

합성배지에서 *Stropharia rugosoannulata*가 생산하는 섬유소분해효소에 관한 연구

유관희* · 장형수¹

*상지대학교 이공과대학 생물학과, ¹식품영양학과

Studies on the Cellulolytic Enzymes Produced by *Stropharia rugosoannulata* in Synthetic Medium

Kwan Hee Yoo* and Hyung Soo Chang¹

*Department of Biology, ¹Food and Nutrition, Sang-Ji University, Wonju 220-702, Korea

ABSTRACT: For the purpose of utilizing cellulose resources by cellulolytic enzymes of *Stropharia rugosoannulata*, its cultural conditions for the production of cellulolytic enzymes in synthetic media were investigated. The optimum pH for the production of Avicelase and β -glucosidase was pH 5.0, while that of CMCase was pH 4.0. The optimum temperature for the production of Avicelase, CMCase and β -glucosidase was 40°C. Among the carbon sources, xylose was good for the production of CMCase and β -glucosidase, but maltose was good for the production of Avicelase. The optimum concentration of the carbon sources for the production of CMCase, Avicelase and β -glucosidase was 1.0, 0.8 and 1.1%, respectively. As inorganic nitrogen sources, NH_4Cl was good for the production of all the three cellulolytic enzymes. The optimum concentration of NH_4Cl for the production of CMCase was 0.3% while that of Avicelase and β -glucosidase was 0.4%. As organic nitrogen sources, malt extract was good for the production of all the three cellulolytic enzymes. The optimum concentration of organic nitrogen for the production of β -glucosidase was 1.3% while that of CMCase and Avicelase was 1.0%. As the mineral sources, CoCl_2 good for the was good for the production of all the three cellulolytic enzymes. The optimum concentration of CoCl_2 for the production of all the three enzymes was 0.35%.

KEYWORDS: *Stropharia rugosoannulata*, CMCase, Avicelase, β -glucosidase

자연계에 널리 존재하고 있는 섬유소(cellulose)는 식물체 포벽을 구성하는 고분자유기물질로 대체에너지 자원이나 식량자원으로 높은 활용 가치가 있는 재생 자원이다. 그러나 이용 면에서는 매우 제한적이며, 극히 부분적으로 반추동물이나 일부 미생물에 의해 분해 이용되어질 뿐 대부분 폐기되어 지고 있다(Lee, 1976). 섬유소의 이용은 pulp, 건축재, 의류, 연료 등으로 이용하였으나, 70년대 큰 석유파동을 거치면서 섬유소가 화석자원과는 달리 계속 축적되는 탄소원이라는 면에서 식량과 에너지 자원으로서 섬유소를 이용하고자 섬유소를 분해하여 SCP(single cell protein)나 알코올생산 등의 간접적 이용 및 폐수처리에 이르기까지 많은 연구가 보고 되고 있다(Chey 등, 1990).

섬유소분해효소는 cellulose chain에서 β -D-glucose를 생성하는 효소로 최소한 3종류 이상의 효소가 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Li 등 1965, Gunase, 1980). 높은 활성의 섬유소분해효소를 생산하는 균주의 발견과 생산 조건 등을 조사하기 위한 연구가 많이 수행되고 있다(Hong 등 1986, Kim 등 1997, Chey 등 1990). 섬유소 분해 효소를 생산하는 세균으로는 *Clostridium thermocellum*(Lee 등, 1991), *Clostridium* sp.(Lee 등, 1975), *Cellulomonas fla-*

vigena(Rajoka and Malik, 1984), *Cellulomonas* sp.(Chey 등, 1990), *C. uda*(Stppok 등, 1982) 등이, 진균으로는 *Trichoderma viride*(Berghem 등, 1973, 1974, 1975, 1976; Herr, 1979), *T. reesei*(Duff 등, 1985), *T. koningii*(wood 등, 1972; 맹, 1985), *Aspergillus niger*(Lee 등, 1976), *A. wentii*(성 등, 1990), *A. clavatus*(정 등, 1987), *Penicillium verruculosum*(Kim 등, 1993), *P. funiculosum*(Deshpande 등, 1983), *Sporotrichum thermophile*(Margaritis 등, 1983) 등이 알려져 있으며, 담자균으로는 *Pleurotus ostreatus*(홍 등, 1986; Hiroi와 Eriksson, 1970), *Lyophyllum decastes*(Hong 등, 1988), *Ganoderma lucidum*(홍 등, 1986) 등이 생산하는 섬유소분해효소에 관한 연구보고가 있다.

