

## 섬유소폐기물을 이용한 사상균 FJ1의 섬유소 분해효소의 고생산

유승수 · 김경철 · 오영아 · 정선용 · 김성준\*  
전남대학교 공과대학 환경공학과

**The High Production of Cellulolytic Enzymes using Cellulosic Wastes by a Fungus, strain FJ1. Yoo, Seung-Soo, Kyoung-Cheol Kim, Young-A Oh, Seon-Yong Chung, and Seong-Jun Kim\*.** Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea - A filamentous microorganism, strain FJ1, was isolated from completely rotten wood for the production of cellulolytic enzymes. For the production of the enzymes, cellulosic wastes were used as carbon sources of strain FJ1 and rice straw showed higher enzyme activities than sawdust and pulp. The activities of CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, and avicelase were 2.95, 5.89, 0.45, and 0.12 unit/ml by use of rice straw, respectively. To enhance production of the enzymes, the mixture substrate of rice straw and cellulosic materials were investigated as carbon sources. The highest activities of CMCase,  $\beta$ -glucosidase, and avicelase were found in the mixture of rice straw (0.5%, w/v) and avicel (0.5%, w/v), and the highest xylanase was obtained at the mixture ratio of 0.71%(w/v) and 0.29%(w/v). Addition of 0.1%(w/v) peptone showed enhanced production of the cellulolytic enzymes in which the activities of CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, and avicelase were 19.23, 27.18, 1.28, and 0.53 unit/ml, respectively. The production of the enzymes using rice straw was efficiently induced in the presence of avicel and pulp containing cellulose. In particular, a medium composed of rice straw (0.5%, w/v) and pulp (0.5%, w/v) yielded larger cellulolytic enzymes: CMCase 24.3 unit/ml, xylanase 38.7 unit/ml,  $\beta$ -glucosidase 1.5 unit/ml, and avicelase 0.6 unit/ml. The filamentous microorganism, strain FJ1 utilized various cellulosic wastes as carbon sources and will be expected as a favorable candidate for biological saccharification of cellulosic wastes.

**Key words :** Cellulosic wastes, cellulases, filamentous microorganism

자연계에 다량으로 존재하는 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌이 대부분이며 이 물질들로부터 유용 화학물의 생산, 식량 및 에너지로의 재활용에 관하여 전 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다[2,9]. 그러나 이 물질들은 화학적 및 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 크며, 비수용성의 견고한 구조를 지닌 화합물이기 때문에 극히 일부만 이용되어지고 있으며, 아직도 막대한 양이 적절히 이용되지 못한 채 산화되거나 폐기물로 취급되어 버려져 자원이 낭비되고 있으며 공해현상까지도 유발시키고 있다. 섬유소를 효율적으로 이용하기 위해서는 많은 양의 섬유소 분해효소를 생산하여 가수분해 공정의 단가를 낮추어야 하며 효율적이고 낮은 비용으로 생산할 수 있어야 한다. 섬유소 분해효소 생산을 위해 상업적으로 이용 가능한 정제된 섬유소를 탄소원으로 사용하면 효소 생산성은 좋지만 비경제적이라 할 수 있다. 그러나 자연계에서 쉽게 구할 수 있는 섬유소폐기물을 이용하면 경제적으로 효소를 생산할 수 있으나

섬유소내의 리그닌 함유량 및 셀룰로오스의 결정성 지수 (crystalline index)가 높아 효소의 생산성이 떨어지는 단점이 있다[10].

섬유소 분해 효소를 생산하는 곰팡이로서는 *Trichoderma viride*[8], *Trichoderma reesei*[3], *Penicillium funiculosum*[6], *Aspergillus niger*[7] 등이 비교적 강력한 효소를 생산하고 있으며, 실질적으로 공업화할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다. 균주의 선택 및 사용기질은 생산하고자 하는 효소 및 사용목적에 따라 달라진다. 즉 효소를 생산하는 균주는 보통 엑소셀로바이오하이드로아제(exocellobiohydrolase) 및 엔도글루칸아제(endoglucanase)를 동시에 생성하기 때문에[16], 결정성 및 비용해성 물질이 많은 천연섬유소 물질을 이용하여 효소를 생산하고자 할 때에는 엑소셀로바이오하이드로아제의 활성이 높은 균주를 선택하는 것이 바람직하다.

