maximales. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs d'activités enzymatiques obtenues pour les teneurs très élevées en spores ( $10^{10}$ ) et les valeurs plus faibles ( $10^7$  spores). Cependant, on note un écart de valeur au niveau des protéines. Cet écart peut être dû à l'apport de protéines par l'inoculum et à la pigmentation des spores qui peut fausser le dosage.

Par contre, l'examen microscopique révèle qu'entre ces quatre échantillons le taux de germination des spores est très différent. Pour la concentration de  $2,3 \times 10^{10}$  spores, uniquement 1 % de spores ont germé pour donner un tube germinatif puis un mycélium abondant ; environ 20 % des spores ont doublé de volume, mais n'ont pas donné de mycélium. Le reste des spores — environ 80 % — ne présentent aucune évolution. Pour les concentrations de  $2,3 \times 10^9$  et  $2,3 \times 10^8$  spores, nous avons observé un taux de germination de 20 à 40 % respectivement. Ce taux de germination reste stable au cours du temps et varie uniquement en fonction de la teneur en spores de l'inoculum. À partir des concentrations de  $2,3 \times 10^7$  spores, le taux de germination est de 100 % après 20 h de culture à 29° C.

Nous avons complété cette expérience en utilisant des spores lavées trois fois dans de l'eau distillée stérile et remises en suspensions dans de l'eau. Les résultats (tableaux I et II) démontrent que les spores ainsi lavées ont perdu leur faculté de germer. L'examen microscopique révèle qu'il n'y a pas eu de germination des spores pour les trois essais réalisés avec des concentrations de  $2,3 \times 10^8$ ,  $2,3 \times 10^7$  et  $2,3 \times 10^6$  spores lavées/g de cellulose. Il existerait donc dans les spores un facteur de germination soluble dans l'eau et qui disparaît dans les eaux de lavage. Après 160 h de culture de *T. harzianum* sur cellulose, pour toutes les concentrations d'inoculum de spores non lavées on observé une croissance et des activités enzymatiques du même ordre de grandeur. La cellulose a été hydrolysée à 60 % pour les inoculums de spores supérieurs à  $10^7$ . Pour les valeurs inférieures à  $10^7$ , le pourcentage d'hydrolyse de la cellulose diminue en fonction de la dose des spores.

## 2) Étude cinétique de la croissance en fermenteur

### a) Aspect morphologique.

L'observation microscopique révèle tout d'abord un gonflement de la spore qui aboutit, après 7 h d'incubation, à l'apparition d'un tube germinatif. Celui-ci donne naissance à un mycélium cloisonné fin et long. Les premiers branchements apparaissent après 17 h de culture ; leur multiplication rapide conduit à un foisonnement du mycélium qui envahit le milieu. Un épaissement des extrémités apicales du mycélium apparaît après 90 h de culture. Une heure après, on note l'apparition des spores dans le milieu ainsi que le début de la lyse du mycélium.

b) *pH*.

La figure 1 représente l'évolution du pH, des activités cellulases et des protéines lors de la culture de *T. harzianum* en fermenteur de 2 l agité.

Il est possible de distinguer trois phases dans l'évolution du pH. La première phase correspond à la germination des spores et au début de la croissance du mycélium ; on note alors une légère augmentation du pH de 5,8 à 6,1. Lors de la deuxième phase, qui dure environ 20 h, on remarque une diminution rapide du pH, liée à la croissance active du mycélium. Après l'arrêt de la croissance active du mycélium, dû à l'épuisement du substrat [19], la troisième phase est caractérisée par une alcalinisation du milieu. Cette dernière phase correspond à l'autolyse du mycélium, au cours de laquelle les protéines sont solubilisées.

c) *Cellulases*.

Les cinétiques de production des trois types d'activité cellulaire (APF, APMC et AC) présents dans le culot et dans le surnageant sont rapportées sur la figure 1, respectivement en A, B et C. On constate que ces différentes activités cellulases sont synthétisées essentiellement pendant la phase de multiplication active du mycélium. Les valeurs maximales des activités cellulases totales correspondent au maximum de croissance après 50 h de culture, soit 3 000 UI/l d'APF, 400 UI/l d'APC et 4 UI/l d'AC.

d) *Protéines*.