본 실험에 사용한 *Stropharia rugosoannulata*는 미국에서 최초로 기재된 담자균류로 오늘날에는 유럽에서도 이 종이 발견되었으며, 독일, 폴란드, 헝가리, 체코슬로바키아 등의 국가에서는 매우 인기있는 식용버섯이다(Szudyga, 1978). 본 연구에서는 자연계에 널리 존재하는 섬유소분해능력이 우수한 *S. rugosoannulata*를 합성배지에서 배양하여 섬유소 분해효소를 생산하기 위한 최적 pH, 최적온도, 탄소원과 질소원, 무기염류의 영향 및 기질농도에 따른 효소 생산효과에 미치는 영향을 검토하였다.

*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 상지대학교 생물학과에서 보관 중인 6종의 담자균류인 *Collybia dryophila*, *Lepiota clypeolaria*, *Roseofomes subflexibilis*, *Coprinus atramentarius*, *Stropharia rugosoannulata*, *Lyophyllum semitale* 중에 합성배지에서 배양하여 균 생육상태와 cellulase 활성도가 다른 균주보다 양호한 *S. rugosoannulata*를 공시균주로 사용하였다.

사용배지

보존배지의 조성 보존배지는 malt extract 20 g, glucose 20 g, peptone 2 g, agar 15 g, distilled water 1,000 ml, pH 5.0로 조정하여 사용하였다.

종배양 배지의 조성 종배양 배지는 1% malt extract agar(Difco)를 pH 5.0으로 조정하여 사용하였다.

액체 배양용 배지 액체배양용 기본배지는 K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.5 g, $NaNO_3$ 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, distilled water 1,000 ml, pH 5.0으로 조정하여 사용하였다.

배양방법

250 ml 삼각 flask에 액체배양용 배지 50 ml씩 조제한 후 121°C에서 15분간 고온·가압 살균한 다음 종배양배지에서 생장한 균을 cock borer를 이용하여 직경 0.5 cm의 절편을 접종하여 30°C에서 10일간 배양하였다.

효소활성도 측정

*S. rugosoannulata*를 기본배지에서 10일간 정치배양한 후 배양액을 여과하여 cellulase 조효소액으로 사용하였다. CMCCase(Kanda 등, 1976)는 1% CMC 용액을 함유한 0.2 M sodium acetate buffer(pH 5.0) 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하여 50°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 환원당을 DNS법(Miller, 1959)으로 비색정량하였다.

Glucose 표준품을 사용하여 같은 방법으로 standard curve를 작성하였으며, 효소활성도는 1분당 1 μ mole의 glucose를 생성하는 효소량을 1 unit로 하여 활성의 비교단위로 하였다. Avicelase(Berghem 등, 1973)는 1% Avicel(Fluka) 현탁액을 함유한 0.2 M sodium acetate buffer(pH 5.0) 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하여 50°C 항온수조에서 60분간 반응시킨 후 유리되는 환원당을 CMCCase와 같은 방법으로 측정하였다. β -Glucosidase(Takao 등, 1985)는 17 mM salicin 용액을 함유하는 0.2 M sodium acetate buffer(pH 4.6) 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하고 50°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 환원당을 CMCCase와 같은 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

C. dryophola, *L. clypeolaria*, *R. subflexibilis*, *C. atramen-*

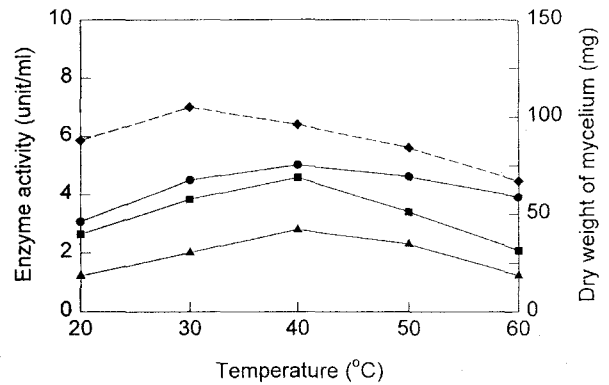


Fig. 1. Influence of cultural temperature on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium. -●- CMCCase, -■- Avicelase, -▲- β -glucosidase, -◆- Mycelium.

tarius, *S. rugosoannulata*, *L. semitale*을 합성배지에서 10일간 배양한 후 여과한 배양액을 조효소로 하여 CMC 분해시험을 한 결과 투명환의 직경이 10, 15, 20, 18, 35, 17 mm로 *S. rugosoannulata*가 다른 균주에 비해 CMC 분해능이 우수하여 본 실험균주로 선발하여 cellulase의 생산을 위한 배양학적 특성을 검토하였다.

