

## Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates

**Alejandro Colina, Alexis Ferrer y Lauris Urribarri**

Laboratorio de Instrumentación Analítica, Facultad Experimental de Ciencias,  
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Telf: 58-261-7598154. alexis.ferrer@gmail.com

### Abstract

Cellulase production by the fungus *Trichoderma reesei* Rut C-30 (ATCC 56765) at initial pH 4.8, with different cellulosic substrates (rice straw, cellulose as the only carbon source, and a mixture of commercial cellulose and hemicellulose), was investigated. Previously, growth and sporulation of the fungus on potato agar plates with different glucose concentrations, and different variations of the Mandels and Weber's mineral solution (1969) for the germination and development of conidiospores of *T. reesei*, were studied. Fermentations were carried out in duplicate, in 250 mL Erlenmeyer flasks with 60 mL of mineral solution, 1% w/v substrate, 29°C and agitation at 200 rpm for 120 h, and in a 5L Bioflo III fermentor with rice straw as the substrate, under controlled temperature (29°C), agitation (150 rpm) and aeration (20% saturation) conditions. The chemical nature of the rice straw (6.75% protein) and the commercial substrates (0% protein, control substrate) used in the fermentations played a major role in the final pH. However, the difference between the pH values reached at the end of the fermentations (between 3.28 and 6.38), did not greatly affect the growth and cellulase production by the fungus in spite of the fact that the growth was much greater with the commercial substrates. The cellulase production was higher in the fermentations with the commercial mixture (0.62 IU/mL), followed by those with amorphous cellulose as the only carbon source (0.57 IU/mL) and rice straw (0.51 IU/mL). Cellulase production in the fermentor (0.38 IU/mL) was lower than that found in the flasks study.

**Key words:** Cellulase, *Trichoderma reesei* Rut C-30, rice straw.

## Producción de celulasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 en diferentes substratos celulósicos

### Resumen

Se evaluó la producción de celulasas del *Trichoderma reesei* Rut C-30 (ATCC 56765) por fermentación sumergida con diferentes substratos celulósicos (paja de arroz, celulosa como única fuente de carbono y una mezcla de celulosa y hemicelulosa comerciales). Previamente se estudió el crecimiento y la esporulación del hongo en placas de agar papa con diferentes concentraciones de glucosa y diferentes variaciones de la solución mineral de Mandels y Weber (1969) para lograr la germinación y desarrollo de las conidiosporas de *T. reesei*. Las fermentaciones se realizaron por duplicado en erlenmeyers de 250 mL con 60 mL de solución mineral al 1% p/v de concentración de sustrato, 29°C y agitación de 200 rpm por 120 h, y en un fermentador de 5L Modelo Bioflo III con paja de arroz como sustrato, bajo condiciones controladas de temperatura (29°C), agitación (150 rpm) y oxigenación (20% de saturación). La naturaleza química de la paja de arroz (6,75% de proteínas) y de los sustratos comerciales (0% de proteínas; control) empleados en las fermentaciones, jugaron un papel importante en el pH final desarrollado durante las fermentaciones. Sin embargo, la diferencia de los valores finales de pH (3,31 promedio para los sustratos comerciales y 6,38 para la paja de arroz), no condicionó grandemente el crecimiento y la producción de celulasas, a pesar que el crecimiento fue mucho mejor en los sustratos comerciales. La producción de celulasas fue ma-

yor en las fermentaciones con la mezcla comercial (0,62 UI/mL), seguido por la celulosa amorfa como única fuente de carbono (0,57 UI/mL) y por la paja de arroz (0,51 UI/mL). La producción de celulasas en el fermentador (0,38 UI/mL) fue menor a la encontrada en el estudio en erlenmeyers.

**Palabras clave:** Celulasas, *Trichoderma reesei* Rut C-30, paja de arroz.

## Introducción

La producción rentable de azúcares fermentables como la glucosa a partir de desechos agroindustriales, depende de diferentes factores, tales como la disponibilidad de sustratos a bajo costo, producción de enzimas de elevada actividad enzimática y larga vida útil, así como la disposición de pretratamientos efectivos para aumentar la susceptibilidad de diferentes sustratos lignocelulósicos a la hidrólisis enzimática, de tal manera que se obtengan altos rendimientos con bajas dosis de enzimas.

