

고온성 변이균주 *Talaromyces luteus* 2004의 분리와 Carboxymethylcellulase의 생성 조절 및 효소의 특성

홍미경 · 한효영 · 정영희 · 민경희*
숙명여자대학교 생물학과

Isolation of a Thermophilic Mutant, *Talaromyces luteus* 2004 in relation to the Regulation of Carboxymethylcellulase Production and Enzymatic characteristics

Mi-Kyung Hong, Hyo-Young Han, Young-Hee Jung and Kyung-Hee Min*
Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT: *Talaromyces luteus* 2004, a thermophilic mutant of *T. luteus* 6112 was obtained by mutagenesis with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *T. luteus* 2004 produced thermophilic carboxymethylcellulase (CMCase), and other polysaccharide enzymes: avicellase, xylanase, and β -glucosidase. Induction of CMCase production was shown at the highest level in 3% carboxymethylcellulose (CMC) minimal broth, indicating that CMC could work as an inducer. However, glucose and D-cellobiose showed catabolite repression for CMCase production which was under the control of CMC utilization. Optimal conditions for CMCase activity were at 70°C and pH 4.0, suggesting that CMCase of *T. luteus* 2004 was a thermophilic enzyme.

KEYWORDS: Carboxymethylcellulase (CMCase), *Talaromyces luteus*, Extracellular enzyme, D-cellobiose.

섬유소 분해효소를 이용한 생물학적 가수분해 방법은 화학적 방법에 비해 많은 장점을 가지고 있으나 상온에서는 반응속도가 늦고 분해율이 매우 낮으므로(Wilkie, 1979), 고온에서 활성을 갖는 섬유소 가수분해 효소들을 생산하는 균주를 개발하여 산업적으로 활용하기 위한 연구가 시도되어 왔다(Parriche 등, 1988; Jain과 Tiraby, 1987).

Trichoderma 속을 비롯한 각종 곰팡이류가 섬유소 분해 효소를 생성하는 것으로 보고되었다. 한편, 대체에너지자원의 실용적인 면에서는 *Trichoderma viride*(Nisizawa 등, 1972), *Trichoderma koningii*(Wood, 1968), *Sporotrichum pulverulentum*(Eriksson 등, 1975), *Aspergillus* sp.(Murao 등, 1979), *Penicillium* sp.(Rose, 1980) 등에서의 고온성 섬유소 분해효소에 대한 연구가 더욱 활발히 진행되고 있다.

섬유소분해효소는 exoglucanase(β -1,4-glucanocellobiohydrolase), endoglucanase(β -1,4-glucanglucanohydrolase), β -glucosidase (cellobiase)로 구성되어 있으며, 각 효소는 서로 다른 몇 개 소단위 성분의 작용으로 섬유소 분해 기능을 가진 복합 효소로 알려졌다(Tanaka 등, 1977; Eriksson 등, 1975; Nisizawa 등, 1972; Shibata 등, 1969; Wood, 1971).

Parriche 등(1988)과 Durand와 Clanet(1987)는 기존 균주들 보다 열에 더욱 안정한 다당류 가수분해효소들의 활성을 갖는 고온성 *Talaromyces* sp. CL240를 분리하였다. 그들은 바이오에너지 생산과정에서 섬유소나 조전분 등의 다당류를 당화하여 산업적으로 활용할 수 있는 돌연변이균주를 개발하였다. 이 균주 선별 방법은 야생형 곰팡이 *Talaromyces* sp.에 ethylmethanesulfonate (EMS), HNO₃, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG), UV 등을 사용하여 고온성 돌연

*Corresponding author

변이를 유발하였으며, 돌연변이주의 선별은 생성되는 고온성 다당류 가수분해효소의 내열성을 기준으로 하였다.