배양온도의 영향

배양온도를 20~60°C로 서로 달리하여 10일간 배양한 후 cellulase 활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 온도가 상승함에 따라 cellulase 생산이 증가하여 CMCCase, Avicelase, β -glucosidase 세 효소 모두 40°C에서 가장 양호하였으며, 그 이상의 온도에서는 점차 감소하였다. 균체생산량은 30°C에서 제일 좋았으며, 60°C에서 가장 낮았다. *Phanerochacte chrysosporium*(김, 1987)와 *Trametes trogii*(Kim 등, 1997)의 경우 CMCCase와 β -glucosidase는 30°C, Avicelase는 35°C에서 가장 좋았다는 보고와 상이하게 나타났으며, *S. rugosoannulata*가 생산하는 효소는 다른 담자균에서 생산되는 섬유소분해효소보다 고온성인 것으로 나타났다.

pH의 영향

배지의 pH가 효소 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배지의 pH를 3.0~8.0으로 조성을 달리하여 검토한 결과는 Fig. 2와 같이 Avicelase와 β -glucosidase는 pH 5.0에서, CMCCase는 pH 4.0에서 최적조건을 나타냈으며, 전반적으로 pH에 대해 안정한 효소인 것으로 나타났다. *T. trogii*(Kim 등, 1997)의 cellulase 생산 최적 pH는 4.0-6.0이었고, *Sporotricum pulverulentum*(Eriksson and Hamp, 1978)의 cellulase 생산 최적 pH는 4.7 이라는 보고와 유사하였으나, *Pleurotus sajor-caju*(홍 등, 1984)의 효소생산 최적 pH의 경우 CMCCase와 β -glucosidase는 각각 pH 5.0과 pH 6.5이었다는 보고와는 상이한 결과를 나타냈다.

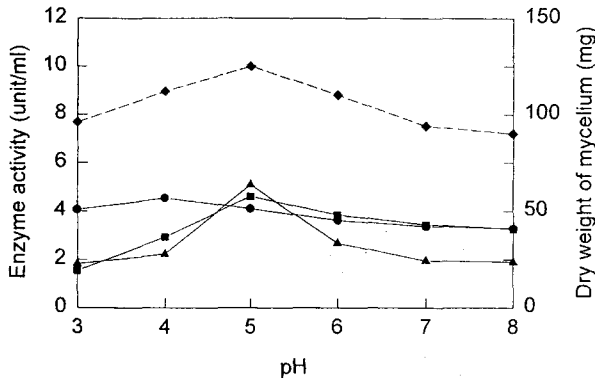


Fig. 2. Influence of pH on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium.
 -●- CMCase, -■- Avicelase, -▲- β -glucosidase, -◆- Mycelium.

한편, pH에 따른 균사체 생산량은 pH 5.0에서 가장 좋았으며, pH 8.0에서 가장 낮았다.

탄소원의 영향

16종의 탄소원이 *S. rugosoannulata*의 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. CMCase와 β -glucosidase의 생산성은 xylose를 탄소원으로 하였을 때 가장 높았고, Avicelase는 maltose를 첨가하였을 때 가장 높은 생산성을 보였다.

Ganoderma lucidum(Hong 등, 1986)의 경우 Avicelase와 CMCase는 CMC에서, β -glucosidase는 cellobiose에서 가장 양호한 것으로 보고 하였고, *Trametes trogii*(Kim 등, 1997)에서는 Avicelase와 β -glucosidase는 Na-CMC에서, CMCase는 cellulase에서 생성이 좋은 것으로 보고 되었으

Table 1. Effect of various carbon sources on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium

Carbon source 1% (w/v)	Enzyme activity (unit/ml)			Mycelium (mg)
	CMCase	Avicelase	β -glucosidase	
None	0.18	2.93	0	36
Raffinose	11.89	16.29	11.89	102
Fructose	204.59	76.86	173.85	139
Cellobiose	171.11	70.82	164.15	128
Inositol	0	8.05	0.37	110
Xylose	212.65	122.43	238.27	96
Galactose	154.64	30.74	235.52	108
Maltose	151.89	306.16	169.82	109
Lactose	175.86	282.19	175.31	91
Mannose	191.78	261.14	190.32	91
Dextrin	99.01	81.81	106.32	228
Starch	17.21	11.90	15.01	120
Glucose	182.63	186.48	194.16	102
Saccharose	17.75	10.43	18.85	141
Na-CMC	0.55	8.61	0.18	38
Ethanol	0.18	0.73	0.18	46
Glycerol	0.55	4.39	0	100