따라서, 본 연구에서는 섬유소폐기물을 기질로 이용하는 효율적인 효소 생산 시스템을 구축하기 위하여, *T. reesei*보다 엑소셀로바이오하이드로아제, 엔도글루칸아제의 활성이 뛰어난 사상균 FJ1을 분리하였으며, 섬유소 분해효소의 생산에 있어서 탄소원과 질소원의 영향 및 섬유소 폐기물의 혼합기질을 유도물질로 사용하였을 경우의 효소 생산에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

\*Corresponding author

Tel : 82-62-530-1864, Fax : 82-62-530-0864

E-mail : seongjun@chonnam.ac.kr

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

섬유소 분해효소를 생산하는 미생물 탐색을 목적으로 완전히 썩은 나무를 채취하여 시료 5 g을 생리식염수 100 ml에 현탁시키고 그 상등액 1 ml를 단계별로 희석하여 톱밥배지에 도말하였다. 톱밥배지에서 성장하는 균주를 3~4회 계대배양을 통하여 분리하였다. 이때 사용되어진 톱밥배지는 Mandels 배지[11]의 탄소원인 avicel과 CMC를 제외시키고 톱밥을 1%(w/v) 첨가하여 조제하였다. 분리된 균주들을 Mandels 액체 배지에 접종하여 30°C, 5일간 교반배양(100 rpm)후, 상등액의 효소활성도를 분석한 후 가장 높은 효소활성을 보이는 사상균 FJ1을 선택하였다. 균주는 YMEA 배지(yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, agar 15 g, distilled water 1.0 l)에 접종하여 30°C, 3일간 배양한 후 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였으며 사상균 FJ1의 접종원은 포자 현탁액으로 조제하여 사용하였다.

### 균주의 지방산 함량분석

균주의 whole cell fatty acid 조성을 확인하기 위하여 gas chromatography(GC, HP 6890)를 사용하였다. 표준 지방산으로는 HP(Hewlett-Packard)사에서 제공하는 표준 지방산(calibration standard kit)을 사용하였으며 균주의 배양은 sabouraud's broth(Difco) 배지 50 ml를 사용하여 28°C에서 72시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양한 후 glass filter system을 통하여 배양된 균체를 획득하였다. 획득한 균체를 시험관에 취한 후 saponification을 위하여 reagent I(sodium hydroxide 45 g, methanol 150 ml, deionized distilled water 150 ml)을 1 ml 가한 후 30분간 100°C에서 중탕한 후 유수에 냉각하였다. Methylation을 위하여 reagent II(6 N hydrochloric acid 325 ml, methanol 275 ml)를 2 ml 가한 후 80°C에서 10분간 반응시키고 유수에 냉각하였다. Extraction을 위하여 reagent III(hexane 200 ml, methyl-tert butyl ether 200 ml)을 1.25 ml를 가한 후 10분간 상온에서 천천히 진탕한 후 상층액을 새로운 시험관으로 옮겼다. Washing은 reagent IV(sodium hydroxide 10.8 g, deionized distilled water 150 ml)를 3 ml 가하여 5분간 천천히 진탕하였으며 층분리를 위하여 포화 NaCl 용액 0.5 ml를 가하였다. 분리된 상등액을 취하여 분석용 시료로 하였다. 분석용 시료는 GC를 사용하여 분석 후 MIDI(Microbial ID, Inc., Newark, DE, U.S.A.)사의 균주 동정 프로그램인 sherlock을 통하여 분석하였다.