따라서, 본 연구에서는 *Talaromyces luteus*로부터 고온성 carboxymethylcellulase(CMCase)를 생산하는 돌연변이 균주를 선별하고 그 균주로부터 효소생성의 최적 배양조건을 규명하여 바이오에너지를 생산을 위한 고온성 효소의 기초 자료로 삼고자 하였다. 본 연구실에서 최근에 토양으로부터 1차 분리한 수천 균주에 돌연변이원으로 NTG를 처리하여 고온성 곰팡이 중에서 다당류 가수분해효소의 생성력이 높은 *T. luteus*를 분리하였다. 이 균주에서 2차적으로 고온성의 돌연변이주를 선별하였고, 그 균주가 생산하는 고온성 CMCase의 특성과 생성관계, 그리고 기질의 농도에 따른 고온성 CMCase의 생성 조건과 생성된 효소의 생화학적 특성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에 사용한 균주는 본 연구실에서 최근에 토양으로부터 1차 분리한 고온성 곰팡이 중에서 다당류 가수분해 효소의 생성력이 높은 *Talaromyces luteus* 6112를 모균주로 사용하였다. 야생형 균주인 *T. luteus* 6112와 선별된 고온성 균주인 *T. luteus* 2004를 potato dextrose agar(Difco) 사면배지에 이식, 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 4°C에 보관하였으며, 증식배지로는 malt extract agar를 사용하였다.

섬유소 분해효소 생산을 위한 배양은 CMC를 첨가한 Mandels(1962)의 배지를 다소 변형한 CMC 액체배지를 사용하였으며 조성은 다음과 같다: NaNO₃ 3g, KH₂PO₄ 1g, KCl 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, wheat bran extract 10%, CMC 20g. 조효소 용액을 만들기 위하여 CMC 액체배지를 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml 씩 넣고 121°C, 15분간 가압 멸균한 후, 50°C에서 배양한 *T. luteus* 2004의 포자를 채취하여 전 배양한 다음 주 배양은 42°C에서 48시간 진탕배양(200 rpm) 하였다.

돌연변이의 유발에 의한 고온성 균주의 선별

Tris-maleic acid buffer(0.05M, pH 6.0)로 조제한 포자현탁액 4.5 ml(2×10^7 spores/ml)과 같은 완충액에 용해한 0.2% NTG 용액 0.5 ml를 섞어 최종농도가 200 µg/ml 되게 한 후, 30°C에서 30분간 처리, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체 침전물을 pH 7.0의 10 mM potassium phosphate buffer로 2번 세척한 후, 동일한 완충액에 현탁, 0.1 ml를 PDA에 접종, 50°C에서 배양하였다. 형성된 콜로니를 potato dextrose 액체배지에 접종하여, 50°C에서 4~5일간 200 rpm으로 진탕배양한 후 효소 활성을 측정, 모균주와 비교하여 고온성 돌연변이주를 선별하였다.

균주배양 조건

효소활성 측정을 위한 균주배양의 최적 pH와 최적온도 조건을 규명하기 위하여 CMC 액체배지를 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml 씩 넣고 121°C, 15분간 가압 멸균한 후, 50°C에서 배양한 *T. luteus* 6112와 *T. luteus* 2004 균주들의 포자를 채취하여 여러 온도조건(30~80°C)과 pH 2.5~4.5에서 48시간 진탕배양(200 rpm) 하였다.

효소활성 측정

모균주 *T. luteus* 6112와 돌연변이균주 *T. luteus* 2004는 액체배양액(pH 4.0)에 접종하여 각각 50°C와 70°C에서 48시간 200 rpm으로 진탕배양하였다.

세포의 조효소 용액은 액체 배양한 배양액을 6000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 사용하였다. 세포내 조효소 용액은 액체 배양에서 얻어진 균체를 10 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 5 mM MgCl₂를 첨가한 완충액에 현탁하고, sonic dismembrator 300(Fisher)로 파쇄한 다음, 원심분리하여 얻은 상등액으로 하였다.

