

## *Aspergillus niger*에 있어서 섬유질 분해효소계의 동질효소 양상에 미치는 기질의 영향

盧載郎 · 李榮河\* · 鄭宰勳

한국과학기술원 생물공학과, \*충남대학교 자연과학대학 미생물학과

### Influence of Substrates on the Isozyme Patterns of Cellulase and Xylanase Complexes in *Aspergillus niger*

Jae-Rang Rho, Young-Ha Rhee\* and Jae-Hoon Chung

Department of Biological Science and Engineering,

Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701 and

\*Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

Chungnam National University, Taejon 305-704, Korea

**ABSTRACT:** The influence of cellulosic and hemicellulosic substrates on the production of cellulase and xylanase complexes in *Aspergillus niger* was investigated. The culture conditions with different substrates exhibited profound effects on the level of endoglucanase (CMCase),  $\beta$ -glucosidase, endoxylanase and  $\beta$ -xylosidase, and on their isozyme patterns. However, intracellular and extracellular isozyme patterns of cellulase and xylanase complexes were qualitatively identical and appeared to be simultaneous in the early growth phase. Prolonged incubation led to the increase in the concentrations of isozymes with a little changes in the relative proportions of those isozymes. These results suggest that the biosynthesis of cellulase and xylanase complexes in *A. niger* is coordinately regulated at the level of induction. Moreover, multiple forms of extracellular cellulase and xylanase complexes seem to be the outcome of specific gene expression and should not be considered solely as the consequence of post-secretional modification of synthesized enzymes.

**KEYWORDS:** Cellulase, Xylanase, Isozyme, *Aspergillus niger*

미생물로 부터 생합성되는 섬유질 분해효소는 모두 multi-enzyme system으로 구성되어 있다. 즉, cellulose의 완전 가수분해를 위한 cellulase 효소계는 endo- $\beta$ -1, 4-glucanase(CMCase, EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase(EC 3.2.1.91) 및  $\beta$ -glucosidase(EC 3.2.1.21)로 구성되어 있으며(Bisaria 등, 1981), xylanase 효소계도 endo- $\beta$ -1, 4-xylanase(endoxylanase, EC 3.2.1.8) 및  $\beta$ -xylosidase(EC 3.2.1.37)로 구성되어 있다(Reilly, 1981). 또한 이 두가지 효소계를 구성하고 있는 각각의 효소는 여러개의 동질효소(isozyme)로 이루어져 있음이 많은 섬유질 분해미생물에서 확인되고 있다(Labudova 등, 1983; Dekker, 1985; Wong 등, 1988).

그러나 섬유질 분해효소계 동질효소의 생성이 어떠한 기작에 의해 이루어지는 것은 아직까지 분명하게 밝혀지지 않고 있다. 일부의 연구자들(Gong 등, 1979; Wood, 1985; Eriksson 등, 1985)은 세포내로부터 외부로 효소가 분비되는 과정에서 glycosylation의 정도가 다르게 일어나거나 분비 후 단백질 가수분해효소의 작용에 의해 modification이 이루어짐으로써 여러개의 동질효소가 형성된다고 주장하는 반면에, 다른 연구자들은(Labudova 등, 1983; Wong 등, 1986; Bhat 등, 1989)은 각각의 동질효소가 서로 다른 유전자의 발현산물임을 주장하고 있다. 이러한 동질효소 생성기작의 규명은 cellulase와 xylanase 효소계의 생합성 조절기작을 이해

하고, 이를 통하여 섬유질 자원의 효율적 활용을 이룰 수 있다는 점에서 그 의미가 매우 클 것으로 믿어진다.

따라서 본 연구에서는 cellulase와 xylanase 효소계의 생성능이 우수하고, 유성생식과 준유성생식에 의해 섬유질 분해효소계의 유전학적 연구에 유용한 *Aspergillus niger* (Vogt 등, 1977; Boyer 등, 1983; Frederick 등, 1985)를 재료로 하여 여러가지 섬유질 기질의 첨가에 따른 세포내외의 섬유질 분해효소계의 생산 및 동질효소의 양상을 배양시간별로 조사함으로써 동질효소의 생성기작과 이 두 효소계의 생합성 조절에 있어서 상호간의 연관성을 분석하였다.

## 材料 및 方法

### 균주 및 배지

본 연구에서는 *Aspergillus niger* ATCC 1374 야생균주가 사용되었으며, 실험목적에 따라 30°C에서 Harsanyi 등(1977)의 완전배지 또는 최소배지에서 배양하였다. 최소배지는 minimal stock solution 20 ml과 함께 탄소원으로 각종 유도물질(inducer)를 최종농도가 1%(w/v) 되도록 증류수에 녹여 1 liter로 만들었다. 사용된 유도물질은 carboxymethyl cellulose(CMC, Sigma), Larchwood로 부터 얻은 xylan (Sigma), 그리고 *Laminaria digitata*에서 얻은 laminarin(Sigma) 등이며, 이들의 배합정도를 달리하여 CMC(1%, w/v), xylan(1%, w/v), CMC-xylan(0.5 : 0.5%, w/v), CMC-xylan-laminarin(0.4 : 0.4 : 0.2%, w/v)을 만들었다.

