

고지탈묵용 Cellulase 및 Xylanase 생산

김옥한 · 손광희¹ · 복성해¹ · 오세균*

한국화학연구소, ¹한국과학기술연구원 유전공학연구소

Production of Cellulase and Xylanase for Enzymatic Deinking of Old Newspaper

Kim, Uk-Han, Kwan-Hee Son¹, Song-Hae Bok¹ and Say-Kyoun Ow*

Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

¹KIST, Genetic Engineering Research Institute, Taejeon 305-606, Korea

Abstract— The optimal conditions for cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* 28217 were studied for enzymatic deinking of old newspaper. The amounts of cellulase and xylanase from the strain was varied by initial medium pH, Tween 80, inoculum size of spore suspension, and carbon and nitrogen sources. The optimal conditions for cellulase production were pH 5.0~6.5, 0.02% of Tween 80, 0.5~1.0% of inoculum size of spore suspension (1×10^7 /ml), cottonseed meal as nitrogen source, and corn flour as carbon source. On the other hand, the optimal conditions for xylanase production were pH 6.5, 0.01% of Tween 80, corn steep liquor as nitrogen source, and disintegrated old newspaper as carbon source. The inoculum size for xylanase production was the same as for cellulase production. The concomitant production of cellulase and xylanase in shake flask culture was efficiently induced in the medium containing 0.5% cottonseed meal as nitrogen source and 1.0% old newspaper and 2.0% corn flour as carbon sources. In this case the activities of cellulase and xylanase produced were 6.11~7.22 IU/ml and 97.7 IU/ml, respectively. However, the cellulase production in 5l fermentor scale was slightly decreased compared with that in flask scale. Moreover, xylanase production was severely reduced in a fermentor scale. The study for the reason of decreased enzyme production in fermentor is further needed.

펄프 제지산업에 생물공학분야가 차지하는 비중이 점차 확대되면서 biopulping, biobleaching, slime control, 효소탈묵, 제지 슬러지처리 및 폐수처리, 표면 사이즈제 및 지력증강제용 효소변성전분생산 등에 관한 많은 관심이 집중되어 왔다(1-7). 특히 자원의 절약 및 폐기물의 감량화 추세에 부응하여 종이의 재활용에 관한 관심이 세계적으로 높아짐에 따라 신문고지 재생방법으로 lipase나 cellulase 등의 미생물 생산효소를 이용한 고지의 탈묵법이 개발되었다. 고지의 효소탈묵법은 세척법이나 부상법과 같은 재래식 탈묵방법에 비해서 에너지 비용절감, 종이의 물성개량, 환경오염 유발물질의 생성감소 등의 부가적인

장점이 보고되고 있다(4-7).

효소탈묵과정에는 cellulase, lipase, hemicellulase, ligninase 등의 목재 구성성분 분해효소들이 관여할 것으로 생각되고 있으나, 이런 효소의 탈묵 mechanism 등에 관해서는 아직 명확한 규명이 되어 있지 못하다. 지금까지 알려진 바와 같이 ligninase와 hemicellulase에 의한 biopulping 및 biobleaching 효과 등을 고려해 볼 때 효소용액내에 존재하는 cellulase의 각 효소성분비 뿐만 아니라 hemicellulase에 의해서도 영향을 받을 것으로 생각되므로 효소탈묵에 적합한 cellulase의 구성 성분비 및 특성을 가지고 있는 효소의 개발도 요구된다.

그러나 섬유소로부터 알코올 생산, 식품산업, 환경분야, 사료제조업, 섬유공업, 의약분야 등 cellulase를 이용하는 공업에 있어서 효소생산비용이 차지하는

Key words: *Trichoderma reesei* ATCC 28217, cellulase, xylanase, enzymatic deinking

*Corresponding author

비용이 상대적으로 크다는 점이 효소이용산업의 영역확대의 걸림돌이 되고 있다. 효소탈묵법에 의한 고지 재생방법도 실용화되기 위해서는 아직까지 효소생산비용이 재래식 탈묵방법에 사용되는 약품비에 비해서 다소 비싼 점에 비추어 볼 때 효소생산비의 절감을 위한 균주개량, 발효조건개선, 농축·정제공정의 확립, 효소반응조건의 최적화, 탈묵조건의 최적화 확립 등이 여전히 해결되어야 할 과제라고 할 수 있다(8-14). 따라서 본 연구에서는 신문고지 재생을 위한 효소탈묵용 cellulase 및 xylanase의 동시생산을 위한 배양조건에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

Cellulase 및 xylanase 생산균주는 *Trichoderma reesei* ATCC 28217이며, 사면 배양용 배지는 PDA 배지, 액체배양용 배지는 Duff 등(9)이 사용한 액체 배지조성을 기본으로 하여 탄소원, 질소원 등은 필요에 따라 변화시켰다.