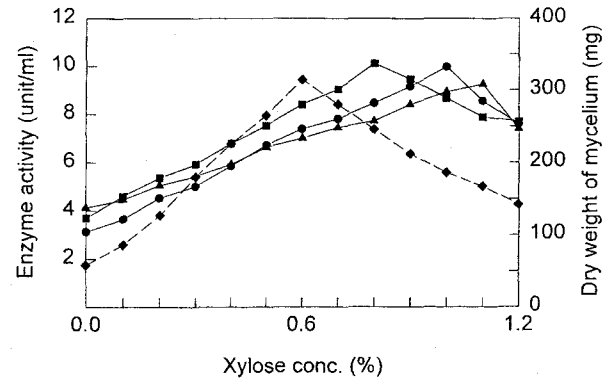


Fig. 3. Effect of xylose concentration on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium.
 -●- CMCase, -■- Avicelase, -▲- β -glucosidase, -◆- Mycelium.

며, *P. chrysosporium*(김, 1987)의 경우 Avicelase는 CMC가, CMCase와 β -glucosidase는 cellulose 첨가시 cellulase 생산이 좋았다는 결과들과 과는 다르게 나타났다.

Mandels 및 Reese(1960)는 cellulolytic fungi에 의한 cellulase 생산에 관한 연구에서 glycerol, mannitol 및 glucose를 탄소원으로 했을 때 좋은 생육을 보였음에도 불구하고 Cx-cellulase의 생산을 볼 수 없었다고 보고한 바 있다. 한편, 균사체의 생육은 dextrin 첨가시 균사체의 발육이 가장 좋았으며, Na-CMC 첨가시 생육이 가장 낮았다. 탄소원 중에서 cellulase 생성이 가장 좋았던 xylose를 0~1.2%의 농도 별로 조성하여 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같이 CMCase는 1.0%, Avicelase는 0.8% 그리고 β -glucosidase는 1.1%인 것으로 나타났으며 균사체 발육은 0.6% 첨가시 가장 잘 발육된 것으로 나타났다.

T. trogii(Kim 등, 1997)는 Avicelase, CMCase, β -glucosidase 세 효소 모두 3% Na-CMC에서 생산성이 가장 높은 것으로 보고한 반면 Hong 등(1986)은 *G. lucidum*의 CMC 농도에 따른 cellulase 생산효과에서 CMCase와 Avicelase는 1%에서, β -glucosidase에서는 2%에서 양호하였고 홍 등(1975)은 *P. ostreatus*가 생산하는 cellulase에 관한 연구에서 CMC 0.8%일 때 가장 좋다고 보고한 바 있다. 반면에 김(1987)의 *Phanerochacte chrysosporium*의 경우 4%의 높은 CMC 농도에서 cellulase 생산효과가 좋은 것으로 나타나 균주간의 차이가 있는 것으로 생각된다.

질소원의 영향

19종의 질소원이 *S. rugosoannulata*의 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 질소원을 첨가하여 효소생산을 검토한 결과 무기질소원은 Table 2에 나타낸 바와 같이 NH_4Cl 이, 유기질소원은 malt extract에서 효소생산이 좋은 것으로 나타났다.

김 등(1982)은 피꼬리 버섯의 질소원 종류 및 그 농도에 따른 균사생산량 비교실험에서 그리고 Kim 등(1997)은 *T.*

Table 2. Effect of various nitrogen sources on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium

Nitrogen source (0.1%)	Enzyme activity (unit/ml)			mycelium (mg)
	CMC-ase	Avicelase	β -glucosidase	
None	0.37	0.18	0.37	35
NH ₄ Cl	0.37	1.10	0.37	50
NH ₄ NO ₃	0.18	0	0.18	47
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.18	1.10	0	81
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.37	0	0	123
NaNO ₃	0.18	0	0	137
KNO ₃	0	0	0	101
NaNO ₂	0	0	0.18	113
Asparagin	0	0	0	45
Yeast extract	0	0.74	0	53
Bacto peptone	0.18	0	0.37	37
Beef extract	0	0.73	0.37	48
Malt extract	0.92	6.59	0.92	56
Soytone	0.18	0.37	0	54
Tryptone	0.18	5.86	0.18	75
Casamino acid		0.95	0	87
Urea	0	0.5	0	81
Soybean meal	0.55	1.46	0	88
Milk casein	0	2.01	0	117
Skim milk	0	2.56	0	95