### 배양 및 효소생산

야생균주 사면 배양체로부터 0.02% Tween 80으로 분생포자 현탁액을 만들어 완전배지에  $1.0 \times 10^6$  분생포자/ml 배지되게 접종한 후, Rotary shaker (130 rev/mm, r=50 mm)에서 30°C로 18시간 진탕 배양하였다. 자란 균사체를 멸균된 거즈로 걸러 수확하고 멸균된 식염수(0.8%, w/v, NaCl)로 세척하여 다시 각종 유도물질이 첨가된 최소배지(각 30 ml)에 각각 접종한 후 30°C에서 진탕배양하였다. 그리고 배양액내의 균사체를 일정 시간별로 채취하여 Whatman No.2 거름종이로 거른 다음 여과액을 세포외효소 용액으로 사용하였다. 걸러진 균사체(1.5

mg/dry weight)에 Aluminum oxide( $Al_2O_3$ ) 1g을 첨가하여 막자사발에서 4분간 일정속도로 갈아 세포를 파괴한 뒤 4°C에서 원심분리(8,000×g/30 min)하여 얻은 상등액(final volum 30 ml)을 세포내효소 용액으로 사용하였다.

### 효소 활성도 측정

CMCase와 endoxylanase의 활성도는 각각 CMC와 xylan을 0.05 M 초산완충용액(pH 5.0)에 녹인 기질용액 0.9 ml과 효소용액 0.1 ml을 섞은 반응혼합물을 37°C에서 15분 동안 반응시킨 후 Somogyi (1952)와 Nelson(1944)의 방법에 따라 파장 540 nm에서의 흡광도로서 유리된 환원당을 측정하였고, 효소활성도는 위의 조건하에서 1분동안 최종분해산물(CMCase는 glucose equivalents, xylanase는 xylose equivalent) 1 μmole을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하여 분석하였다.

β-glucosidase 및 β-xylosidase는 0.05 M 초산완충용액(pH 4.5)에서 PNPG(p-nitrophenyl-β-glucopyranoside, Sigma), PNPX(p-nitrophenyl-β-xylopyranoside, Sigma)를 각각 1 mM되게 만든 기질용액 0.9 ml과 효소용액 0.1 ml의 반응혼합물을 37°C에서 15분간 반응시키고 1 M  $Na_2CO_3$ 를 2.0 ml 첨가한 뒤 7 ml의 증류수로 희석하여 파장 420 nm에서 유리된 p-nitrophenol(PNP)의 흡광도를 측정하였다. 효소활성도 1 unit는 1분동안 1 μmole의 PNP를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 Bovine serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 시행하였다.

### 전기영동(Polyacrylamide gel electrophoresis)

Non-dissociating polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Davis(1964)의 방법을 변형하여 slab gel의 형태로 high pH discontinuous gel 전기영동을 하였다. 효소 시료는 준비된 조효소액을 사용하였다. 단백질 염색은 coomassie brilliant blue R250을 methanol/water/acetic acid(40 : 50 : 10, 부피비)에 0.2%(w/v)로 녹인 용액에서 40분간 행하였고 methanol/water/acetic acid(30 : 60 : 10, 부피비)에서 탈색시켰다.

### Isoelectric Focusing(IEF)

IEF은 Phast System(pharmacia LKB) IEF을 이용하였고, 준비된 조효소액을 효소시료로 사용하

여 1  $\mu$ l 되게 sample-well stemp에 떨어뜨린 후 0.8  $\mu$ l가 sample applicator에 묻도록 하여 1000 V (2.5 mA, 3.5 W, 15°C)에서 전개시켰다.