La paja de arroz es el tercer desecho agrícola más abundante de Venezuela y seguirá aumentando su disponibilidad ya que la producción de arroz se ha convertido recientemente en una de las prioridades nacionales. Se ha utilizado paja de arroz como sustrato para producir xilanasas de *Trichoderma reesei* Rut C-30 (ATCC 56765), obteniéndose actividades de 122 UI/mL [1], como para producir azúcares, obteniéndose conversiones entre 45% y 67% [2,3]. La producción de azúcares depende de la acción conjunta de celulasas y xilanasas. Aunque *T. reesei* QM9414 ha demostrado ser un excelente productor de celulasas [4], su producción de xilanasas es muy baja (10 UI/mL-30 UI/mL). Por lo tanto, como la selección lógica para la producción de xilanasas es *T. reesei* Rut C-30, en este trabajo se explora la posibilidad de utilizarlo con el mismo sustrato (paja de arroz) como productor de celulasas, y se discuten las condiciones que estimulan dicha producción y la magnitud de ésta.

## Materiales y Métodos

### Substratos celulósicos

La paja de arroz se obtuvo poscosecha de los granos en el Distrito Mara, Estado Zulia, Venezuela. Se secó a una temperatura de 60°C por 48h y se redujo a un tamaño de partícula de 1mm, se guardó en bolsas plásticas herméticas y se congeló hasta su posterior uso. Como substratos

comerciales se emplearon Solka Floc (Solka Floc 40 FCC, International Fiber Corporation, North Tonawanda, NY) como única fuente de carbono y una mezcla de 72,4% Solka Floc y 27,6% de xilanos de residuos de avena (SIGMA; St. Louis, USA), ambos en proporción equivalente al contenido de celulosa y hemicelulosa de la paja de arroz [1]. La composición química de la paja de arroz utilizada es 6,75% proteína, 37,69% celulosa, 14,37% hemicelulosa y 5,89% lignina [5].

### Microorganismo

En este estudio se empleó la cepa del hongo celulolítico *Trichoderma reesei* Rut C-30 ATCC 56765. Se cultivó en frascos de dilución con agar papa al 1% de glucosa e incubado a una temperatura de 25°C por un período de tiempo de 5 días a 7 días. La suspensión de esporas se obtuvo a partir de los mismos adicionando de 10 mL a 15 mL de solución mineral de Mandels y Weber [6] y se almacenó en fiolas de 250 mL a 4°C. La concentración de esporas se estandarizó con la ayuda de la cámara de Neubauer [7].

### Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron en múltiples fiolas (18 por sustrato) de 250 mL con 60 mL de solución mineral de Mandels y Weber [6] al 1% (p/v) de sólidos, pH inicial 4,8, 29°C y agitación de 200 rpm por 120 h. Las mismas se llevaron a cabo en un incubador orbital Innova 4300 (New Brunswick Scientific; Edison, NJ). El pH inicial del medio se ajustó antes y después de la esterilización con HCl 0,1N y NaOH 0,1N y el título del inóculo para todas la fermentaciones fue de  $1 \times 10^6$  conidiosporas/mL.

Los experimentos realizados en el fermentador de 5L modelo Bioflo III (New Brunswick Scientific; Edison, NJ) se llevaron a cabo únicamente con paja de arroz, por ser el sustrato objeto del estudio, bajo las siguientes condiciones: 4L de solución mineral de Mandels y Weber [6], pH inicial 4,8, 29°C, aereación de 0,5 vvm y agitación de 150 rpm por 120h. La concentración de

oxígeno disuelto del medio fue controlado automáticamente por agitación al 20% de saturación. Como agente antiespumante se emplearon 10 ppm de Antifoam A (SIGMA; St. Louis, USA).

Los monitoreos se realizaron cada 24h, tomándose un par de fiolas al azar para los estudios en fiolas y alícuotas de 120mL-130mL en el fermentador. Los sólidos se separaron del líquido por centrifugación a 12.000g por 30 min a 4°C. Al sobrenadante se le realizaron los respectivos análisis de pH, actividad celulolítica [8] y proteína soluble [9], por triplicado.