*trogii*을 재료로 동일한 실험을 한 결과 ammonium tartarate를 첨가했을 때 효소생산이 가장 좋았다는 보고와는 상이하였다. Eriksson(1978)은 *Sporotricum pulverulentum*을 재료로 하였을 때 NaNO₃와 (NH₄)₂SO₄ 첨가시 효소생산이 불량하였다는 결과와 일치하였다.

무기질소원 중 cellulase 생산이 가장 양호하였던 NH₄Cl의 농도를 0~1%로 서로 다르게 조성하여 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 4와 같이 CMCase는 0.3%, Avicelase와 β -glucosidase는 0.4%에서 가장 양호하였으며, 유기질소원인 malt extract를 0~1.4%로 서로 다르게 조성하여 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 5와 같

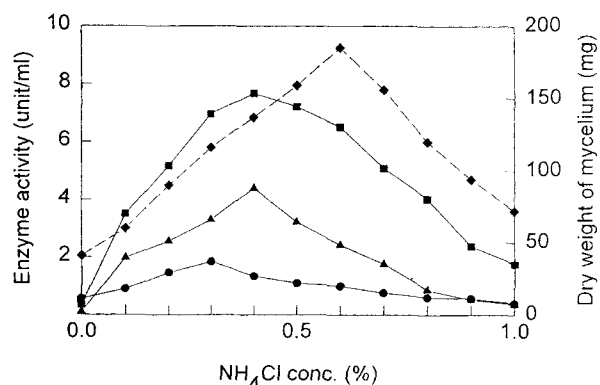


Fig. 4. Effect of NH₄Cl concentration on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium.

●- CMCase, ■- Avicelase, ▲- β -glucosidase, ◆- Mycelium.

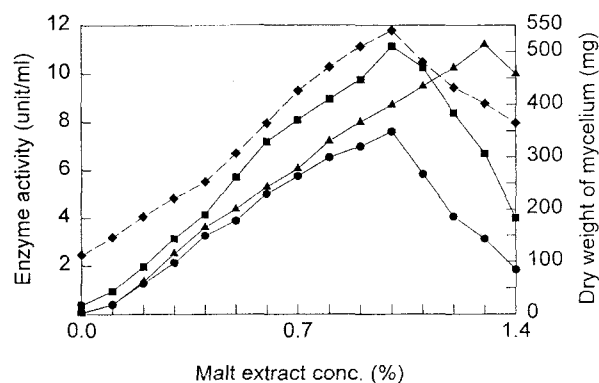


Fig. 5. Effect of malt extract concentration on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium.

●- CMCase, ■- Avicelase, ▲- β -glucosidase, ◆- Mycelium.

Table 3. Effect of various inorganic salts on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium

Inorganic salt (0.1% w/v)	Enzyme activity (unit/ml)			mycelium (mg)
	CMCase	Avicelase	β -glucosidase	
None	0.37	1.10	0	61
KCl	0	0	0	45
BaCl ₂	0	0.73	0	53
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.18	1.10	0	37
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.92	6.59	0.92	48
CuSO ₄	0	0.73	0	56
LiSO ₄	0.18	0.37	0.18	54
MnSO ₄	0.18	5.86	0.92	75
ZnSO ₄	0	0.95	0.18	87
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.55	0.55	0.37	81
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0	1.46	0.37	88
AgNO ₂	0	2.01	0	117
Al ₂ (SO ₄) ₃ · 14H ₂ O	0.37	2.56	0	95

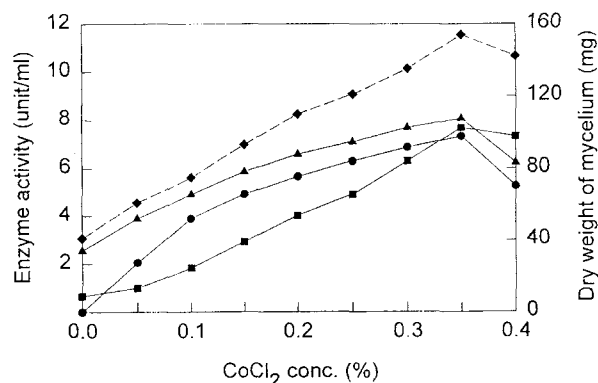


Fig. 6. Effect of CoCl₂ concentration on the production of cellulolytic enzymes by *S. rugosoannulata* in synthetic medium.