**활성 염색(Activity staining)**

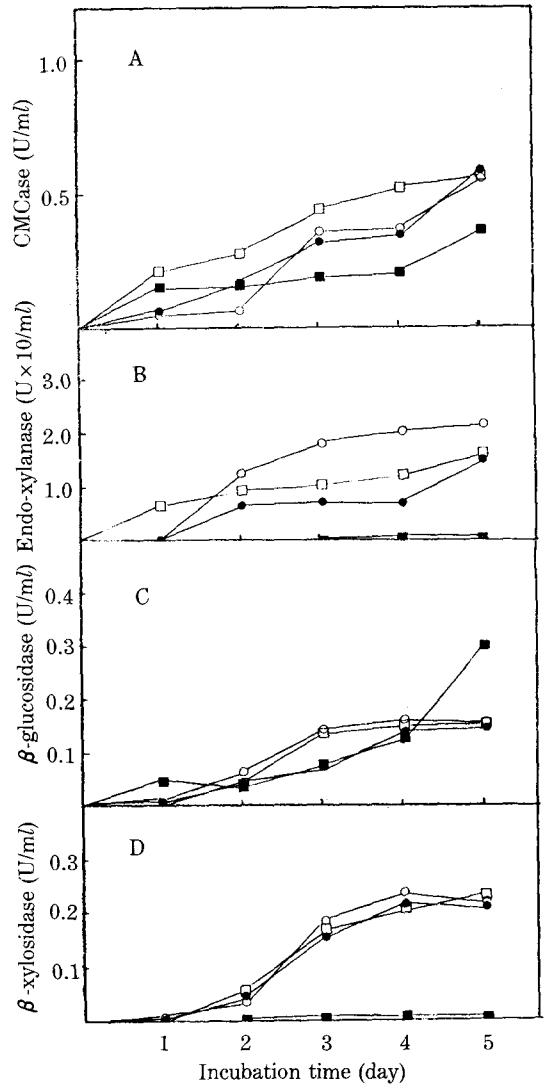
CMCase와 endoxylanase의 활성염색은 11%, 9% polyacrylamide gel에서 전개시킨 것을 이용하였다. 또한 agar replica는 0.05 M 초산완충용액(pH 5.0)에 기질(CMCase는 CMC, xylanase는 xylan)과 정제된 agar(Difco)를 각각 0.1%, 3%(w/v)되게 녹인 후 두께가 1.4 mm되도록 만든 뒤 agar replica에서 수분을 제거하였다. 그리고 전개가 끝난 polyacrylamide gel 역시 수분을 제거한 후, agar replica에 올려놓고 gel과 replica사이의 기포를 제거하였고, 수분증발을 막기 위해 parafilm으로 덮은 후 40°C에서 2시간 반응시켰다. 그리고 4°C에서 15분간 냉온처리하여 반응을 중지시키고, gel은 떼어내고 agar replica는 0.1% congo red로 30분동안 활성염색하였다(Lee 등, 1989). 그리고 1 M NaCl에 담그어 줌으로서 CMCase와 xylanase에 해당하는 부위의 붉은색이 모두 제거되도록 한 뒤, 5% acetic acid에 넣어주어 더욱 선명한 band가 나오게 하였다(Beguin, 1983).

$\beta$ -Glucosidase와  $\beta$ -xylosidase의 활성염색은 Schmid 등(1987)의 방법에 따라 시행하였다. 먼저 Phast IEF System에서 1000 V로 전개시킨 후 gel로부터 수분을 제거하였다. Replica은 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -glucoside 및 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xyloside를 citrate buffer(50 mM)에 5 mM되게 녹인 용액을 Whatman No. 1 filter paper에 spray하여 40°C에서 30분 건조시켜 준비하였다. 그리고 수분이 제거된 gel에 건조된 filter paper를 덮은 후 40°C에서 10분간 반응시켜 각 효소의 components에 해당하는 band를 4-methylumbelliferone fluorescence(350 nm)에서 관찰하였다.

**結果 및 考察**

**섬유질 분해효소계의 생합성**

*A. niger* ATCC 1374 야생균주를 CMC(1%), xylan(1%), CMC-xylan(0.5 : 0.5%), CMC-xylan-laminarin(0.4 : 0.4 : 0.2%)이 각각 들어있는 최소배지에서 배양하고, 배양시간에 따라 CMCase, endox-



**Fig. 1.** Effect of substrates on the production of extracellular cellulase and xylanase complexes from *A. niger*.

xylanase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase의 세포외 및 세포내 효소활성도를 조사하였다. Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 CMCase와  $\beta$ -glucosidase는 CMC 단일기질일 경우보다는 CMC 이외에 xylan이 첨가된 혼합기질의 사용시 효소의 생합성량이 더 높았다. 즉, CMC에 xylan 또는 xylan-laminarin을 넣어 주었을 때 세포외 및 세포내 효소활성이 증가되는 기질의 공조효과(synergistic effect)가 나타났다. 세포외와 세포내 효소활성을 비교하여 보면 비슷한 수준의 활성을 보이는 CMCase와는 달리  $\beta$ -