Se utilizó el programa STATISTIX [10] para realizar un análisis de varianza a los resultados experimentales y se utilizó la comparación múltiple de Duncan para detectar diferencias significativas entre los valores de la actividad de la celulasa y pH para cada substrato durante los diferentes tiempos de muestreo en las fermentaciones.

## Resultados y Discusión

### Establecimiento de las condiciones de crecimiento, esporulación y germinación de *T. reesei* Rut C-30

En este estudio el hongo *T. reesei* Rut C-30, fue cultivado en las condiciones establecidas para la cepa celulolítica QM 9414 de la misma especie, las cuales fueron desarrolladas previamente en nuestro laboratorio para la producción de celulasas [7]. Sin embargo, éstas no fueron adecuadas para este microorganismo, por lo que fue necesario realizar una serie de ensayos en agar papa con diferentes concentraciones de glucosa para obtener las mejores condiciones de cre-

cimiento y esporulación del mismo. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con respecto al crecimiento. Como se puede observar, de los cuatro medios evaluados (0,25%; 0,50%; 1,0% y 1,5% de glucosa), el 3 y el 4 fueron aquellos en los cuales se observó mayor crecimiento debido a la mayor concentración de glucosa (1% y 1,5%, respectivamente), pero fue en el medio número 3 donde se observó una mayor y más temprana esporulación, alcanzando a cubrir toda la superficie de la placa de agar entre los 5 días y 7 días. Este resultado puede estar asociado a un agotamiento más rápido de la fuente de carbono (glucosa) en el medio 3.

Para las fermentaciones, las conidiosporas que se emplearían como inóculo en las mismas fueron cultivadas inicialmente en las mismas condiciones preestablecidas para *T. reesei* QM 9414 por Zabala y col. [7], y al igual que en el caso anterior, la germinación y desarrollo de las conidiosporas de *T. reesei* Rut C-30 no fueron adecuadas. En la Tabla 2 se lista un resumen de los diferentes ensayos que se realizaron, las condiciones y el tiempo de duración de los mismos, así como la composición de cada uno de los medios utilizados.

La Tabla 2 muestra que la composición del medio junto con la agitación jugaron un papel importante en la germinación y desarrollo de las esporas de *T. reesei* Rut C-30, puesto que una baja intensidad de agitación (100 rpm) y una concentración de glucosa de 0,25%, impidieron la germinación y desarrollo de las conidiosporas. A 150 rpm, las conidiosporas experimentaron un incremento en su tamaño (30 a 40% del tamaño original) y se detectó la presencia de los puntos de germinación en la totalidad de las mismas, sin

Tabla 1  
Crecimiento y esporulación de *T. reesei* Rut C-30 (ATCC 56765) en Agar papa dextrosa con diferentes concentraciones de glucosa

Medio de cultivo	Concentración de Glucosa (%)	Crecimiento/Esporulación (5-7 días)
1	0,25	+/+
2	0,50	++/+
3	1,00	+++/>+++
4	1,50	+++/>+

Magnitud de crecimiento y esporulación de *T. reesei* Rut C-30. +: bajo; ++: medio; +++: alto.

embargo, no se dio el desarrollo del micelio. Un incremento de la intensidad de agitación hasta 200 rpm aumentó mucho más el tamaño de las conidiosporas (dos veces del original y adoptando una forma esférica), pero tampoco fue suficiente para generar el desarrollo del micelio en las 48h de fermentación. De los medios empleados, el M3 fue seleccionado para un estudio adicional en el cual se modificó la concentración de glucosa del medio elevándola hasta 0,5 % (M3m). Los resultados fueron sorprendentes, ya que las conidiosporas germinaron entre las primeras 7h y 10h del proceso y mantuvieron un desarrollo continuo del micelio (observación al microscopio) hasta después de las 96h. Se seleccionó el medio de cultivo M3 en vez del M2 para la modificación, puesto que contenía celulosa amorfa como fuente adicional de carbono y porque además podría servir como sustrato inductor para el sistema celulásico [11]. Esta inducción es indirecta ya

que la celulosa presente, especialmente la amorfa, forma celobiosa y otros celooligosacáridos (los inductores reales) en baja concentración por la acción de celulasas constitutivas, principalmente celobiohidrolasas [12]. Se ha demostrado que la celobiosa producida es asimilada por el hongo, iniciándose el proceso con la enzima  $\beta$ -diglucosido permeasa [13].