Carboxymethylcellulase(CMCase) 활성의 측정은 0.05M citrate buffer(pH 5.0)에 용해시킨 1% CMC 용액 0.5 ml에 조효소 용액 0.5 ml를 가하여 50°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, din-trosalicylic acid(DNS) 용액 3 ml를 가하여 500 nm에서의 흡광도를 측정하여 유리된 환원당을 조

사하였다. 이 효소의 활성도 1 unit는 1분 동안 최종 분해 산물인 포도당 1 mg을 생성하는 효소의 양으로 정하였다(Wood, 1968). Avicellase, xylanase, filter paper degradation activity (Fpase)의 효소 활성은 기질로서 avicel, xylan, filter paper를 사용하였으며, 효소 활성 측정방법은 CMCase의 활성 측정방법과 동일하게 하였다.

β -Glucosidase의 측정은 *p*-nitrophenyl- β -D-glucose(PNPG) 기질용액 0.2 ml와 효소용액 1.0 ml를 혼합하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후 유리된 *p*-nitrophenol(PNP)를 420 nm의 파장에서 흡광도로 측정하였다. β -Glucosidase의 활성도 1 unit는 1 ml당 1 mg의 PNP가 유리되는 효소의 양으로 정하였다(Wood, 1968).

단백질 정량

단백질의 정량은 Folin-phenol 방법에 따라 bovine serum albumin을 사용하여 표준곡선을 만들어 정량하였다(Lowry 등, 1951).

탄소원과 질소원에 의한 효소생성의 조절

T. luteus 2004의 CMCase 생성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위해서는 CMC 최소배지에 0.1%, 0.5%, 1.0%의 cellobiose를 각각 첨가하거나 CMC 최소배지에서 1일간 배양한 후 0.1%, 0.5%, 1.0%의 포도당과 cellobiose를 각각 첨가한 후 세포외로 분비되는 효소를 채취하여 CMCase의 활성을 측정하여 비교 조사하였다.

질소원의 영향을 알아 보기 위해서는 NaNO₃ 3 g, KH₂PO₄ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g를 포함하는 기본 배지에 유기 질소원으로 yeast extract와 peptone, 무기 질소원으로 NaNO₃와 (NH₄)₂SO₄를 첨가하고 효소 생성을 측정하였다.

결 과

고온성 돌연 변이주의 선별

본 연구에서는 고온성 가수분해 효소를 생산하는 돌연변이 균주를 Parriche 등(1988)의 선별 방법에 따라 *T. luteus* 6112를 모균주로 하여 돌연변이원

Table 1. Effect of NTG treatment time on survival rate of *T. luteus* 6112

Treatment time (min.)	Survival spore number (x10 ⁴ cells/ml)	Survival rate (%)
0	900	100.0
10	600	67.0
20	200	22.0
30	140	16.0
50	30	3.0
60	18	2.0
90	14	1.6

Table 2. Enzyme activities of CMCCase, avicellase, xylanase, activity of filter paper degradation, and β -glucosidase from *Talaromyces luteus* 2004 on minimal broth media for 2 days' cultivation at 42°C

Enzyme	Extracellular activity (unit)	Membrane-bound activity (unit)
CMCase	7.2	2.0
Avicellase	11.7	4.2
Xylanase	23.3	5.5
Fpase	7.2	1.0
β -Glucosidase	0.0	0.1

*One unit of carboxymethylcellulase (CMCase), avicellase, xylanase, and degradation activity of filter paper (Fpase) represents the amount of enzyme producing 1 mg of glucose per minute. One unit of β -glucosidase represents the amount of enzyme producing 1 mg of *p*-nitrophenol (PNP) per minute.

으로 NTG를 처리한 결과, NTG 처리 후의 생존율은 Table 1에서 보여 주는 바와 같이 10분간의 처리에서 67.0%의 생존율을 나타내었으나 90분 처리에서는 1.6%로 감소하였다. 본 연구에서는 변이주 유도 조건으로 NTG를 10분간 처리하여 생존한 세포를 고온에서 배양하여 고온성인 돌연변이주 *T. luteus* 2004를 선별하여 고온성 섬유소 분해효소의 생산 및 그 특성을 조사하였다.