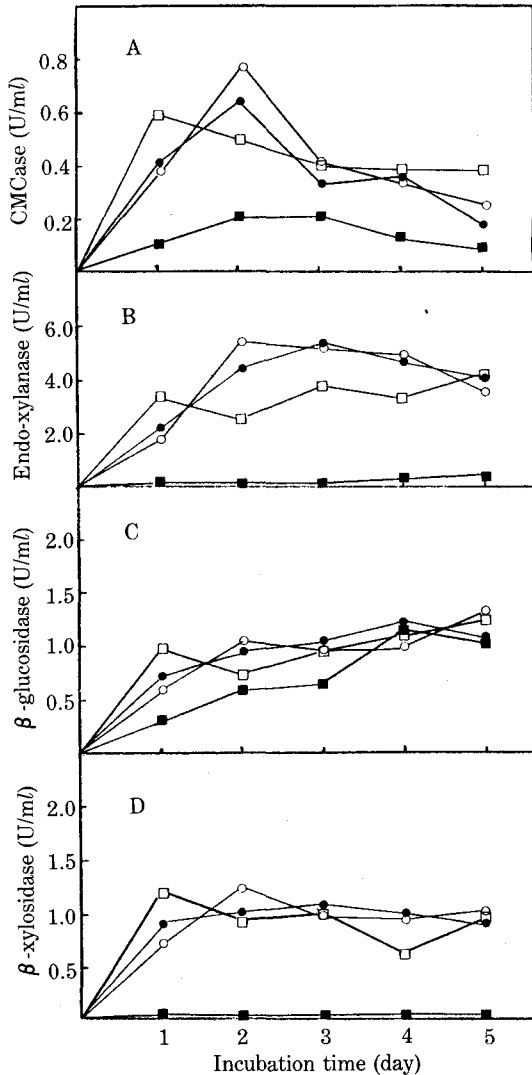


Fig. 2. Effect of substrates on the production of intracellular cellulase and xylanase complexes from *A. niger*.

glucosidase는 세포내에서 주요기능을 담당하므로 세포외보다 세포내가 5배 이상 높은 효소활성이 나타났다.

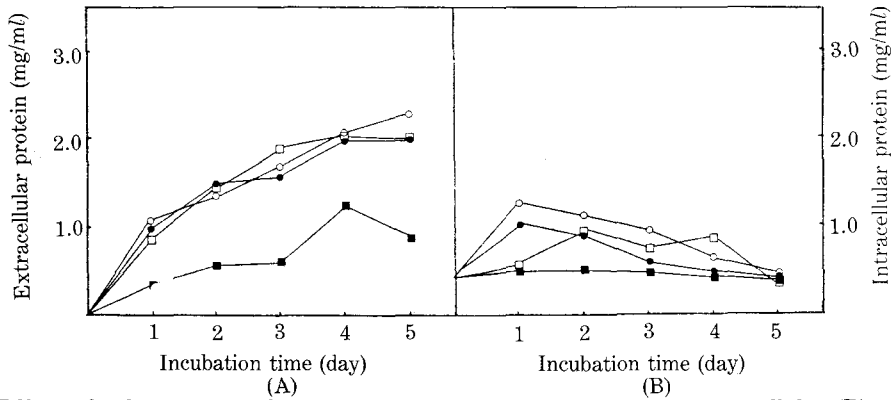
Endoxylanase와  $\beta$ -xylosidase는 xylan 단일기질 일때 가장 높은 효소활성을 보여 주었고, xylan에 다른 기질들을 첨가해 주어도 효소활성에 별다른 영향을 주지 않았다. 더우기 CMC 단일기질만 넣어준 배양액에서는 두 효소 공히 효소활성이 거의 보이지 않는 것으로 보아 CMC가 xylanase 생합성

유도에 영향이 없음을 알 수 있다. 세포외와 세포내 효소 활성을 보면  $\beta$ -xylosidase는  $\beta$ -glucosidase와 같이 세포내가 5배 이상 높게 나타났으나, endoxylanase는 CMCase와 달리 세포외 효소활성이 5배 정도 높게 나타났다. Endoxylanase에서 이러한 현상은 이 효소가 생합성의 유도효과가 높거나, 세포외로 분비되는 과정에서 modification에 의해 효소활성이 증가된 것으로 사료된다.

최근 Lee 등(1989)은 *A. nidulans*의 cellulase 및 xylanase 효소계의 생합성이 CMC와 xylan의 혼합 기질을 이용하였을 때 각각의 단일기질을 유도물질로 사용하였을 때 보다 훨씬 증진됨을 보고한 바 있으며, *Trichoderma viride*의 경우에도 laminarin과 avicel을 각각 유도기질로 사용하였을 때 보다 laminarin-avicel(7:3, w/v) 복합물을 유도기질로 사용하였을 때  $\beta$ -glucosidase 및  $\beta$ -1,3-glucanase의 생산이 증대됨이 밝혀진 바 있다(Fukuda 등, 1987). 이는 pectin이나 lignin의 생분해시 cellulose 기질의 첨가에 의해 그 분해율이 보다 높아진다는 연구결과(Hiroi 등, 1976; Haltmeier 등, 1983)와 관련지어 볼 때 lignocellulosic biomass 분해와 관련된 효소계의 생합성에는 상호 긴밀하게 연관된 조절기작이 있을 것으로 보인다. 즉, 섬유질 물질을 탄소 및 에너지원으로 이용하는 미생물의 경우에는 에너지 효율성을 높이기 위하여 cellulase와 xylanase 효소계의 생합성 조절이 유도물질에 의한 효소의 유도 수준에서 상호 연관되어 있으며, 이에 따라 cellulose 성분 이외에 xylan을 첨가하는 것이 cellulase 효소계의 생합성에 공조효과를 나타낼 수 있는 것으로 추정된다. 본 연구에서도 나타난 바와 같이 *A. niger*에 있어서 혼합기질에 의한 cellulase 효소계의 공조효과는 효소생산의 제고를 이룰 수 있다는 점에서 매우 흥미로운 현상이라 할 수 있다.