### 효소활성도 측정

CMCase와 xylanase에 대한 효소활성 측정은 각각 2%의 CMC(Sigma)용액과 2%의 xylan(Sigma)용액 0.5 ml에 배양 상등액 0.5 ml을 혼합하여 50°C에서, 30분간 반응시켜 생성

된 환원당을 DNS법으로 측정하였다[13,19]. Avicelase 활성은 1%의 avicel(Merck) 1 ml과 배양상등액 1 ml을 혼합하여 50°C에서 120분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법으로 환원당을 측정하였다[17,19]. 효소활성도 측정에 표준물질로써 glucose 및 xylose를 사용하였으며 효소 활성도는 표준반응 조건에서 1분 동안에 1 μmol의 glucose 또는 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는데 사용되는 효소량을 1 unit으로 정의하여 사용하였다. β-Glucosidase의 활성은 5 mM PNPG(p-nitrophenyl-β-D-glucoside) 1 ml와 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.8) 1.8 ml, 효소액 0.2 ml을 혼합하여 반응물을 50°C에서 30분간 반응시킨 후 0.4 M glycine buffer(pH 10.8) 4 ml를 넣어 반응을 종결시킨 다음, 이 때 생성되는 p-nitrophenol을 430 nm에서 측정하여 정량 하였다[19]. β-Glucosidase의 효소활성 단위로 위의 반응조건에서 1분 동안에 1 μmol의 p-nitrophenol을 생성하는데 사용되는 효소량으로 정의하였다.

### 효소생산을 위한 섬유소 기질

효소생산에 사용되어진 섬유소폐기물(벼짚, 톱밥, 펄프)은 증류수로 세척하여 80°C에서 24시간 건조한 후 30 mesh로 분쇄하여 사용하였다. 위의 섬유소 폐기물을 이용한 효소 생산은 Mandels 배지를 기본배지로 사용하였고, 탄소원인 CMC와 avicel 대신에 각각 섬유소폐기물을 각각 1.0%(w/v)씩 첨가하였다. 또한 CMC, avicel, xylan은 효소생산성 향상을 위해 벼짚(0.5%, w/v)과 각각의 기질(0.5%, w/v)을 혼합하여 1.0%(w/v)로 실험하였다. 이때의 최적혼합비율을 알아보기 위해서 두 기질량을 0.83:0.17%(w/v), 0.71:0.29%(w/v), 0.5:0.5%(w/v), 0.29:0.71%(w/v), 0.17:0.83%(w/v)으로 변화시켜 실험을 수행하였다. 또한 경제적인 측면에서 avicel을 대체 하기 위해 벼짚과 톱밥, 벼짚과 펄프, 톱밥과 펄프, 혼합기질(벼짚, 톱밥, 펄프)을 1.0%(w/v)로 사용하여 효소생산성을 비교하였다.

질소원의 농도가 효소 생산성에 미치는 영향을 알아보기 위해 peptone(Bacto)의 농도를 0.1, 0.25, 0.5%(w/v)로 첨가한 후 배양하였다. 조제된 각 효소생산 배지 50 ml가 함유된 500 ml baffled flask에 사상균 FJ1의 포자현탁액 1 ml를 접종하여 30°C에서 100 rpm으로 5일간 배양하였으며 배양 후 상등액을 이용하여 효소활성도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 사상균 FJ1의 특성

본 실험실에서 분리한 사상균 FJ1의 생육상태는 YMEA 배지에서 3.5일 배양시 직경이 9.0 cm 정도로 신속하게 생육하였으며, 생육하면서 청록색의 균총이 짙은 녹색으로 변하였다. 집락의 배면은 색을 나타내지 않았다. FJ1의 지방산 함량을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. FJ1의 지방산

**Table 1. Composition of fatty acids in the strain FJ1.**

Fatty acid	Content (%) in isolate FJ1
14:0	0.70
16:1 CIS (w7)	1.38
16:0	19.82
18:2 CIS 9,12/18:0a	49.69
Sum in Feature 8	28.04
18:0	0.37

**Table 2. Comparisons of strain FJ1 with *Trichoderma reesei* to the production characteristics of cellulolytic enzymes.**

Cultivation time (day)	Cellulolytic enzyme activities (unit/ml)				Reference
	CMCase	Xylanase	Avicelase	$\beta$ -glucosidase	
FJ1 <sup>a)</sup>	5	9.07	12.56	0.45	0.54
<i>T. reesei</i> <sup>a)b)</sup>	7	8.60	9.95	0.43	0.48
<i>T. reesei</i>	7	8.30	0.75	1.65	18