Talaromyces luteus 2004에 의한 고온성 섬유소 분해효소들의 분비

고온성 돌연변이주 *T. luteus* 2004를 CMC 최소배지에서 배양하여 조효소를 얻어 CMCase, avicellase, xylanase, Fpase, β -glucosidase 등의 활성을 조사하였다. Table 2의 결과를 보면 CMCase, avicellase, xylanase, Fpase 등에서는 세포의 효소의 활성이 세포내 효소의 활성보다 큰 것으로 보아 이들은 세포 밖으로 분비되는 효소들임을 알 수 있었으며, β -glucosidase는 세포를 파쇄한 상등액에서 최대값을 나타낸 것으로 보아 세포내 효소인 것으로 확인되었다.

Talaromyces luteus 2004에 의한 CMCase 생성의 조절

T. luteus 2004로부터의 효소의 생성을 조사하기 위해 탄소원으로 CMC를 첨가한 최소 액체배지에 균주를 배양하였다. 여러가지 농도의 CMC를 기질로 사용한 경우 *T. luteus* 2004 균주의 세포외 CMCase의 생성은 3% CMC 최소배지에서 3일간 배양하였을 경우에 가장 높게 나타났다(Fig. 1).

탄소원의 영향 당에 의하여 세포외 CMCase의 생성이 촉진되는지 또는 억제되는지를 검토하기 위하여 CMC 최소배지에 0.1, 0.5, 1%의 cellobiose

를 각각 첨가하고 *T. luteus* 2004의 CMCase 생성을 조사 비교하였다. 세포외 CMCase의 생성은 cellobiose가 첨가되지 않은 2% CMC 배지에서 3일간 배양하였을 경우 가장 높게 나타났으며, 이 결과로 cellobiose가 첨가되지 않은 CMC가 CMCase 생성에 효과적임을 알 수 있었다(Fig. 2).

또한, 탄소원에 의한 CMCase의 생성을 조사하기 위하여 CMC 최소배지에서 1일간 배양한 후 포도당과 cellobiose를 각각 0.1, 0.5, 1.0% 농도로 첨가하여 CMCase 생성의 영향을 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 0.5% CMC 최소배지에서 배양한 경우에 CMCase 생성이 가장 높게 나타났다. 그러나, 여러 농도의 포도당이나 cellobiose를 첨가한 경우 CMCase의 생성은 상대적으로 저조하게 나타났으며 이 결과로 보아 포도당이나 cellobiose는 CMCase 생성에 억제 효과를 보여 주는 것으로 추정된다.

질소원의 영향 기본배지에 유기질소원과 무기질소원을 첨가하여 CMCase 생성에 미치는 질소원의 영향을 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 균의 성장과 효소의 생성은 0.2% 효모 추출액을 사용한 배양액에서 세포의 섬유소 분해효소가 많이 생성되었다. 따라서 균의 성장과 효소의 생성은 유기

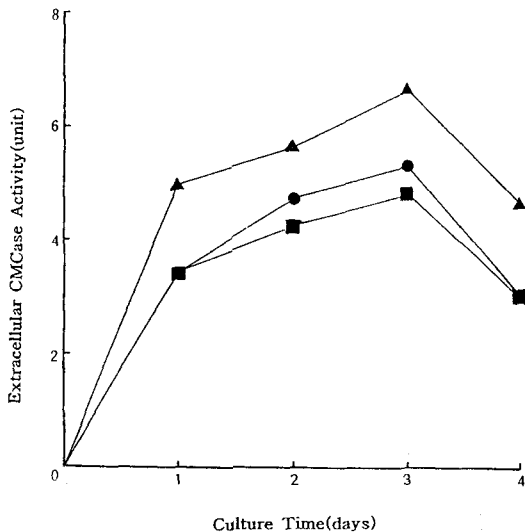


Fig. 1. Time course of extracellular CMCase production by *T. luteus* 2004 in the minimal broth in the presence of various concentrations of CMC (■: 0.1%, □: 0.5%, ●: 1.0%, ○: 2.0%, ▲: 3.0%).