한편, 기질별 배양시간에 따른 단백질의 생합성량 비교는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 단백질 생합성량에서도 효소활성도 측정에서 나타났던 결과와 유사하게 CMC 단일기질의 사용시 보다 xylan 단일기질 또는 혼합기질의 사용시 세포외 및 세포내 단백질 생합성량이 현저히 높았다. 이러한 결과는 CMC 단일기질 사용시 나타난 낮은 효소활성이 단백질 생합성량과 밀접한 관계가 있음을 보여 준다.

#### 동질효소(Isozyme)의 양상

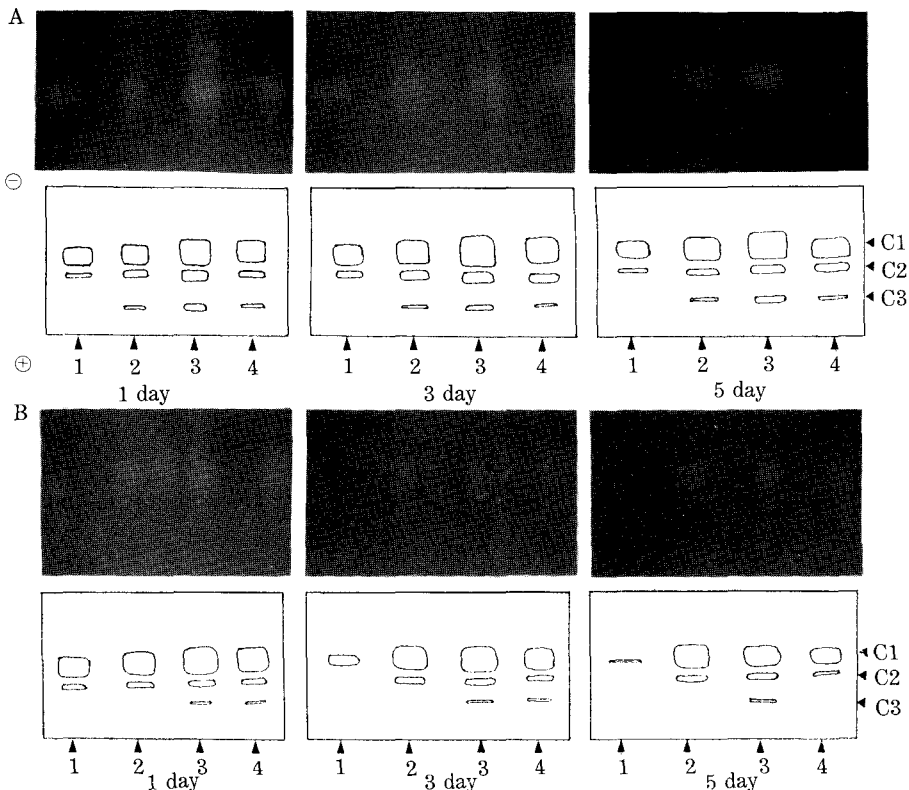


**Fig. 3.** Effect of substrates on the production of extracellular (A) and intracellular (B) protein from *A. niger*.

유도기질에 따른 cellulase 및 xylanase 효소계의 생합성 조절현상을 파악하기 위하여, 각 기질에 따라 생합성된 세포외 및 세포내효소의 동질효소(isozyme)를 Polyacrylamide gel electrophoresis 또는 Isoelectric focusing(IEF)을 이용하여 분리하고 각

효소별로 활성염색하여 그 양상을 비교하였다.

CMCase의 기질에 따른 동질효소의 생합성 양상을 보면 하나의 main component(C1)와 두개의 minor components(C2, C3)로 구성된 효소인 것을 알 수 있다(Fig. 4). 그러나 CMC 단일기질을 탄소원