배양방법

플라스틱 배양의 경우 500 ml 삼각플라스틱에 상기 액체배양용 배지 50 ml을 넣고 사면배지로부터 얻은 포자현탁액(1×10^7 개) 0.5 ml을 접종하여 30°C, 7일간, 180 rpm 조건에서 회전진탕배양하였다. Fermentor 배양은 MKB 5l용 fermentor에서 배양용량 3l, 전배양한 종균접종량 1%, 온도 28°C, 교반속도 250 rpm, 통기량 0.5 vvm을 표준으로 8일간 배양하였다.

효소활성 측정

CMCase(endo- β -1,4-glucanase) 활성측정 : Mandels 등(15)의 방법에 따라 기질용액으로 0.05 M citrate-NaOH buffer(pH 5.0)에 녹인 1% CMC 용액 0.5 ml, 효소여액 0.5 ml을 가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. DNS 용액 3 ml을 가하여 생성된 환원당을 550 nm에서 흡광도법으로 측정하였다(16). 이때 포도당을 표준물질로 하였다. 효소활성은 분당 효소액 1 ml이 1 μ mole의 환원당을 생성할 때를 1 unit으로 정하였다.

Filter paper 분해활성(FPase) 측정 : 전체 cellulase의 활성을 측정하기 위하여 Whatman No.1 filter paper 50 mg을 상기 완충액 1 ml에 포함시키고 효소여액 0.5 ml을 가하여 50°C에서 60분간 반응시킨

후 상기 방법과 같이 생성환원당을 정량하여 효소활성을 측정하였다.

Xylanase 활성측정 : Xylanase 활성측정은 1% xylan을 기질로 사용하여 CMCase 활성 측정과 동일한 방법으로 측정하였다. 표준물질은 xylose를 사용하였다.

단백질 정량 : 가용성 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법으로 측정하였다(17).

결과 및 고찰

Cellulase 및 Xylanase 생산조건

효소생산배지의 초기 pH 및 Tween 80의 영향 : 플라스틱 규모에서 효소생산을 위한 배양액의 최적 초기 pH를 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 cellulase는 pH 5.0~6.5, xylanase는 pH 6.5에서 생산효소의 활성이 가장 높았다. Cellulase의 경우 pH 3.0~6.5까지는 효소생산량에 큰 영향을 미치지 않았으나, pH 6.5 이상에서는 효소생산량이 급격히 감소하여 pH 7.0 이상에서는 효소생산이 크게 저해되었으며, pH 6.5 이하에서 배양하였을 때와는 달리 균사가 플라스틱 벽에 많이 흡착되는 양상을 보였다. Xylanase의 경우는 초기 pH가 3.5부터 6.5까지 증가함에 따라 효소생산이 증가하는 경향을 보였으며, 초기 pH 7.0 이상에서는 효소가 생산되지 않았다.