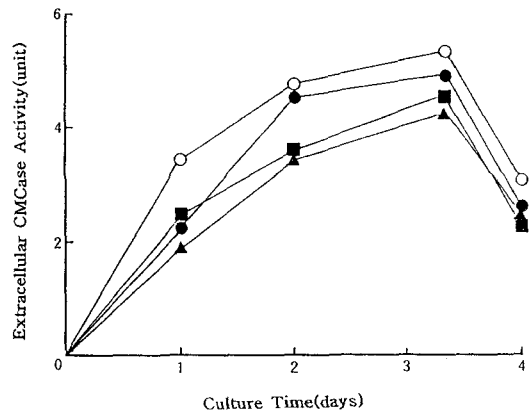


Fig. 2. Time course of extracellular CMCase production by *T. luteus* 2004 in 2% CMC minimal broth (○) supplemented with various concentrations of D-cellobiose (●: CMC+0.1% D-cellobiose, ■: CMC+0.5% D-cellobiose, ▲: CMC+1.0% D-cellobiose).

Table 3. Effect of various nitrogen sources and yeast extract on the growth of cells, and production of extracellular CMCase from *Talaromyces luteus* 2004

Nitrogen sources (0.2%)	Growth (wet weight, g/l)	CMCase (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
NaNO ₃	0.01	1.16	5.04	0.23
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.01	2.97	4.95	0.60
Peptone	0.01	2.61	6.21	0.42
Yeast extract	0.03	8.48	8.74	0.97

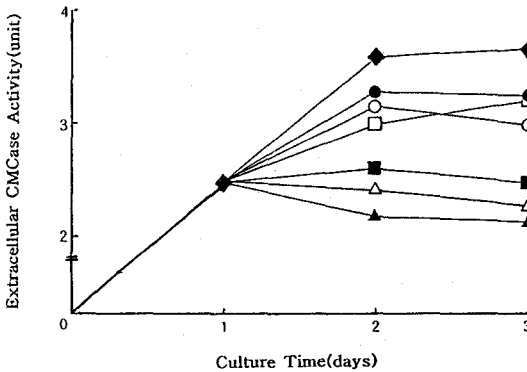


Fig. 3. Production of extracellular CMCase by *T. luteus* 2004 after 1 days's cultivation in 0.5% CMC minimal broth (◆) supplemented with glucose (●: 0.1%, ■: 0.5%, ▲: 1.0%) and D-cellobiose (○: 0.1%, □: 0.5%, △: 1.0%).

질소원이 무기질소원을 사용한 경우보다 높았음을 알 수 있었다.

Extracellular CMCase의 특성

세포의 섬유소 분해효소의 온도에 대한 안정성을 규명한 바 모균주 *T. luteus* 6112의 섬유소 분해효소의 활성은 50°C에서 안정성을 보여주었으나, 돌연변이주 *T. luteus* 2004의 섬유소 분해효소의 열 안정성은 70°C로 중온성 균주들로부터 생성되는 효소들보다 열에 더욱 안정되게 나타났다(Fig. 4).

또한 *T. luteus*의 세포의 섬유소 분해효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 Fig. 5에서 보여 주는 바와 같이 세포의 섬유소 분해효소의 활

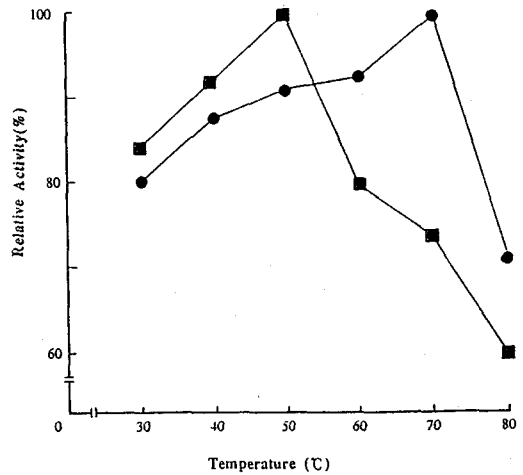


Fig. 4. Relative activity of extracellular CMCase from *T. luteus* 2004 (●) and *T. luteus* 6112 (■).