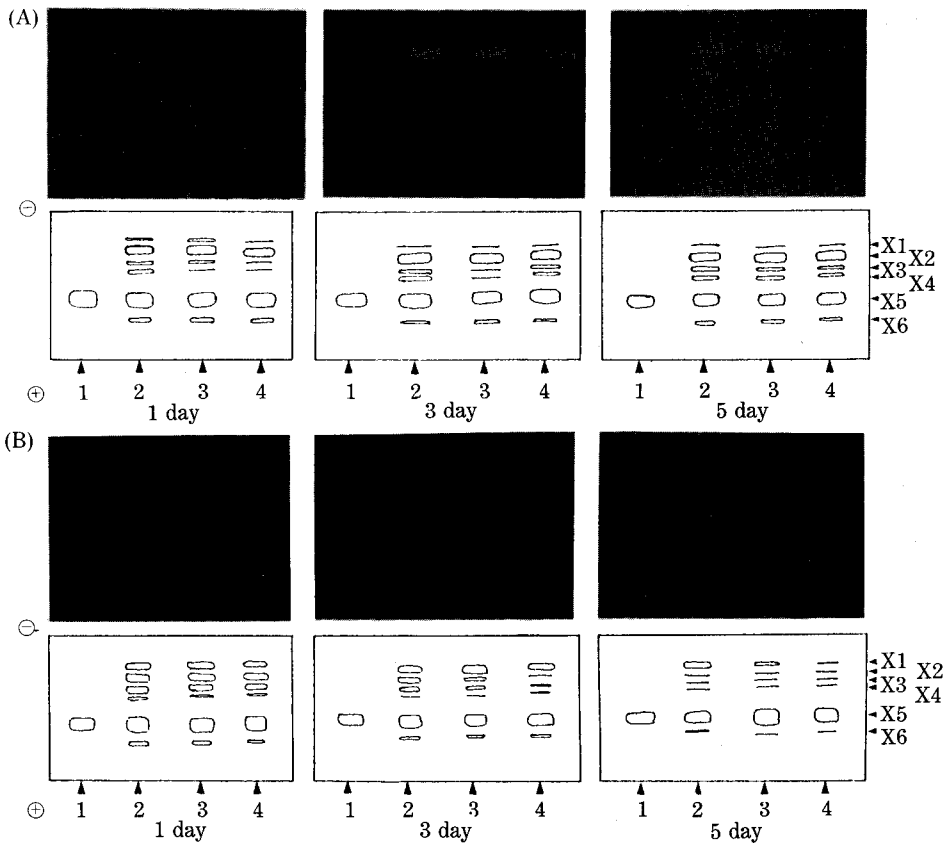
**Fig. 4.** Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of extracellular (A) and intracellular (B) CMCCase components from *A. niger* cultures grown on CMC (lane 1), xylan (lane 2), CMC-xylan (lane 3), and CMC-xylan-laminarin (lane 4).

으로 사용했을 때는 xylan(lane 2) 및 xylan이 들어있는 혼합기질(lane 2,3,4) 사용시에 나타난 C3 band가 나타나지 않았다. 그러므로 이러한 C3 band는 xylan이나 xylan 유도체에 의해 유도되는 것으로 추측되며, Fig. 1과 Fig. 2에서 혼합기질의 경우에 효소활성이 증가된 것은 이러한 C3 component의 새로운 생합성과 관련이 있을 것으로 보인다.

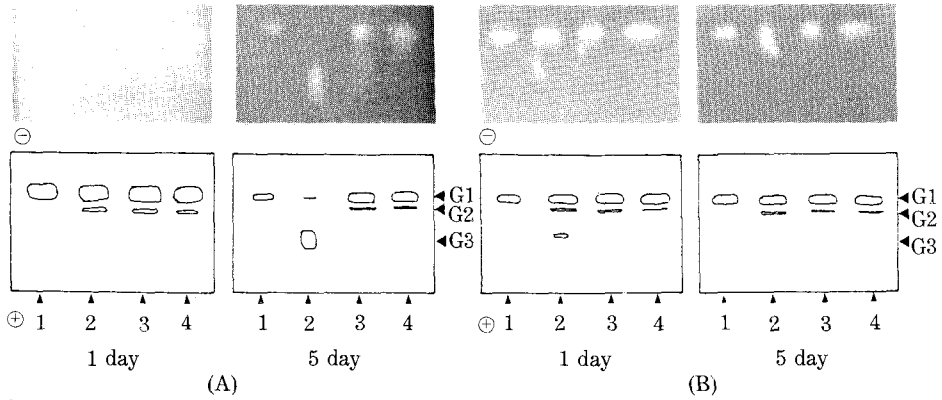
Endoxylanase의 활성염색 결과 이 효소는 1개의 main component(X2)와 5개의 minor components로 구성되었고, 효소활성도 조사에서 CMC가 이 효소의 활성에 거의 영향을 주지 않았던 것과 같이 CMC를 단일 탄소원으로 사용했을 경우에는 X5의 희미한 component만이 유도되는 것이 관찰되었다(Fig. 5). 또한 xylan 단일기질과 혼합기질의 경우에는 components의 생합성에 별다른 차이가 없는 것이 나타났다.

Schmid(1987)의 방법에 따라 Phast system IEF을 수행하여 활성염색한 결과  $\beta$ -glucosidase는 3개의 형광 band로 나타났다(Fig. 6). 이들 중 G2는 xylan이 들어있는 배양액(lane 2,3,4)에서만 나타났고, G3는 xylan 단일기질이 들어있는(lane 2) 곳에서만 나타나는 것으로 미루어 G2, G3 band는 비록 효소활성이 낮지만 xylan 또는 xylan 유도체에 의해 생합성이 유도되어 효소활성도의 증가에 기여한 것으로 사료된다.