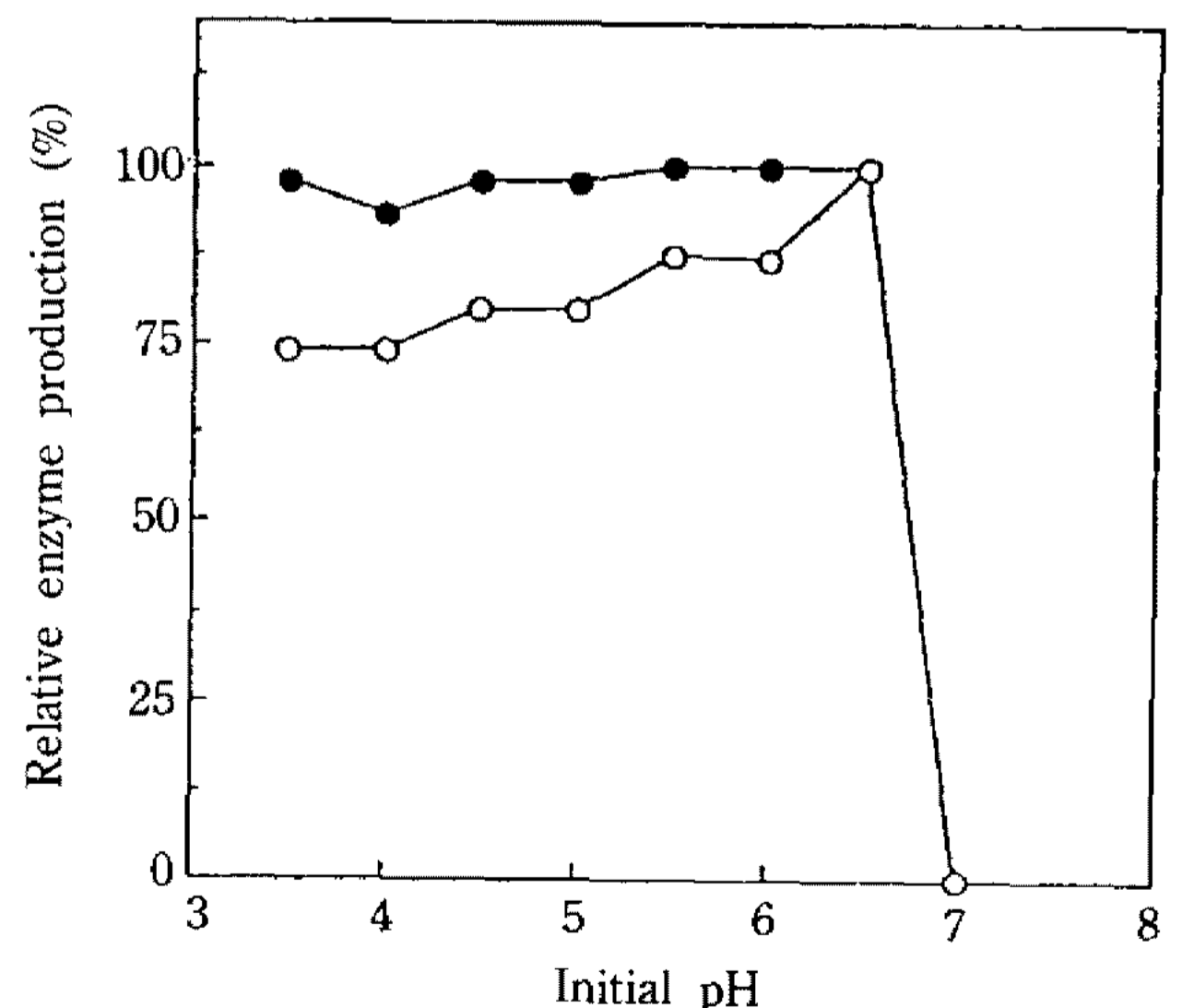


Fig. 1. Effect of initial pH of medium on enzyme production.

—●—; Cellulase, —○—; Xylanase
Temperature, 30°C; culture time, 7 days; shaking speed, 180 rpm

Table 1. Effect of Tween 80 on the production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* ATCC 28217

Concentration of Tween 80 (%)	Final pH	CMCase activity (%)	Xylanase activity (%)
0	3.60	81.5	92.8
0.01	3.25	85.2	100.0
0.02	2.98	100.0	90.5
0.05	3.14	96.3	85.7
0.10	2.98	96.2	85.6
0.20	2.97	96.3	83.4
0.50	2.76	96.3	83.4

Temperature, 30°C; initial pH, 5.5; culture time, 7 days; shaking speed, 180 rpm.

Table 2. Effect of inoculum size on the production of enzymes by *Trichoderma reesei* ATCC 28217.

Inoculum size (%)	Final pH	CMCase activity (%)	Xylanase activity (%)
0.5	2.83	100.0	100.0
1.0	2.94	100.0	94.8
2.0	2.77	91.0	87.5
4.0	2.77	90.7	94.9
10.0	2.73	84.5	59.9

Spore suspension (1×10^7 spore/ml) was inoculated in flask containing 50 ml of liquid culture broth.