**Producción de enzimas**

El perfil de producción de enzimas celulolíticas con diferentes sustratos celulósicos y lignocelulósicos se muestra en la Figura 1. En ésta se puede apreciar cómo la producción de enzimas se hace evidente a partir de las 48h de fermentación en todos los sustratos utilizados, coincidiendo con lo reportado por otros investigadores con *T. reesei* QM 9414 [14,15], *T. viride* [16] y con *T. reesei* Rut C-30 [17]. Igualmente se puede ob-

Tabla 2  
Germinación y desarrollo de las conidiosporas de *T. reesei* Rut C-30 en diferentes medios de cultivo e intensidades de agitación

Medio	Agitación (rpm)	Germinación/Desarrollo
C, M1, M2, M3	100	-/-
C, M1, M2, M3	150	+/-
	200	+/-
M3m	200	+/+

Todos los medios fueron preparados en solución mineral de Mandels y Weber (1969) y se incubaron a 29°C por 48 h, realizándose monitoreos cada 12h. C: medio mineral control. M1: SF (1%), P (0,1%). M2: Gluc. (0,25%), P(0,1%). M3: SF (1%), P (0,1%), Gluc (0,25%). M3m: SF (1%), P (0,1%), Gluc (0,5%). **SF**: Solka Floc; **P**: peptona; **Gluc**: glucosa.

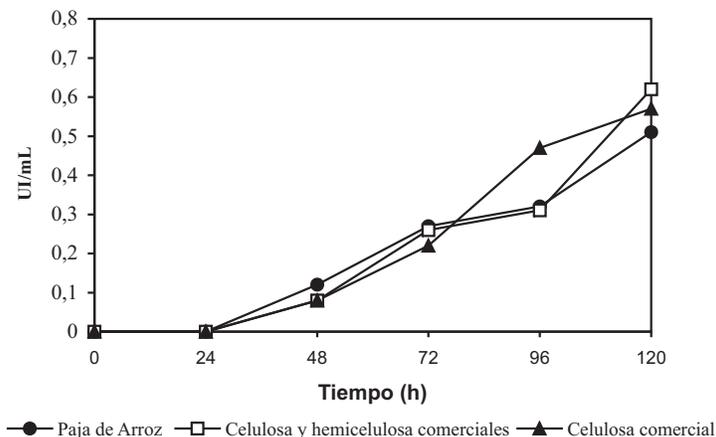


Figura 1. Producción de celulasas con diferentes sustratos celulósicos por *T. reesei* Rut C-30. Estudio en floras.

servar que el mejor sustrato para la producción de enzimas al final de la fermentación corresponde a la mezcla de celulosa y hemicelulosa comercial con 0,62 UI/mL, seguido por las fermentaciones con celulosa como única fuente de carbono (0,57 UI/mL) y paja de arroz (0,51 UI/mL). Los valores obtenidos a las 120h, para todas las fermentaciones mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los diferentes sustratos.

En la Figura 1, también se observa que la producción de celulasas en los cultivos con paja de arroz fue comparable a los cultivos comerciales durante las primeras 72 h de la fermentación, sin embargo, a partir de este momento la velocidad de producción de enzimas disminuye (96h) para los cultivos con paja de arroz y con la mezcla de celulosa y hemicelulosa comercial. La observación al microscopio reveló un abundante crecimiento para los cultivos comerciales con pocas rupturas en el micelio del hongo, la cual solo comenzó a observarse al final del proceso fermentativo (120 h), mientras que el deterioro del micelio en los cultivos con paja de arroz se inició a las 96 h, lo cual pudiera explicar la diferencia en los títulos de enzimas.