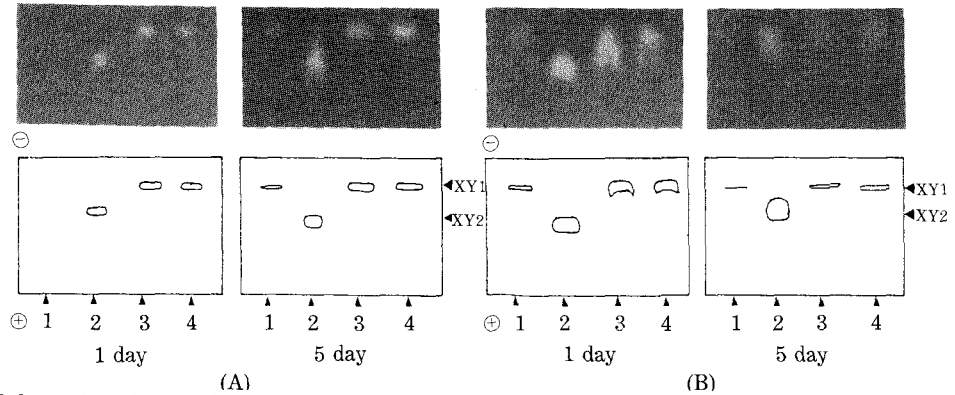
$\beta$ -Xylosidase를 활성염색하면 2개의 동질효소 band가 나타났다(Fig. 7). 이들 중 XY1은 CMC가 들어있는 배양액에서만 유도되며, XY2는 xylan 단일기질이 있는(lane 2) 곳에서만 유도되었다. xylan이 들어있는 혼합기질(lane 3,4)에서 XY2 component가 유도되지 않은 것은 혼합기질의 경우에 배양액내 xylan 농도비가 너무 낮아 XY2 compo-



**Fig. 5.** Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of extracellular (A) and intracellular (B) xylanase components from *A. niger* cultures grown on CMC (lane 1), xylan (lane 2), CMC-xylan (lane 3), and CMC-xylan laminarin (lane 4).



**Fig. 6.** Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of extracellular (A) and intracellular (B)  $\beta$ -glucosidase components from *A. niger* cultures grown on CMC (lane 1), xylan (lane 2), CMC-xylan (lane 3), and CMC-xylan-laminarin (lane 4).



**Fig. 7.** Polyacrylamide gel electrophoretic of extracellular (A) and intracellular (B)  $\beta$ -xylosidase components from *A. niger* cultures grown on CMC (lane 1), xylan (lane 2), CMC-xylan (lane 3), and CMC-Xylan-laminarin (lane 4).

nent의 유도가 안된 것으로 생각된다. 그러므로 xylan 농도를 높여주면 Fig. 1과 2에서 발견되지 않았던 기질의 공조효과를 기대할 수 있으리라 생각된다.

한편 각각의 기질에서 배양시간에 따라 생합성된 섬유질 분해효소계 동질효소의 양상을 활성염색하여 조사한 결과를 보면 각 효소의 동질효소별로 band의 상대적 intensity에는 약간의 변화가 있었으나, 전반적으로 배양시간에 따른 동질효소의 생합성 양상에는 차이가 거의 없었다(Fig. 6). 그러나  $\beta$ -glucosidase의 C3 band는 세포내에서 배양초기에 나타나다가 5일째에는 사라졌으며, 세포외에서는 배양초기에는 없다가 5일째에는 band가 나타나는 현상을 보였다. 그러므로 이 효소는 배양단계에 따라 효소 생합성 양상이 다르게 되는 것으로 추측된다.

이러한 결과들은 *A. niger*의 cellulase 및 xylanase 효소계의 동질효소 생성이 유도기질의 영향을 크게 받으며, 동질효소 양상의 차이가 효소생산에서 나타난 기질의 공조효과와도 깊은 관련이 있음을 보여준다. 또한 배양시기에 따라 조사된 세포의 및 세포내 섬유질 분해효소계 동질효소의 양상의 비교는 이들 동질효소의 생성기작을 이해하는데 중요한 단서를 제공해 주는 것으로 보인다. 현재까지 보고되어진 바에 의하면 섬유질 분해효소를 구성하는 각 효소의 동질효소 생성은 두가지 기작에 의해 설명되어 지고 있다. 첫번째는 세포내에서 이러한 효소가 생합성된 후에 세포외로 분비되는 과정 중에서 glycosylation 또는 proteolytic modification 등의 post-secretional modification에 의해 multiple isozyme

forms이 된다는 것이고(Gong 등, 1979; Wood, 1985; Eriksson 등, 1985), 두번째는 유전자 수준에서 multiple isozyme forms이 각기 다른 유전자에 존재하다가 이들이 세포내에서 생합성된 후 세포외부로 분비된다는 것이다(Labudova 등, 1983; Wong 등, 1986; Bhat 등, 1989). 그러나 본 실험의 결과에서 세포내와 세포외의 multi-isozymes 양상을 보면 band의 상대적 intensity에는 약간의 차이가 존재하나, 세포내 효소의 동질효소 양상과 세포외 효소의 동질효소 양상 사이에 변화가 없는 것이 관찰되었다. 그러므로 *A. niger*에 있어서 cellulase 및 xylanase의 동질효소 생성은 post-secretional modification에 의한 것이 아니라, 각각의 동질효소가 각기 다른 유전자에 의해 생성되면서 기질에 따라 조절 받는 것으로 사료된다. 또한 이러한 결과들로 보아 cellulase 및 xylanase의 생합성은 유도물질에 의한 효소의 유도수준에서 상호 연관적으로 조절되어 진다고 믿어진다.