Temperature, 30°C; initial pH, 5.5; culture time, 7 days; shaking speed, 180 rpm.

한편, 곰팡이로부터 효소분비를 촉진시키는 것으로 알려진 Tween 80의 첨가농도에 따른 효소생산을 검토한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 cellulase는 0.02%를 첨가했을 때, xylanase는 0.01%를 첨가하였을 때 효소생산이 가장 우수한 편이었으나 0.5% 농도까지는 큰 차이는 없었다.

Spore 접종량의 영향: 포자현탁액을 0.5~1.0% 접종했을 때 효소생산이 cellulase와 xylanase 공히 가장 우수하였는데 그 이상의 농도로 접종량을 증가하였을 경우 점차 효소생산량이 감소하였다(Table 2). 특히 xylanase의 경우 10%까지 접종량을 증가시켰을 때 효소생산량은 약 절반 정도까지 감소하였다. 이와 같이 접종량이 증가함에 따라 효소생산이 감소하는 이유는 포자접종량을 증가할 때 포자에 존재하는 저해물질이 효소생산을 억제하는 것으로 Jeenes 등(18)이 보고한 바 있다.

Table 3. Effect of various nitrogen sources on the production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* ATCC 28217 when grown in shake flask culture containing 3% Sigmacell as carbon source

Nitrogen sources (1%)	Final pH	CMCase activity (IU/ml)	Xylanase activity (IU/ml)
Polypeptone	8.20	ND	ND
Yeast extract	8.20	ND	ND
Skim milk	2.40	6.85	37.4
Corn steep liquor	6.60	12.77	177.6
Cottonseed meal	4.60	13.2	138.8
Dry yeast	2.80	ND	19.4
Soybean flour	8.20	ND	ND

ND; not detected.

Temperature, 30°C; initial pH, 5.5; culture time, 7 days; shaking speed, 180 rpm.

Table 4. Effect of various carbon sources on the production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* ATCC 28217 when grown in shake flask culture containing 0.1% polypeptone as nitrogen source

Carbon sources (1%)	Final pH	CMCase activity (IU/ml)	Xylanase activity (IU/ml)
Sigmacell	2.18	1.85	ND
Avicel	2.41	3.89	ND
Wheat bran	8.20	ND	94.4
Sawdust	7.00	ND	ND
Disintegrated ONP	6.00	ND	113.7
Rice hulls	7.10	ND	19.4
Rice bran	6.60	3.70	113.7
Bean chaff	8.10	ND	ND
Corn flour	4.70	4.26	30.5

ND; not detected, ONP; old newspaper.

temperature, 30°C; initial pH, 5.5; culture time, 7 days; shaking speed, 180 rpm.

질소원의 영향: 탄소원으로 Sigmacell의 농도를 3%(w/v) 되도록 첨가하고 각각의 질소원을 1%(w/v) 첨가하여 30°C에서 7일간 배양 후 배양액의 효소활성을 측정하여 결과를 Table 3에 나타내었다.

Cellulase와 xylanase 생산성은 면실박과 corn steep liquor가 효소생산용 질소원으로 우수하였다. 이들 질소원 이외에 polypeptone, yeast extract, soybean flour을 질소원으로 1%가 되도록 첨가했을 경우는 질소원 함량 과다로 인하여 생육도중 pH가 높

아저 효소생산 유도가 억제되는 것으로 생각되었다.

면실박의 최적 농도를 조사하기 위하여 Sigma-cell의 농도를 3%가 되도록 첨가한 다음 면실박의 농도를 0.25~1.50%까지 변화시키면서 배양액의 cellulase 활성을 측정된 결과 0.5~1.0%가 바람직하였으며, 그 이상의 농도에서는 효소생산능이 오히려 감소하였다. 한편, xylanase 생산을 위한 corn steep liquor의 적정농도를 조사하기 위하여 0.2~1.5%까지 농도를 변화시키고 탄소원으로 3% 신문고지를 사용하여 효소생산을 조사하였을 때 질소원 농도에 따른 효소생산성은 유사하였다.