Se ha reportado que la producción de celulasas por *T. reesei* es favorable a pH igual o menor de 4,80 [18] pero no siempre es así [15]. En este trabajo la diferencia en los valores de pH observados (Figura 2) aparentemente no afectó de manera significativa la producción de celulasas, ya que éstas se siguieron produciendo dentro de un rango bastante amplio de pH (3,28-6,38).

En este estudio la naturaleza química y la pureza de los sustratos empleados para la producción de celulasas tuvo un efecto determinante sobre los valores de pH obtenidos en las fermentaciones, puesto que en los cultivos comerciales bajó el pH mientras que para los cultivos con paja de arroz se desarrolló de manera opuesta. La paja de arroz a diferencia de los sustratos comerciales, contiene un 6,75% de proteínas las cuales pudieron ser solubilizadas parcialmente al medio durante la fermentación, por un efecto conjunto entre la agitación y la acción de las celulasas y xilanasas sobre la matriz de la fibra lignocelulósica que al disminuir su complejidad facilita su disolución en el medio. La hidrólisis de estas proteínas por proteasas en este tipo de cultivos resulta en un incremento del pH [19], lo cual se ha asociado a la exposición de los grupos amino de los aminoácidos al medio, los cuales se protonan rápidamente. La degradación de la úrea también aporta iones amonio al medio, pero su efecto es mínimo ya que ésta es generalmente consumida durante las primeras 8h de la fermentación con un ligero incremento del pH [7], el cual no fue detectado en este trabajo por los intervalos de tiempo usados en los muestreos (cada 24h). Por otro lado, la disminución del pH en las fermentaciones con sustratos comerciales no está dada por la producción de ácidos orgánicos como resultado del metabolismo de los azúcares durante la fermentación, sino, que es causada por el consumo de  $\text{NH}_4^+$  del medio (a partir de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) que al ser incorporado a la célula libe-

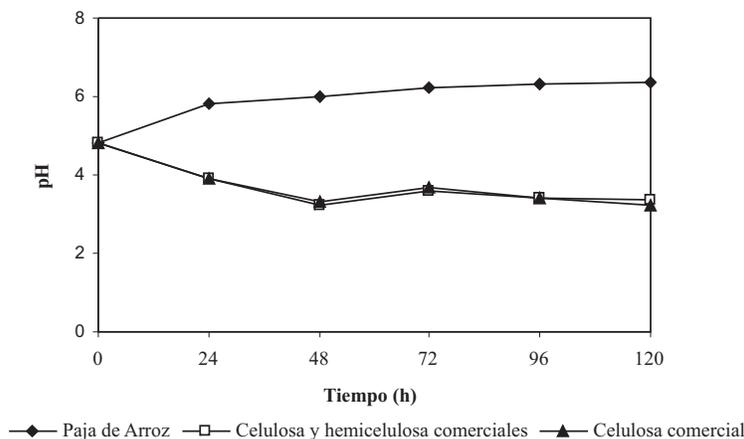


Figura 2. Comportamiento del pH durante las fermentaciones con *T. reesei* Rut C-30 en diferentes sustratos celulósicos. Estudio en fiolas.

ra un protón (H<sup>+</sup>) al medio produciendo la disminución del pH.

Estudios realizados sobre la producción de xilanasas por *T. reesei* Rut C-30 ATCC 56765 [1] en paja de arroz, evidenciaron una mejor producción de estas enzimas cuando el pH se desarrolló entre los valores de 6,0 y 7,0, mientras que cuando se desarrolló por debajo de 4,8, ésta se vio disminuida en un 78%. Según los resultados obtenidos en este estudio y los de Colina y col. [1], el futuro empleo de la paja de arroz como sustrato para la producción simultánea de xilanasas y celulasas, favorecería más a la primera debido a las condiciones de pH que se desarrollan durante el proceso (6,0-7,0), sin embargo, los niveles de celulasas obtenidos en este estudio, que representan cerca de un 40% de los valores máximos reportados en la literatura, pudieran fácilmente suplir parcialmente los requerimientos de estas enzimas dentro de un proceso de sacarificación enzimática de sustratos lignocelulósicos, impactando considerablemente en los costos del proceso.