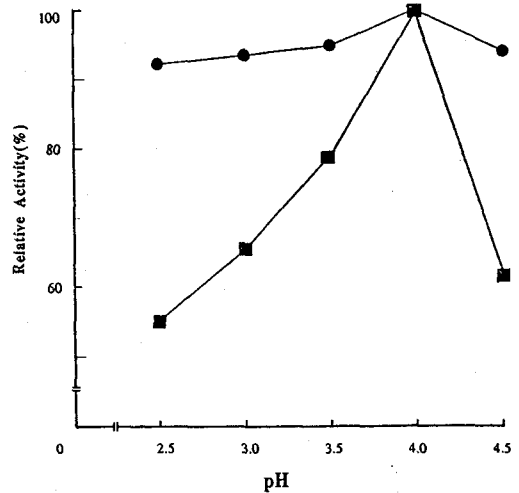


Fig. 5. Effect of pH on the activity of extracellular CMCase from *T. luteus* 2004 (●) and *T. luteus* 6112 (■).

성은 pH 4.0에서 가장 높게 나타났다. *T. luteus* 2004는 pH 2.5부터 pH 4.5까지 완만한 곡선을 보여 주었으나 pH 4에서 최대치를 보였으며 *T. luteus* 6112는 pH 4에서 가장 높았다. 그러므로 모균주 *T. luteus* 6112와 내열성 균주 *T. luteus* 2004의 섬유소 분해효소의 최적 pH는 4.0이었음을 알 수 있었다.

고 찰

Parriche 등(1988)과 Durand와 Clanet(1987)은 *Talaromyces* sp.에 EMS, HNO₂, NTG, UV 등을 돌연변이 유발원으로 사용하여 산업에 응용할 수 있는 고온성 돌연변이주 *T. sp. CL240*를 개발하여 섬유소 분해효소인 CMCase, avicellase, xylanase, Fpase, β -glucosidase 등을 분리해냈으며 양적으로는 야생 균주의 3~5배의 생산성을 보여주었다. 효소의 생산성은 섬유소와 밀기울을 혼합하여 사용하였을 때 가장 높게 나타났으며, 이 결과는 에탄올 생산 등의 저급 발효과정에 사용하는 저가 포도당 생산에 섬유소나 밀기울을 이용할 수 있음을 시사해 주었다.

Rho 등(1982)의 연구에서 *Talaromyces* sp.는 cellulose, lactose, sepharose에 의해서 섬유소 분해 효소의 생성이 유도되며 *Schizophyllum commune*의 경우는 효과적인 inducer로 thiocellobiose가 쓰여져 0.5 mM에서 최대의 활성을 나타내었다. 그 외의 inducer로는 CMC, cellobiose, xylan이 쓰여져 1 mM 또는 1%에서 최고의 활성을 나타내었다. McHale 등(1987)의 연구에서는 *T. emersonii* CBS814.70과 돌연변이주 UV7를 배양하는 배지에 섬유소 외에도 lactose를 inducer로 사용하였는데, 이로서 효소의 섬유소에의 흡착, 그에 따른 대사과정 진전의 방해 등의 문제점들이 해소되었다. Fig. 2의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 본 연구에서도 CMC에 의한 CMCase 생성 유도 효과가 나타났음을 알 수 있었다.

미생물에서 당분해 효소의 합성은 여러가지 종류의 당에 의하여 억제되는 경우가 있는데 Fig. 2의 결과에서 cellobiose는 CMC 분해 대사물이므로 CMCase의 생성을 억제하는 것으로 사료된다. Nisizawa 등(1972)은 *Trichoderma viride*의 CMCase 생성에 있어서 포도당 혹은 다른 분해산물이 배양액에 첨가되었을 경우 catabolite 억제현상이 나타난다고 하였다. 본 연구의 결과(Fig. 3)에서도 포도당이나 cellobiose가 여러 농도로 배지에 첨가되었을 때 CMCase의 생성이 저하되는 것으로 catabolite 억제 현상을 확인하였다.