Les protéines totales (fig. 1D) représentent la somme des protéines contenues dans le culot de centrifugation et des protéines solubles. Cela nous a permis de mieux apprécier le taux d'autolyse du mycélium. La biosynthèse des protéines suit les mêmes étapes que précédemment, c'est-à-dire une phase de latence et de germination (20 h), puis une phase de croissance active (20-40 h) durant laquelle la majorité des protéines est contenue dans le mycélium ; vient ensuite la phase d'autolyse de la paroi du mycélium (40-120 h) avec libération du cytoplasme dans le milieu et solubilisation des protéines ; en fin de culture (120-160 h) on note une dénaturation des protéines avec une alcalinisation qui correspond à l'action des enzymes protéolytiques.

## DISCUSSION

Pour la suite de nos expériences, nous avons donc adopté une inoculation de  $3 \times 10^7$  spores/g de substrat, voisine de celle utilisée pour la production de protéines de *A. hennebergii* à partir de la farine de manioc [15]. En effet, cette concentration de spores non lavées permet d'obtenir une croissance optimale, un développement homogène pour toutes les spores et une production de cellulases et de protéines optimale.

Les conditions acides qui apparaissent dans le milieu ne sont pas dues

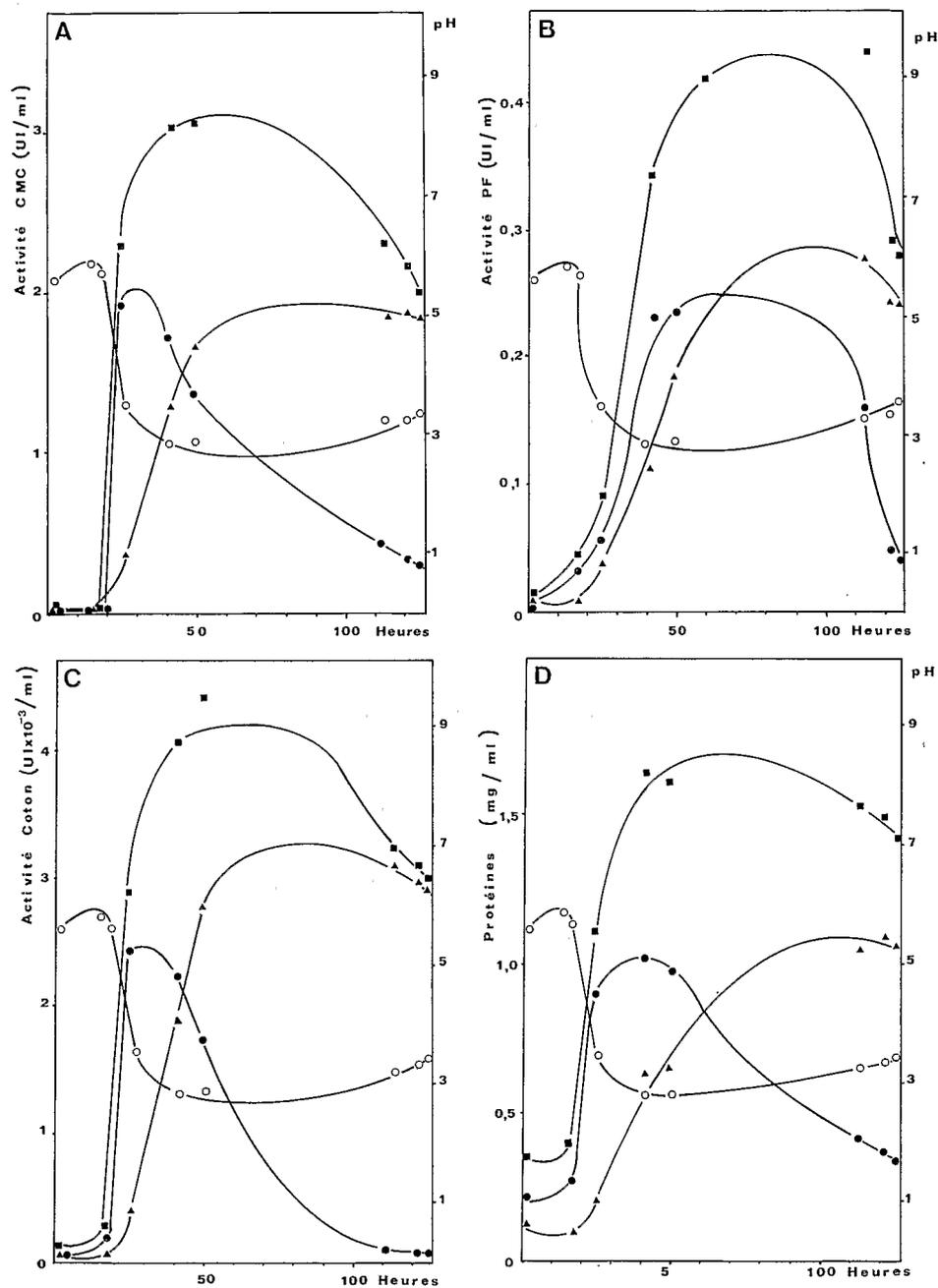


FIG. 1. — Culture de *T. harzianum* sur cellulose Avicel en fermenteur liquide.

A = ACMC ; B = AP ; C = AC ; D = évolution des protéines. Inoculation avec  $3 \times 10^7$  spores/g de substrat poids sec. Culot (●) ; surnageant (▲) ; total (culot + surnageant) (■) ; évolution du pH(○).

à la sécrétion d'acides organiques par le microorganisme mais seraient liées à l'assimilation des ions  $\text{NH}_4^+$  sous forme  $\text{NH}_3$  provoquant la libération d'ions  $\text{H}^+$  [19]. Le seul pouvoir tampon du milieu n'est pas suffisant pour compenser cette forte acidification. Plusieurs modifications du milieu standard de Mandels et Weber [7] ont été proposées : l'urée et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont respectivement remplacées par  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{SO}_4$  et  $\text{K}_2\text{SO}_4$  [20]. La meilleure solution consiste à réguler le pH à 5 par l'apport d'une solution de NaOH, de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ou de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [13, 21]. D'ailleurs une étude récente démontre que la meilleure source d'azote pour *T. reesei* est le sulfate d'ammonium et non pas l'urée [21].