### 摘 要

*Aspergillus niger*에 있어서 여러가지 섬유질 기질이 세포내외의 섬유질 분해효소계의 생합성 및 동질효소의 양상에 미치는 영향을 조사하였다. Cellulase 및 xylanase 효소계의 생합성은 사용된 기질에 따라 큰 차이가 있었으며, 특히 cellulase 효소계의 CMCase와  $\beta$ -glucosidase는 혼합기질의 사용시 효소활성이 증진되는 기질의 공조효과를 보였다. 또한 기질에 따라 섬유질분해효소계 동질효소의 생성 양상이 다르게 나타났으나 세포내외간 동질효소 양상의 차이는 발견되지 않았으며 배양시간에 따른 동질효소의 변화도 없었다. 이러한 결과들은 *A. niger*의 cellulase 및 xylanase 효소계의 생합성은 기질에 의한 효소의 유도 수준에서 상호 연관적으로 조절되어짐을 보여주며, 세포외 효소에서 나타나는 multiple-isozyme의 형성이 합성되어진 효소의 post-secretional modification에 의한 결과라기 보다는 각각의 유전자 발현 결과에 의한 것임을 시사한다.

### 參考文獻

Beguin, P. (1983): Detection of cellulase activity

in polyacrylamide gels using congo red-stained agar replicas. *Analytical biochemistry*. **131**: 333-336.

Bhat, K.M. and Wood, T.M. (1989): Multiple forms of endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase in the extracellular cellulase of *Penicillium pinophilum*. *Biotech. Bioeng.* **33**: 1242-1248.

Bisaria, V.S. and Ghose, T.K. (1981): Biodegradation of cellulosic materials; Substrate, Microorganism, enzyme and products. *Enzyme. Microb. Technol.* **3**: 90-103.

Boyer, R.F. and Redmond, M.A. (1983): Effect of chemical modification of cellulase on the activity of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biotech. Bioeng.* **25**: 1311-1319.

Davis, B.J. (1964): Disc electrophoresis-II. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.

Dekker, R.F.H. (1985): Biodegradation of the hemicelluloses. In *Biosynthesis and biodegradation of wood components* (ed. T. Higuchi), Academic Press, Inc., p.505-533.

Eriksson, K.E. and Wood, T.M. (1985): Biodegradation of cellulose. In *Biosynthesis and Biodegradation of wood components* (ed. T. Higuchi). Academic Press, Inc., p.469-503.

Frederick, M.M., Kiang, C.H. Frederick, J.R. and Reilly, P.J. (1985): purification and characterization of endo-xylanase from *Aspergillus niger* I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 525-532.

Fukuda, H., Imura, M., Kasahara, H. and Usami, S. (1987): Effects of the addition of Laminarin on  $\beta$ -glucosidase production by *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Technol.* **65**: 91-93.

Gong, C.S., Ladish, M.R. and Tsao, G.T. (1979): Biosynthesis, purification and mode of action of cellulase by *Trichoderma reesei*. In *Hydrolysis of cellulose: Mechanism of Enzymatic and Acid Catalysis* No. 181. *Am. Chem. Soc.* 261-288.

Haltmeier, T., Leisola, M., Ulmer, D., Waldner, R. and Fiechter, A. (1983): Pectinase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 1685-1690.

Harsanyi, Z., Granek, I.A. and Mackenzie, D.W. R. (1977): Genetic damage induced by ethyl alcohol in *A. nidulans*. *Mut. Res.* **48**: 51-74.

Hiroi, T. and Eriksson, R.E. (1976): Influence of cellulose on the degradation of lignins by the



- white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Svensk Papperstidn.* **79**: 157-161.
- Labudova, I. and Farkas, V. (1983): Multiple enzyme forms in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. *Biohem. Biophys. Acta.* **744**: 135-140.
- Lee, J.A., Maeng, J.S., Maeng, P.J. and Rhee, Y.H. (1989): Synergistic effect of substrates on the biosynthesis of cellulase and xylanase complexes from *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 57-65.
- Lowry, O.H., Roseberough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Nelson, N. (1944): A photomeric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
- Reilly, P.J. (1981): Xylanase: Structure and function. *Basic Life Sci.* **18**: 111-129.
- Schimid, G. and Wandrey, C.H. (1987): Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase ( -glucosidase) from *Trichoderma reesei* Strain QM 9414. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 571-585.
- Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- Vogt, K. and Staffeldt, E.E. (1977): Fungal degradation of pure and mixed carbon substrates. In *Developments in Industrial Microbiology* (ed. L.A. Underkofler). American Institute of Biological Sciences. p.571-580.
- Wood, T.M. (1985): Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.* **13**: 407-410.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N. and Yaguchi, M. (1986): Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 570-576.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. (1988): Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiol. Res.* **52**: 305-317.

Accepted for Publication 7 November 1990