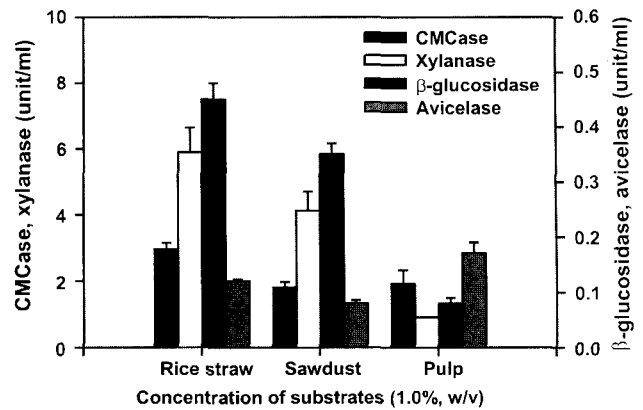
<sup>a)</sup>The cultivation of the strain were performed on Mandels medium under same condition.

<sup>b)</sup>*T. reesei* KCTC 6952 was supplied from the Korean Collection for Type Culture.

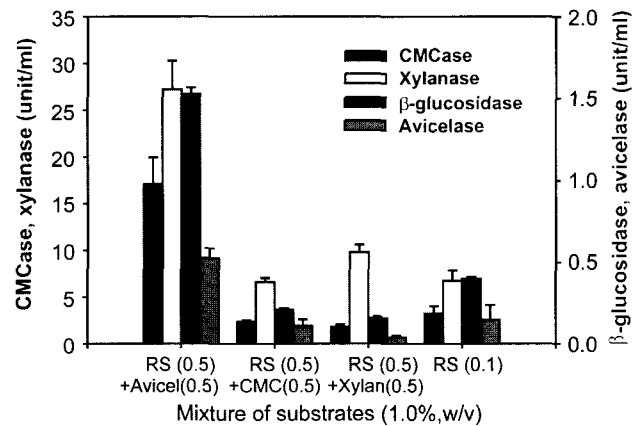
함량은 *Pithomyces* sp., *Botrytis* sp., *Myrothecium verrucaria*의 균주와 각각 70.5, 62.1, 56.7%의 상동성을 보여 본 사상균은 잠정적으로 신규의 셀룰라아제 생산균주로 평가된다. 현재 gene level의 동정실험이 진행중에 있다.

**섬유소 기질들의 영향**

사상균 FJ1은 섬유소 물질을 기질로 이용할 수 있었으며 섬유소 분해효소의 높은 생산성을 보여주었다. 특히 CMCase와 avicelase에 대해서는 높은 활성을 나타냈다. 또한, 셀룰라아제 생산으로 잘 알려진 *T. reesei*와 비교했을 때 균체의 성장속도가 빠름을 보여주었다(Table 2). 섬유소폐기물인 벚짚, 톱밥, 펄프를 탄소원으로 사용했을 때의 효소 생산특성을 검토한 결과 벚짚 사용시 CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase 활성이 각각 2.95, 5.89, 0.45, 0.12 unit/ml로 가장 높았다(Fig. 1). 섬유소폐기물을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어서 섬유소 가수분해의 정도와 그 속도는 섬유소원의 구조적 특징에 의하여 영향을 받는다[10]. 이는 섬유소가  $\beta$ -1,4 글루코시드 결합을 하고 있는 선형고분자인 글루칸으로서, 셀룰로오스 사슬 사이의 수소결합에 의해 fibril을 구성하며, 수소결합의 규칙성정도에 따라 결정성과 비결정성으로 나뉘어지고, 이 중 결정부위는 비결정부위보다 분해가 더 어렵다[1]. 따라서 대부분 결정성 구조로 이루어진 섬유소 폐기물을 단독 기질로 사용하였을 경우 Mandels 배지에서 얻어진 효소활성도 보다 2~3배 정도 낮게 나타났다.