Jain과 Tiraby(1987)의 연구에서는 고온성 균주 *Talaromyces* sp. CL240을 분리하여 종이펄프와

밀기울이 혼합된 배지에 배양하여 여러 종류의 다당류 분해효소를 생산하였다. 각 효소들의 열에 대한 안정성을 보았을 때 고온성 돌연변이주의 효소 활성은 65°C의 배양 조건에서 야생 균주에 대한 상대적 활성이 더욱 높았다. 본 연구에서 분리한 *T. luteus* 2004의 섬유소 분해 효소의 안정성은 70°C이었으며 모균주인 *T. luteus* 6112의 섬유소 분해 효소의 열 안정성은 50°C인 점으로 보아(Fig. 4) *T. luteus* 2004가 분비하는 섬유소 분해 효소는 고온성 효소임을 알 수 있었다.

Durand와 Clanet(1987)의 연구에서는 개발된 고온성 균주 *Talaromyces* sp. CL240를 적정 조건에서 배양하여 70°C의 고온에서 안정성을 갖는 다량의 섬유소 분해효소를 생산하였다. 그들은 섬유소 분해 효소의 생산가를 낮추어서 에탄올 생산 등의 저급 발효산업의 원료인 저가 원당생산에 기여코자 하였다. Wood와 Wilson(1987)의 연구에서도 섬유소 분해효소를 사용하여 목재와 농업 폐기물을 분해하여 생성된 단당류를 분리하여 pentose-fermenting yeast에 의한 에탄올 발효 공정에 응용코자 하였다.

지구상에 풍부한 섬유성 물질을 자원화하기 위해서는 포도당 등의 저분자 물질로 분해하는 당화 과정에 쓰이는 섬유소 분해효소의 생산가를 낮추는 것이 중요한 과제이다. 본 연구에서 개발한 *T. luteus* 2004는 고온성 섬유소 분해효소를 생성하는 것으로 확인되었으며 섬유소를 분해하여 포도당을 생산하는 바이오 에너지 생성의 당화과정에 활용이 가능한 균주로 사료된다. 앞으로의 연구 방향은 고농도의 여러 종류의 당을 탄소원으로 하였을 경우에도 섬유소 분해 효소의 생성이 억제되지 않으며, inducer를 필요로 하지 않고 계속적으로 발현하는 돌연 변이주를 개발하여 섬유소 분해효소의 생산가를 낮추어 천연 섬유소 자원이나 용해성 당 등을 발효 공정에 사용하고저 하는 것이다.

적 요

Talaromyces luteus 6112 균주에 돌연변이원 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 처리하여 고온성 돌연변이주인 *T. luteus* 2004를 선별하였다. *T. luteus* 2004 균주는 고온성 섬유소 분해

효소인 carboxymethylcellulase(CMCase)와 그 외의 다당류 분해효소인 avicellase, xylanase, β -glucosidase 등을 생성하였다. 고온성 섬유소 분해효소의 생성은 3% carboxymethylcellulose (CMC) 최소배지에서 가장 높게 유도되었으므로 CMC가 CMCase 생성의 유도물질임을 알 수 있었다. 고온성 섬유소분해효소의 생성에 있어서 포도당과 D-cellobiose는 CMCase 생성에 catabolite repressor 로 작용함을 보여 주었다. *T. luteus* 2004의 섬유소 분해효소의 효소학적 특성은 70°C, pH 4에서 최고의 활성을 보여주는 고온성 효소이므로 대체에너지 개발에 활용 가능한 균주로 사료된다.