L'étude cinétique de la répartition des trois types d'activités cellulases dans le culot et dans le surnageant de culture nous a permis de mieux les localiser. Il apparaît que la synthèse des cellulases par *T. harzianum* est associée à la multiplication active du mycélium auquel elles sont d'ailleurs liées. Les enzymes sont ensuite excrétés dans le milieu durant la phase d'autolyse du mycélium.

Lorsque le maximum d'activité est atteint (50 h), la moitié environ de l'activité est liée au mycélium et l'autre moitié est solubilisée. Si l'on maintient la culture pendant quelques heures, on augmente sensiblement la quantité d'enzymes solubilisés sans diminuer la quantité totale d'enzymes. C'est un point important à souligner car cela facilite l'extraction et la récupération des activités enzymatiques.

La quantité maximale de protéines (1,7 g/l) obtenue après 40 h de culture correspond à un rendement global de 22,6 % de transformation de la cellulose Avicel. Ce rendement est relativement élevé, mais en accord avec les résultats également obtenus avec une souche de *Trichoderma* [13, 3].

## CONCLUSION

Cette étude nous a permis de mieux connaître les aptitudes de la souche de *T. harzianum* à croître et à synthétiser des cellulases sur un milieu contenant de la cellulose microcristalline Avicel comme substrat carboné.

Tout d'abord nous avons montré qu'il existe une influence sensible de la concentration initiale des spores sur la vitesse d'hydrolyse de la cellulose. Une concentration de  $3 \times 10^7$  spores par g de substrat correspond à une dose optimale pour initier une bonne croissance. L'utilisation d'un milieu entièrement synthétique nous a permis de montrer que les spores contiennent un facteur de germination soluble dans l'eau et qui disparaît avec les eaux de lavage. La cellulose Avicel est un bon inducteur de cellulases puisque la souche produit 3 000 UI/l APMC, 400 UI/l d'APF et 4 UI/l d'AC, ce qui est relativement élevé par rapport aux autres résultats de la littérature [3, 13]. Le rendement de croissance sur ce substrat est également très bon puisque la souche de *T. harzianum* est capable de transformer la cellulose en protéines avec un rendement global de 22,6 %.

L'étude détaillée de la localisation des activités enzymatiques montre

qu'on a intérêt à prolonger l'incubation pendant plusieurs heures après le maximum de croissance, car une fraction plus importante d'enzymes se trouve solubilisée dans le surnageant sans perte d'activité totale sensible.