**Fig. 1. Effects of various cellulosic wastes on the cellulases production in the liquid culture (30°C, 100rpm, 5days). The bars means  $\pm$  standard deviation.**



**Fig. 2. Effects of the mixture substrates of rice straw and commercial cellulosic materials on the cellulases production in the liquid culture (30°C, 100rpm, 5days). The bars means  $\pm$  standard deviation and RS indicates rice straw.**

**혼합탄소원의 영향**

Wheat bran과 미세 결정성물질인 avicel의 혼합이 CMCase의 생산에 유리하다는 Marinova 등[12]의 보고에 따라 효소생산성을 높이기 위해서 천연 섬유소 물질인 벚짚과 상업용 섬유소물질인 CMC, avicel, xylan을 혼합하여 기질로 사용하였다. 벚짚과 avicel의 혼합 배양은 벚짚과 CMC, 벚짚과 xylan의 배양보다 효소생산성이 높았으며, 이 때의 CMCase 및 avicelase는 벚짚을 단독으로 사용했을 때 보다 각각 5.3, 3.5 배의 높은 활성을 나타냈다(Fig. 2). 이는 두 기질을 혼합배양 시켰을 때 기질간의 상호작용, 즉 수용성 기질은 균체 탄소원으로 작용하고 결정성인 비수용성 기질은 2차 대사에 생성되는 셀룰라아제의 분비를 촉진시키는 유도제로 작용한 것으로 사료된다[4,15].

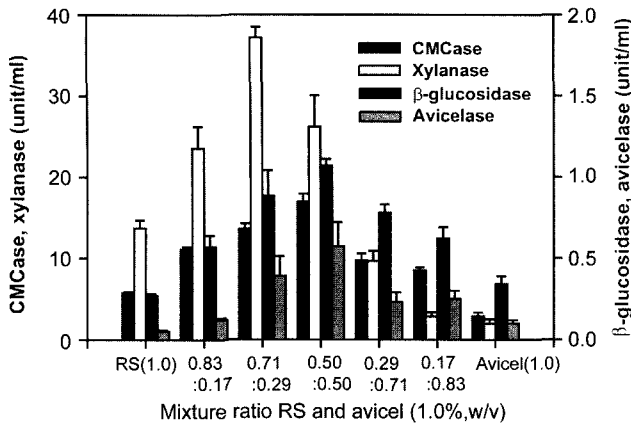


Fig. 3. Effects of mixture ratio of rice straw and avicel on the cellulases production in the liquid culture (30°C, 100rpm, 5days). The bars means  $\pm$  standard deviation and RS indicates rice straw.

탄소원의 혼합비율의 영향

사상균 FJ1의 섬유소 분해효소 생산성에 대한 탄소원의 혼합비율의 영향을 살펴보기 위해, 볏짚과 avicel을 각각의 혼합비율로 변화시켜 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 효소 생산에 관한 기질간의 최적혼합비율은 볏짚과 avicel를 0.5:0.5%(w/v)으로 혼합한 것에서 가장 높은 효소활성을 나타냈고, 그때의 CMCCase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase 활성은 16.89, 1.07, 0.57 unit/ml이었다. Xylanase는 0.71:0.29%(w/v)에서 37.15 unit/ml로 최대의 효소활성도를 나타내었다(Fig. 3). CMCCase는 섬유소 폐기물을 이용한 Yu 등[21]의 결과보다 1.8배의 좋은 효소활성도를 나타냈다. 볏짚과 avicel의 두 기질을 이용한 효소의 생산은 두 기질간의 혼합 비율이 효소 생산에 큰 영향을 미치고 있음을 나타내었다. Nam 등 [14]의 보고에 의하면 탄소원의 혼합비율에서 solka floc(미세결정성 셀룰로오스) 농도가 3% 이상일 경우 효소의 생산이 저해된다고 하였는데, 본 실험에서도 avicel의 혼합비율이 증가함에 따라 오히려 효소생산이 저해되었으며 이는 사상균 FJ1의 효소생산에 있어서 볏짚과 avicel의 최적 혼합비율이 존재함을 알 수 있었다. 또한 xylanase는 볏짚의 비율이 높을 때 유리함을 보여주는데, 이는 Ryu 등[15]의 보고에서 볏짚내에 많이 함유되어 있는 헤미셀룰로오스와 관련이 있으며, 그 성분이 xylanase 유도에 효율적으로 작용한 것으로 보인다.