탄소원의 영향: 기본액체배지에 질소원으로 0.1%

polypeptone을 공히 첨가한 배지에 각종의 탄소원을 3% 농도로 첨가하여 30°C에서 7일간 진탕배양시킨 후 배양액의 효소활성을 측정하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 Sigmacell, Aivcel, 쌀겨, 옥분을 탄소원으로 했을 때 cellulase 활성이 가장 높았으며 경제적인 측면을 고려해 볼 때 옥분이 그 중에서 탄소원으로 가장 우수한 것으로 사료되었다.

한편, xylanase는 신문고지, 밀기울, 쌀겨를 사용하였을 때 생산이 잘 되었으며, 신문고지의 경우 xylanase 생산용 탄소원으로 우수한 것으로 판단되었다. 쌀겨의 경우 단일 탄소원으로서는 다른 탄소원에 비해 cellulase와 xylanase 생산성이 동시에 높았다.

Table 5. Effect of combination between nitrogen and carbon sources on the production of enzymes by *Trichoderma reesei* ATCC 28217

N-Sources	C-sources	Final pH	CMCase activity (IU/ml)	Xylanase activity (IU/ml)
0.5% CSL	0.5% ONP	7.04	3.33	99.9
0.5% CSL	1.0% ONP	7.00	3.70	137.6
0.5% CSL	2.0% ONP	6.60	3.70	111.0
0.5% CSL	3.0% ONP	5.72	3.70	88.8
0.5% CSL	4.0% ONP	4.75	4.07	28.9
0.5% CSM	2.0% ONP	7.44	ND	82.1
0.5% CSM	3.0% ONP	7.45	ND	88.8
0.5% CSM	4.0% ONP	7.70	ND	83.3
0.5% CSM	5.0% ONP	6.65	ND	86.6
0.5% CSM	2.0% CF	7.02	4.82	18.1
0.5% CSM	3.0% CF	5.75	5.92	19.9
0.5% CSM	4.0% CF	4.71	6.48	22.2
0.5% CSM	2.0% CF	4.20	6.48	19.4
0.5% CSM	1.0% ONP + 2.0% CF	6.61	6.11	97.7
0.5% CSM	1.0% ONP + 3.0% CF	5.99	6.29	82.1
0.5% CSM	1.0% ONP + 4.0% CF	5.45	6.85	62.2
0.5% CSM	1.0% ONP + 5.0% CF	5.68	5.92	40.0
0.5% SF	1.0% ONP + 2.0% CF	7.00	5.18	106.6
0.5% SF	1.0% ONP + 3.0% CF	6.92	6.11	102.1
0.5% SF	1.0% ONP + 4.0% CF	6.80	6.48	93.2
0.5% SF	1.0% ONP + 5.0% CF	3.34	3.05	27.8
0.5% CSM	0.5% ONP + 2.5% CF	6.60	6.94	79.9
0.5% CSM	1.0% ONP + 2.0% CF	7.19	7.22	97.7
0.5% CSM	1.5% ONP + 1.5% CF	7.15	6.90	97.6
0.5% CSM	2.0% ONP + 1.0% CF	6.80	6.29	102.1
0.5% CSM	2.5% ONP + 0.5% CF	6.74	6.11	120.0
0.5% CSM	3.0% Avicel	2.98	8.88	28.8

CSL; corn steep liquor, ONP; old newspaper, CSM; cottonseed meal, CF; corn flour, SF; soybean flour. temperature, 30°C; initial pH, 5.5; culture time, 7 days; shaking speed, 180 rpm.

효소생산용 배지조성 검토 : Cellulase와 xylanase 생산능이 우수한 탄소원과 질소원의 종류 및 농도비를 달리하였을 때 각 효소의 활성을 Table 5에 나타내었다. Xylanase 생산은 질소원으로 corn steep liquor 0.5%와 탄소원으로 신문고지 1.0%를 사용하였을 때 137 IU/ml로 가장 좋았으며, cellulase 생산은 질소원으로 면실박 0.5%와 탄소원으로 옥분 4.0%를 사용하였을 때 6.48 IU/ml로 좋은 편이었다.