Los resultados obtenidos en este estudio con paja de arroz son superiores a los obtenidos por otros investigadores [20] con las cepas de *Trichoderma reesei* QM6a y *T. hamatum* TBU F-105 (ambos 0,3 UI/mL) cuando fueron cultivados en madera de álamo; también fueron superiores a los reportados por Gomes y col. [16] con *T. viride* en paja de trigo y a los obtenidos por Olsson y col. [21] con *T. reesei* Rut C-30 cuando utilizaron la pulpa de remolacha azucarera con dos pretratamientos distintos (0,09 UI/mL y 0,07 UI/mL) y

son comparables con la actividad obtenida cuando se mezcló la pulpa de remolacha azucarera con celulosa comercial (actividad máxima 0,45 UI/mL) [21]. Sin embargo, fueron inferiores a los reportados para *T. reesei* Rut C-30 que produjo 1,3 UI/mL en madera de álamo [19] y en madera tratada con explosión con vapor con el mismo microorganismo [22].

Un aspecto importante en esta investigación es el hecho de que el hongo *Trichoderma reesei* Rut C-30 (ATCC 56765) cuando se cultivó en paja de arroz fue capaz de producir enzimas celulolíticas a pesar de que creció en un medio con proteínas, las cuales le proporcionaban una fuente de C:N de fácil asimilación, siendo éste el primer trabajo que reporta este comportamiento.

La producción de celulasas en el fermentador (Figura 3), al igual que en el estudio en fiolas, fue creciente durante toda la fermentación con una producción final de 0,38 UI/mL (pH<sub>final</sub>: 6,27). Sin embargo, los títulos de enzimas alcanzados en el fermentador fueron inferiores en todo momento a los obtenidos en el estudio en fiolas (0,51 UI/mL; pH<sub>final</sub>: 6,38). Aunque no se aprecia una razón clara para esto, puesto que el crecimiento del hongo en el fermentador fue considerablemente mejor incluso hasta las 96 h (observación al microscopio), este resultado en particular podría estar asociado al efecto desnaturante de la agitación sobre las enzimas [23] o a las condiciones del escalamiento a 4 L. Si bien la agitación en el fermentador fue ajustada 50 rpm menos que en el estudio en fiolas, la agitación orbital como tal, no tiene un efecto mecánico directo en

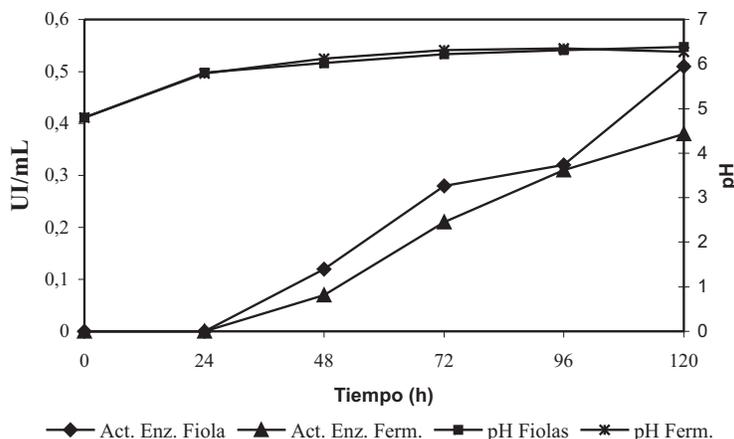


Figura 3. Comportamiento del pH y producción de celulasas por *T. reesei* Rut C-30 en paja de arroz. Estudio en el fermentador.

la columna de líquido (medio mineral, sustrato, hongo y enzimas, entre otros), como las tendrían las dos propelas que posee el fermentador, sobre las enzimas. En este trabajo, durante el escalamiento se obtuvo una disminución del 25% en la actividad enzimática con respecto al estudio en fiolas, lo cual se ha reportado en varios trabajos. Gomes y col. [16], trabajando con *T. viride* en un fermentador de 5L modelo Biostat-V encontró una disminución del 19% en la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, como consecuencia del escalamiento y Knapp y Legg [24] observaron variaciones entre el 41% y 49% menos de la actividad inicial de las celulasas empleando paja de trigo y Solka Flocc con *T. reesei* QM 9123.