질소원의 영향

유기 질소원이 섬유소 분해효소 생산성에 미치는 영향을 알아보기 위해 peptone의 농도를 변화시켜 효소의 생산성을 검토하였다(Fig. 4). 섬유소폐기물을 이용한 효소 생산에 관한 최적의 peptone 농도는 0.1% 이었다. 또한 Ryu 등[15]의 보고에 의하면, 섬유소 분해 효소 생산에 있어 peptone은 배

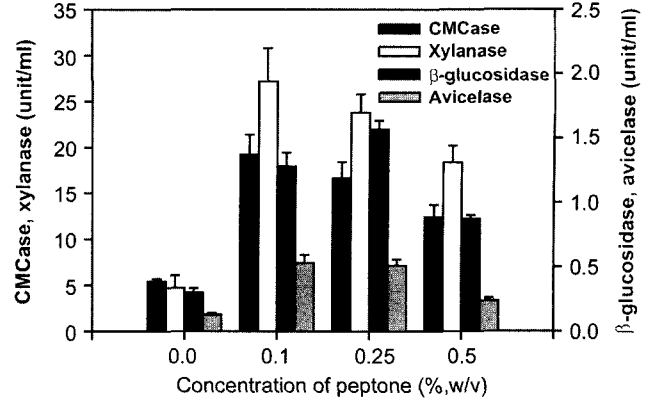


Fig. 4. Comparisons of the productivities of cellulolytic enzymes according to the concentration of peptone in the liquid cultures (30°C, 100rpm, 5days). The bars means  $\pm$  standard deviation.

양동안 pH의 변화에 영향을 미친다고 하였는데 본 실험에서 peptone의 농도가 0.1% 일 때 5일 배양후의 pH는 5.5이였으며, 효소 생산성에 큰 영향은 미치지 않은 것으로 나타났다.

섬유소기질 혼합비의 영향

탄소원으로서 상업용 섬유소 기질인 avicel 및 CMC를 대체할 수 있는 섬유소폐기물 중 볏짚, 톱밥, 펄프만으로 배양하였을 경우 볏짚에서 가장 좋은 효소활성을 나타냈다. 또한 높은 효소생산을 유도하기 위하여 상업용 섬유소 물질과의 혼합배양에서 avicel이 최적의 기질이었으나 이는 경제적인 효소생산을 위해서는 적합하지 않았다. 그래서 경제적으로 섬유소 분해효소를 생산하기 위해 볏짚과 톱밥, 볏짚과 펄프, 톱밥과 펄프, 및 이들을 혼합(볶짚+톱밥+펄프)한 혼합농도 1%(w/v)에서 효소생산성을 비교하였다(Fig. 5). 그 결과 볏짚과 펄프를 사용하였을 때 섬유소 분해효소의 활성도

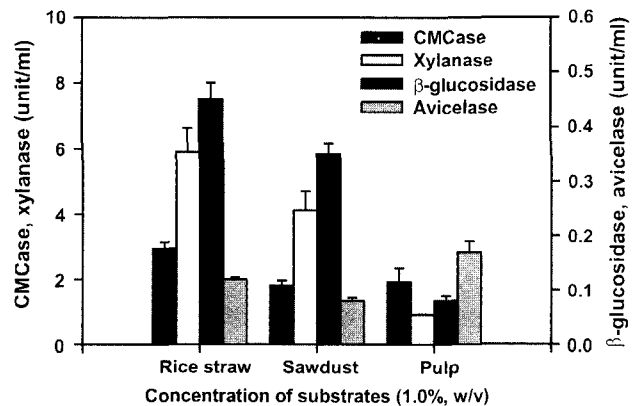


Fig. 5. Comparisons of the cellulases production according to the mixture conditions of cellulose wastes in the liquid cultures (30°C, 100rpm, 5days). The bars means  $\pm$  standard deviation. RS, SD, and MS indicate rice straw, sawdust, and mixture substrate (RS+SD+Pulp), respectively.

가 높았다. 이때의 CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase는 각각 24.3, 38.7, 1.5, 0.6 unit/ml로서 볏짚과 avicel의 혼합 기질보다 xylanase 활성도는 1.4배 높게 나타났다. 이는 상대적으로 셀룰로오스의 함량이 높은 펄프를 사용함으로써, avicel을 대체할 수 있음을 보여주고 있다[5,20]. 이는 사상균 FJ1은 헤미셀룰로오스의 함량이 높은 물질과 셀룰로오스 함량이 높은 섬유소폐기물을 이용한다면 섬유소 분해 효소 생산에 경제적인 측면에서 매우 의미가 있다고 생각한다.