한편, 옥분과 신문고지를 함께 첨가하여 농도를 변화시켰을 때 옥분의 비율이 높으면 cellulase 생산이 잘되고, 신문고지의 비율이 높으면 xylanase의 생산이 상대적으로 우수하였다. 그 중에서 면실박 0.5%, 신문고지 1.0%, 옥분 2.0%의 비율로 혼합했을 때 cellulase와 xylanase를 동시에 생산하기 위한 적정조건으로 생각되었다. 이때 cellulase의 효소활성은 6.11~7.22 IU/ml, xylanase 효소활성은 97.7 IU/ml이었다. CMCase와 FPase의 효소생산비율은 5:1로서 거의 변화하지 않는 것으로 나타났다. 그러나 cellulase와 xylanase의 생산비는 탄소원과 질소원의 종류 및 농도비에 따라 크게 영향을 받는 것으로 볼 때 cellulase와 xylanase의 효소유도는 별개의 기작에 의하여 영향을 받는 것으로 판단되었다. 이는 Cochet(8)이 *Trichoderma reesei* QM-9414로부터 얻은 cellulase 활성은 탄소원과 질소원의 비율에 상관없이 CMCase/FPase가 1/4.9로 일정하다는 결과와 일치하고 있다.

Cellulase의 생산을 증가시키기 위한 연구로서 Mohagheht 등(9)은 회분식 배양에서 탄소원인 cellulose의 약 60%를 xylose로 대체함으로써 cellulose를 단독으로 사용한 것에 비해 효소생산이 감소하지 않으며, 이때 절약된 효소생산용 cellulose를 ethanol 발효기질로 사용함으로써 보다 경제적인 공정이 가능하다고 분석한 바 있다. Allen과 Roche 등(10)에 의한 회분식, 유가식, 연속식 배양법 등에 의하여 효소생산을 높이기 위한 연구를 비롯하여, Duff 등(11)에 의해 수행된 두 균주이상의 혼합배양에 의한 cellulase 생산효과에 관한 연구결과 *Trichoderma reesei* Rut C30과 *Aspergillus phoeicis* ATCC 329를 혼합배양했을 때 β -glucosidase 활성은 증가하는 대신에 전체 cellulase 활성은 감소하였다는 등의 보고가 있다. 그러나 동일 균주를 이용하여 cellulase와 xylanase를 동시에 효율적으로 생산하기 위한 연구는 지금까지 거의 찾아보기 힘든 실정이다.

한편, Smith와 Wood(12)는 최근 *Aspergillus awa-*

mori CMI 142727에 의한 xylanase 생산에 관한 연구를 수행하여 xylanase와 β -xylosidase의 생산은 높이고 protease의 생산은 억제하는 조건을 선정한 바에 의하면 질소원으로 proteose peptone과 yeast extract를 제외했을 때 protease 활성이 현저히 감소하였으며, 탄소원으로는 ball-milled 귀리의 짙을 2% 사용하였을 때 xylanase 생산이 효과적인 것으로 보고한 바 있다. 또한, Royer와 Nakas(13)는 *Trichoderma longibrachiatum*은 lactose와 xylan을 각각 0.2%와 0.8%를 배지중에 첨가하였을 때 xylanase 93.3 IU/ml과 cellulase 0.31 IU/ml의 효소를 각각 높이 생산한 것으로 보고한 바 있다. 이들 결과와 비교해 볼 때, 본 연구의 경우 xylanase 생산은 97.7 IU/ml로 유사하나, cellulase 생산은 7.22 IU/ml로서 더 우수하였다.

5/ Fermentor 배양

탄소원으로 옥분 2%, 신문지 1% 질소원으로 면실박 0.5%의 농도로 첨가한 효소생산용 배지 3l를 MKB fermenter(5l용)에서 pH 조절없이 8일간 배양한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 5l 규모의 fermenter에서도 flask 규모에서와 같이 cellulase는 양호하게 생산되었으나 xylanase의 경우 flask 배양 때보다 생산성이