L'optimisation des conditions de production de cellulases n'a pas été réalisée dans le cadre de ce travail. En effet, les conditions de culture devenaient rapidement défavorables pour la croissance du mycélium. En particulier la régulation du pH et le prétraitement du substrat devraient permettre d'améliorer ces résultats. Par ailleurs, certains métabolites accumulés, comme le glucose, inhibent la biosynthèse des cellulases [19] et mériteraient une étude plus détaillée.

### RÉSUMÉ

Pour une souche de *Trichoderma harzianum* cultivée sur cellulose microcristalline en fermentation liquide, les cellulases sont synthétisées pendant les premières heures et restent à l'intérieur des cellules mycéliennes. Ces enzymes sont ensuite excrétés dans le milieu de culture où leur concentration augmente en fonction du temps. L'inoculation du fermenteur se fait avec  $3 \times 10^7$  spores/g de substrat poids sec.

MOTS-CLÉS : *Trichoderma harzianum*, Cellulose, Cellulase ; Inoculation, Spore.

### REMERCIEMENTS

Nous remercions C. Paycheng pour l'aide qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASHWELL, G., Colorimetric analysis of sugar, in « Method in enzymology », Academic Press, New York, London, 1957.
- [2] ERIKSSON, K.-E., Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1978, 20, 317-332.
- [3] GALLO, B. J., ANDREOTTI, R., ROCHE, C., RYU, D. & MANDELS, M., Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG 77. *Biotechnol. Bioeng.*, 1978, Symp. n° 8, 89-101.
- [4] GEETHADEVI, B. R., SITARAM, N., MOHAMMAD, K. A. A. & RAMACHANDRA, R. T. N., Screening of fungi for single cell protein and cellulase production. *Ind. J. Microbiol.*, 1978, 18, 85-89.
- [5] HALLIWELL, G., GHAI, S. K. & WAHAB, M. N. A.,  $\beta$ -Glucanase components of the cellulolytic microbe *Trichoderma koningii*, in « Colloque Cellulolyse Microbienne », (pp. 139-153). Marseille, France, 23-24 mai 1980.
- [6] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. T., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.

- [7] MANDELS, M. & WEBER, J., The production of cellulases. *Advanc. Chem. Ser.*, 1969, 95, 391-414.
- [8] MANDELS, M., HONTZ, L. & NYSTROM, J., Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 1974, 16, 1471-1493.
- [9] MANDELS, M., ANDREOTTI, R. & ROCHE, C., Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, Symp. n° 6, 21-33.
- [10] MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination for reducing sugar. *Analyt. Chem.*, 1959, 31, 426-428.
- [11] MONTENECOURT, B. S. & EVELEIGH, D. E., Production and characterization of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*, (pp. 101-108), in « TAPPI annual Meeting Proc », New York, 1979.
- [12] MONTENECOURT, B. S., KELLEHER, T. J. & EVELEIGH, D. E., Biochemical nature of cellulases from mutants of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1980, Symp. n° 10, 15-26.
- [13] MUKHOPADHYAY, S. N. & MALIK, R. K., Increased production of cellulase of *Trichoderma* sp. by pH cycling and temperature profiling. *Biotechnol. Bioeng.*, 1980, 22, 2237-2250.
- [14] PETERSSON, L. G., The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by *Trichoderma viride*. Proceedings SITRA Symposium on Enzymatic hydrolysis of cellulose, (pp. 255-261). Aulanko, Finland, 1975.
- [15] RAIMBAULT, M. & ALAZARD, D., Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1980, 9, 199-209.
- [16] RAIMBAULT, M. & ROUSSOS, S., Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Demande de brevet d'invention déposée en 1981.
- [17] REESE, E. T., History of the cellulase program at the US Army Natick Development Center. *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, Symp. n° 6, 9-20.
- [18] ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. — I. « Screening » des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1982, 133 B, 455-464.
- [19] STERNBERG, D., Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, Symp. n° 6, 35-53.
- [20] STERNBERG, D. & DORVAL, S., Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 1979, 21, 181-191.
- [21] TANGNU, S. K., BLANCH, H. W. & WILKE, C. R., Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and  $\beta$ -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). *Biotechnol. Bioeng.*, 1981, 23, 1837-1849.
- [22] WOOD, T. M., Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii* separation of components attacking native cotton. *Biochem. J.*, 1968, 109, 217-227.