## 요 약

섬유소 폐기물의 생물학적 당화를 위해 분리한 사상균 FJ1은 섬유소 분해효소의 생산성이 뛰어난 신규의 유망한 셀룰라아제 생산균주로 잠정적으로 평가되었다. 사상균 FJ1의 셀룰라아제 생산을 위한 배지조성은, 질소원으로 0.1% peptone을 사용하였을 경우와, avicel 및 섬유소 폐기물인 볏짚을 혼합하여 사용한 경우 높은 효소생산성을 나타냈다. 경제적인 효소생산을 위한 기질로 섬유소 폐기물의 농도와 혼합비는 1%(w/v)농도에서 볏짚과 펄프를 각각 0.5%(w/v)와 0.5%(w/v)으로 사용하였을 경우 CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase의 효소 활성은 각각 24.3, 38.7, 1.5, 0.6 unit/ml 이었다. 이러한 효소생산성은 섬유소 폐기물의 생물학적 당화기술에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00350) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## REFERENCES

- Bhat, M. K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* **15**: 583-620.
- Busto, M. D. and N. Ortega. 1996. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* culture. *Bioresource Technol.* **57**: 187-192.
- Domingues, F. C., J. A. Queiroz, J. M. Cabral, and S. L. P. Fonseca. 2000. Influence of culture condition on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 394-401.
- Gerard, J. K., J. Y. Zou, D. Christina, J. D. Gideon, S. Irmgard, S. Jerry, R. Tapani, S. Malee, T. T. Tuula, and J. Alwyn. 1997. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *J. Mol. Biol.* **272**: 383-397.
- Halliwell, G., T. M. Phillips, and N. Halliwell. 1995. Microcrystalline forms of cellulose as substrates for strains of *Clostridium thermocellum* and cellulase formation. *Process Biochem.* **30**: 243-250.
- Kang, S. C. and M. C. Choi. 1999. Solid culture of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 1-7.
- Kang, S. W., S. W. Kim, and K. Kim. 1994. Production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* KKS. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 49-55.
- Kim, D. W., Y. K. Hong, Y. H. Jang, and J. K. Lee. 1998. Adsorption characteristics of endo I and exo II purified from cellulase by *Trichoderma viride* on cellulose with different crystallinity. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**: 162-167.
- Krishna, S. H. and K. C. Sekhar Rao. 2000. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-414. *Bioprocess Eng.* **22**: 467-470.
- Lee, K. J. 1976. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Kor. J. Pharmacog.* **7**: 85-93.
- Mandels, M. and J. Weber. 1969. Cellulase Production by *Trichoderma reesei*. *J. Adv. Chem. Ser.* **95**: 391-414.
- Marinova, D., A. Atev, and K. Markov. 1989. Biosynthesis of hydrolase enzyme from *Trichoderma* sp. strain 94. *Dokl. Akad. Nauk.* **42**: 111-114.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Nam, J. H., Y. M. Koo, and H. S. Yun. 1998. Effect of mixed carbon source on the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Kor. J. Mycology.* **26**: 239-245.
- Ryu, D. D. Y. and M. Mandels. 1980. Cellulases: biosynthesis and application. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 91-102.
- Setala, T. N. and M. Penttila. 1995. Production of *Trichoderma reesei* cellulase on glucose-containing media. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3650-3655.
- Somogyi, M. 1952. Notes in sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- Son, U. J., O. K. Sul, D. K. Chung, I. S. Han, Y. J. Choi, and C. S. Jeong. 1997. Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C-4 producing cellulase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 346-353.
- Thomas, M. W. and K. M. Bhat. 1988. Methods for measuring cellulase activities. *Method. Enzymol.* **160**: 87-112.
- Vlasenko, E. Y., H. Ding, J. M. Labavitch, and S. P. Shoemaker. 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresource Technol.* **59**: 109-119.
- Yu, X. B., J. H. Nam, H. S. Yun, and Y. M. Koo. 1988. Optimization of cellulase production in batch fermentation by *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **3**: 44-47.

(Received Mar. 20, 2002 / Accepted June 9, 2002)