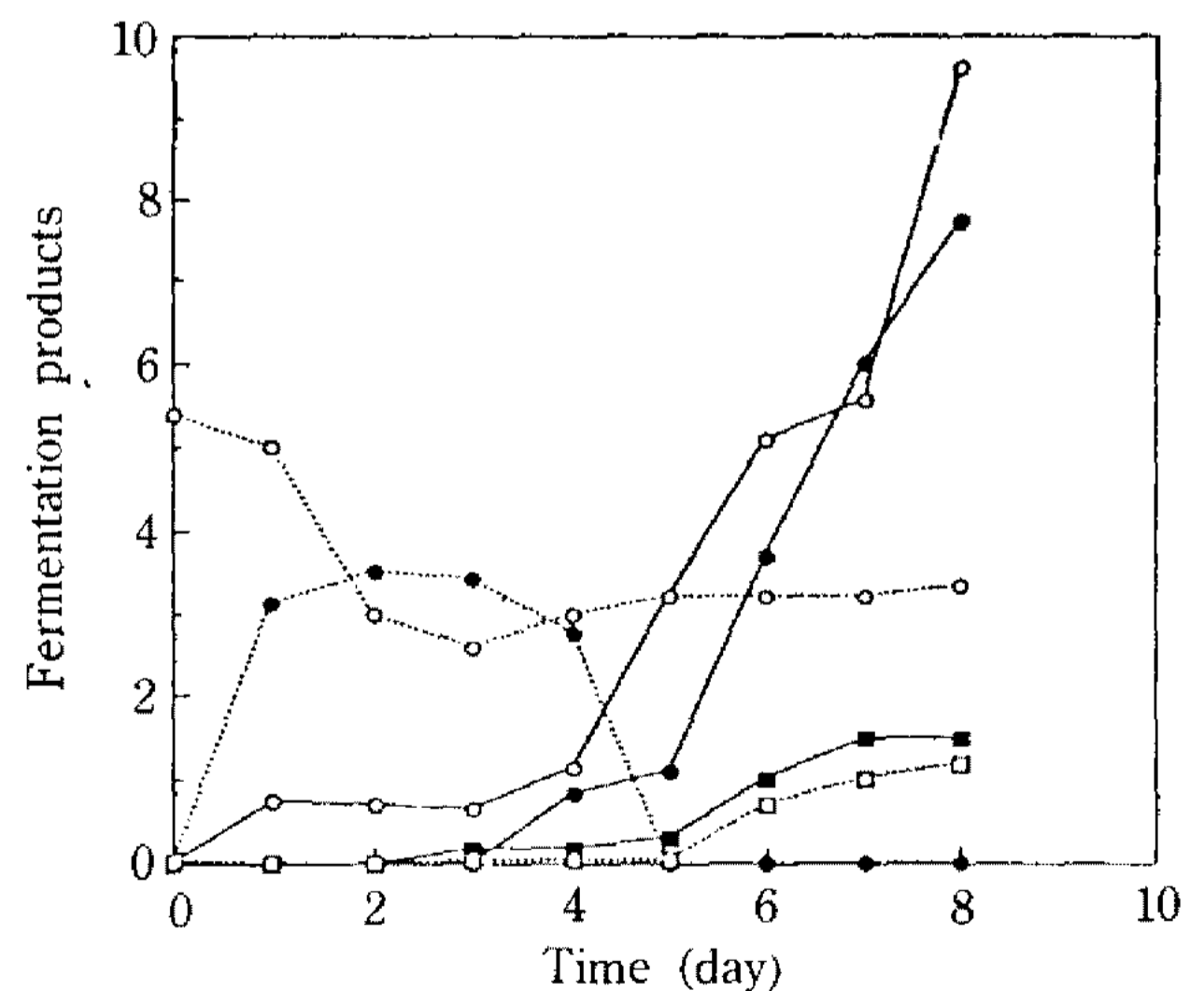


Fig. 2. Profiles of fermentation products in 5l fermentor.

—●—; CMCase activity (IU/ml), —○—; xylanase activity (IU/ml), —■—; FPase activity (IU/ml), —□—; protein (mg/ml), ---●---; reducing sugar ($\times 10$, mg/ml), --○--; pH.