### Conclusiones

Este trabajo demuestra que el *Trichoderma reesei* Rut C-30 puede ser utilizado para la producción de celulasas con paja de arroz como sustrato, aunque se desarrolla un pH relativamente elevado durante la fermentación. Este factor garantizaría también una alta producción de xilanasas, de tal manera que el mismo microorganismo podría ser utilizado para la producción de celulasas y xilanasas en las mismas condiciones de fermentación.

### Referencias Bibliográficas

- Colina A., de-Ferrer B., Aiello C., Ferrer A. "Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30, on rice straw". Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 105-108 (2003) 715-724.
- Vlasenko E. Y., Ding H., Labavitch J. M., Shoemaker S.P. "Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw". Bioresource Technol. Vol. 59 (1997) 109-119.
- Sulbarán de Ferrer B., Ferrer A., Aristiguieta M., Ojeda de Rodríguez G., Dale B. E. "Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated rice straw". Appl. Biochem. Biotechnol. Vol. 105-108 (2003) 155-164.
- Aiello C. "Producción de celulasas por fermentación de bagazo de caña de azúcar". Trabajo Especial de Grado. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Venezuela. 1986.
- Colina A. 2003. Mejoramiento de la producción de xilanasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 en paja de arroz. Trabajo Especial de Grado. Maestría en Microbiología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela. 2003.
- Mandels M., Weber J. "The Production of cellulases". Adv. Chem. Series. Vol. 95 (1969) 391-414.
- Zabala I., Ferrer A., Ledesma A., Aiello C. "Microbial protein production by submerged fermentation of mixed cellulolytic cultures". In: E. Galindo and O. T. Ramirez (eds), Advances in Bioprocess Engineering. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (1994) 455-460.
- Ghose V. "Measurement of cellulase activities". Pure Appl. Chem. Vol. 59 (1987) 257-268.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem. Vol. 193 (1951) 265-275.
- Statistix. User's Manual Analytical Software, USA. 1993.
- Béguin P., Aubert J. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Reviews. Vol. 13 (1994) 25-58.
- Kubicek, C.P. "Involvement of a conidial endoglucanase and a plasma-membrane-bound  $\alpha$ -glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*". J. Gen. Microbiol. Vol. 133 (1987) 1481-1487.
- Kubicek, C.P., Messner R., Gruber F., Mandels M., Kubicek-Pranz E. "Triggering of cellulose biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited  $\beta$ -diglucoside permease". J. Biol. Chem. Vol. 268 (1993) 19364-19368.
- Sternberg D. "Production of cellulase by *Trichoderma*". Biotechnol. Bioeng. Symp. Vol. 6 (1976) 35-53.
- Wen Z., Liao W., Chen S. "Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure". Bioresource Technol. Vol. 96 (2005) 491-499.

16. Gomes I., Gomes J., Steiner W., Esterbauer H. "Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*". Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 36 (1992) 701-707.
17. Bailey M., Buchert J., Viikari L. "Effect of pH on production of xylanase of *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media". Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 40 (1993) 224-229.
18. Velkovsca S., Marten M., Ollis D. "Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30". J. Biotechnol. Vol. 54 (1997) 83-94.
19. Smith, D., Bath, K., Wood T. "Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi". World J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 7 (1991) 475-484.
20. Szakacs G., Tengerdy R. "Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi". World J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 13 (1997) 487-490.
21. Olsson L., Christensen T., Hansen K., Palmqvist E. "Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30". Enzyme Microbial Technol. Vol. 33 (2003) 612-619.
22. Shin C., Lee J., Lee J., Park S. "Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates". Appl. Biochem. Biotechnol. Vol. 84-86 (2000) 237-245.
23. Kaya F., Heitmann J., Joyce T. "Cellulose binding to cellulose fibers in high shear fields". J. Biotechnol. Vol. 36 (1994) 1-10.
24. Knapp J., Legg M. "The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*". J. Appl. Bacteriol. Vol. 61 (1986) 319-329.

Recibido el 4 de Mayo de 2008

En forma revisada el 23 de Marzo de 2009