참고문헌

- Beguin, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo red-stained agar replicas. *Anal. Biochem.* **131**: 333-336.
- Chang, W.T.H. and Thayer, D.W. 1981. The cellulase system of *Cytophage* sp. *Can. J. Microbiol.* **27**: 1260-1266.
- Cowling, E.B. 1975. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotech. Bioeng. Symp.* **5**: 163.
- Durand, H. and Clanet, M. 1987. Study of polysaccharolytic enzymes produced by a new thermophilic fungus, *Talaromyces* sp. CL240. *in Proc. E.C. Conference Biomass for Energy and Industry*: 722-726.
- Erikson, K.E. and Petterson, B. 1975. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichium pulverulentum* (*Chrysosporium lingorum*) for the breakdown of cellulase. *Eur. J. Biochem.* **51**: 213-218.
- Ikeda, R., Yamamoto, T. and Funatzu, M. 1967. Purification and some properties of cellulase from *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.* **31**: 1201-1209.
- Jain, S. and Tiraby, G. 1987. Biochemical and genetical analysis of cellulolytic activities of a thermophilic fungus belonging to the *Talaromyces* genus. *in Proc. E.C. Conference Biomass for Energy and Industry*: 295-301.
- Johnson, E.A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A. and Demain, A.L. 1982. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1125-1132.
- Kim, B.H. and Wimpenny, J.W.T. 1981. Growth and cellulolytic activity of *Celulomonas flavigena*. *Can. J. Microbiol.* **27**: 1260-1266.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- McHale, A.P., Morrison, J. and McCarthy, U. 1987. Studies on the cellulase system produced by *Talaromyces emersonii* C13S 814. 70 and a mutant UV 7 during growth on lactose. *in Proc. E.C. Conference Biomass for Energy and Industry*: 704-708.
- Nisizawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K. 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**: 999-1007.
- Nisizawa, T., Suzuki, H., Nakayama, M. and Nisizawa, K. 1971. Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma viridi*. *J. Biochem.* **70**: 375-385.
- Parriche, M., Clanet, M. and Durand, H. 1988. Improvement of polysaccharolytic enzymes production by *Talaromyces* sp. CL 240. *in Proc. E.C. Conference Biomass for Energy and Industry*: 263-270.
- Rho, D., Desrochers, M., Jurasek, L., Driguez, H. and Defaye, J. 1982. Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: Thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* **149**: 47-63.
- Shibata, Y. and Nisizawa, K. 1969. Cellulases of *Pseudomonas fluorescens* var.

- cellulosa*. *J. Ferment. Technol.* **47**: 573-586.
- Storvick, W.O., Cole, E.E. and King, K.W. 1963. Mode of action of a cellulase component from *Cellovibrio*. *Biochem.* **2**: 1106-1110.
- Stutzenberger, F.J. 1972. Cellulolytic activity of *Thermonospora curvata*: Nutritional requirements for cellulase production. *Appl. Microbiol.* **24**: 77-82.
- Tanaka, M., Takenawa, S., Matsuno, R. and Kamikubo, T. 1977. Purification and properties of cellulases from *Pellicularia filamentosa*. *J. Ferment. Technol.* **55**: 137-142.
- Wilkie, K.C.B. 1979. The hemicelluloses of grasses and cereals. *Advances in Carbohydrate Chem. and Biochem.* **36**: 215-264.
- Wood, T.M. and Wilson, C.A. 1987. The rumen of a sheep: A new source of cellulase for producing fermentable glucose from cellulosic wastes. in Proc. E.C. Conference Biomass for Energy and Industry: 727-731.
- Wood, T.M. 1971. The cellulase of *Fusarium solani*: Purification and specificity of the β -1,4-glucanase and the β -D glucosidase components. *Biochem. J.* **121**: 353-362.
- Wood, T.M. 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*: Separation of components attacking native cotton. *Biochem. J.* **109**: 217.
- Yamane, K., Suzuki, H., Hirofani, M., Ozawa, H. and Nisizawa, K. 1970. Effect of nature and supply of carbon sources on cellulase formation in *Pseudomonas fluorescences* var. *cellulosa*. *J. Biochem.* **67**: 9-17.
- Yamane, K., Suzuki, H. and Nisizawa, K. 1970. Purification and properties of extracellular and cell-bound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *J. Biochem.* **67**: 19-35.