Temperature, 28°C; agitation speed, 250 rpm; aeration rate, 0.5 vvm; carbon sources, 2% corn flour+1% old newspaper; nitrogen source, 0.5% cottonseed meal

현저히 떨어졌다. 효소생산은 배양액의 환원당이 대부분 소멸한 후에 본격적으로 생산되는 것으로 판단되었다. 한편, 동일조건에서 pH를 5.0으로 조절하면서 배양하였을 때는 효소생산이 잘되지 않는 결과를 얻었다. 이 점에 대해서는 fermentor 규모에서의 xylanase 생산을 위한 발효조건이 더 세밀히 검토되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

효소탈묵용 cellulase와 xylanase 생산을 위한 조건을 조사한 결과 배지초기 pH, Tween 80, 포자접종량, 질소원의 종류 및 탄소원의 종류에 따라 효소생산량이 크게 변하였다. Cellulase 생산을 위한 최적조건으로는 pH 5.0~6.5, Tween 80 0.02%, 포자현탁액($1 \times 10^7/ml$) 접종량 0.5~1.0%, 질소원으로 면실박, 탄소원으로 옥분을 사용하였을 때 가장 효과적이었다. 또한, xylanase 생산을 위한 최적조건으로는 pH 6.5, Tween 80 0.01%, 질소원으로 corn steep liquor, 탄소원으로는 신문고지를 사용하였을 때 효과적이었다. 이때 포자현탁액의 접종량은 cellulase 생산의 경우와 동일하였다. 한편, cellulase와 xylanase의 동시생산을 위해서는 플라스크 규모에서 질소원으로 면실박 0.5%, 탄소원으로 신문고지 1.0%와 옥분 2.0%를 첨가하였을 때 효과적이었다. 이때 생산된 배양액의 cellulase의 활성은 6.11~7.22 IU/ml, xylanase의 활성은 97.7 IU/ml이었다. 그러나 fermentor 규모에서는 동일 배지조성에서 효소생산이 다소 감소하였으며, 특히 xylanase 경우 배양액의 효소활성이 낮아서 이에 대한 보완이 요구된다.

감사의 말

이 연구는 1991년 과학기술처에서 시행한 특정과제 연구개발사업의 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Leatham, G.F., G.C. Myers and T.M. Wegner. 1990. Biochemical pulping of aspen chips: paper strength and optical properties resulting from different fungal treatments. *Tappi J.* **73**: 249-255.
- Clark, T.A., D. Steward, M.E. Bruce, A.G. McDonald, A.P. Singh and D.J. Senior. 1991. Improved bleachability of radiata pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes. *Appita* **44**: 389-393.
- Paice, M.G., R. Bernier, Jr. and L. Jurasek. 1988. Viscosity-enhancing bleaching of hard wood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 235-239.
- Kirk, T.K. 1989. Advances in biotechnology in pulp and paper manufacture: overview of the 1989 international conference. *Tappi.* **72**: 33-43.
- Eom, T.J. and S.K. Ow. 1991. Enzymatic deinking method of old newspaper. *Japan Tappi J.* **45**: 1377-1382.
- Kim, T.J., S.K. Ow and T.J. Eom. 1991. Enzymatic deinking method of wastepaper. *TAPPI Pulping Conference Book 2*, pp. 1023-1030. Orlando, FL. November.
- Ow, S.K. and T.J. Eom. 1990. Biological deinking method of newsprint wastepaper. *EUCEPA Conference Proceedings*, pp. 85-91. Barcelona, Spain, October.
- Cochet, N. 1991. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 104-109.
- Mohagheghi, A., K. Grohmann and C.E. Wyman. 1990. Production of cellulase on mixtures of xylose and cellulose in a fed-batch process. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 211-216.
- Allen, A.L. and C.D. Roche. 1989. Effects of strain and fermentation conditions on production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 650-656.
- Duff, S.J.B., D.G. Cooper and O.M. Fuller. 1987. Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and β -glucosidase by a mixed fungal fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 47-52.
- Smith, D.C. and T.M. Wood. 1991. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β -xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 883-890.
- Royer, J.C. and J.P. Nakas. 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 405-410.
- Bertrand, J.L., R. Morosoli, F. Shareck and D. Kluepfel. 1989. Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 791-794.
- Mandels, M., R. Andreotti and C. Roche. 1976.

Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**: 21-23.

16. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
17. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Fo-

lin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

18. Jeenes, D.J., D.A. Mackenzie, I.N. Roberts and D.B. Archer. 1991. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **9**: 327-367.

(Received July 10, 1992)