●- CMCase, ■- Avicelase, ▲- β -glucosidase, ◆- Mycelium.

이 CMCase와 Avicelase는 1.0%에서 β -glucosidase는 1.3% 일 때 생산성이 가장 좋은 것으로 나타났다.

무기염류의 영향

13종류의 무기염류가 *S. rugosoannulata*의 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 무기염류를 0.1%되게 첨가하여 효소생산을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 CoCl_2 첨가시 CMCase, Avicelase, β -glucosidase 세 효소 모두 가장 효과적이었다.

무기염류중 효소생산이 가장 좋았던 CoCl_2 를 0~0.4% 농도로 조성하여 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 CMCase, Avicelase, β -glucosidase 세 효소 모두 0.35%일 때 가장 효율적인 것으로 나타났다.

적 요

섭유소자원을 이용하기 위하여 *S. rugosoannulata*를 합성배지에서 배양하여 cellulase 생산 최적 배양조건을 검토한 결과는 다음과 같다. *S. rugosoannulata*에 의한 cellulase 생산은 세 효소 모두 40°C가 최적온도이었고, Avicelase와 β -glucosidase는 pH 5.0, CMCase는 pH 4.0이 최적조건이었다. 탄소원은 CMCase와 β -glucosidase는 xylose를 Avicelase는 maltose를 탄소원으로 했을 때 최고의 생산을 나타냈으며, xylose의 최적농도는 CMCase는 1.0%, Avicelase는 0.8%, β -glucosidase는 1.1%이었다. 질소원은 무기질소원으로 NH_4Cl 첨가시 최고의 생산성을 나타냈으며, 최적농도는 CMCase는 0.3%, Avicelase와 β -glucosidase는 0.4%이었으며, 유기질소원으로는 malt extract 첨가시 높은 생산성을 나타냈으며, 최적농도는 CMCase와 Avicelase는 1.0%, β -glucosidase는 1.3%이었다. 무기염류로는 CoCl_2 첨가시 최고의 생산성을 나타냈으며, 최적농도는 세 효소 모두 0.35%이었다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 상지대학교 교내연구비의 지원으로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

김동환. 1987. *Phanerochacte chrysosporium*에 의한 cellulase 생산 및 이용에 관한 연구. 전북대 대학원 박사학위 논문집. 1-87.
 김한경, 박정식, 신관철. 1982. 담자균류를 이용한 단백질생산에 관한 연구. 농기연보. 512-514.
 맹원재. 1985. *Trichoderma koningii*에서 분리된 β -1, 4-glucan glucanohydrolase의 특성 및 작용양상에 관하여. 서울대학교 박사학위 논문. 1-142.
 성낙계, 이상원, 정영철, 강신권, 노종수. 1990. 섭유소분해효소

를 생성하는 *Aspergillus wentii*와 *Aspergillus nidulans*의 원형질체 융합. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 460-465.
 정희진, 한성희, 안희균, 민경희. 1987. 섭유질 문화재로 부터 분리된 *Aspergillus clavatus*의 섭유소분해효소에 관한 연구. *한국균학회지* **15**: 29-37.
 홍재식, 김동한, 김명곤, 이극로, 김영수, 김명숙. 1988. *Lyo-phyllum decastes*를 이용한 몇 짚의 발효사료에 관한 연구. Cellulase 생산조건 및 배양기간의 영향. *한국균학회지* **16**: 128-134.
 홍재식, 이지열, 김동한, 유근석. 1984. *Pleurotus sajorcaju*가 생산하는 섭유소분해효소 성질에 관한 연구. *한국균학회지* **12**: 133-140.
 홍재식, 최윤희, 윤세억. 1986. 합성배지에서 블로초가 생산하는 섭유소분해효소에 관한 연구. *한국균학회지* **14**: 121-130.
 Berghem, L. E. R., Pettersson, L. G. and AxioFredriksson, V. B. 1975. The mechanism of enzymatic cellulose degradation; Characterization and enzymatic properties of a β -1, 4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* **53**: 55-62.
 Berghem, L. E. R., Pettersson, L. G. and AxioFredriksson, V. B. 1976. The mechanism of enzyme cellulose degradation; Purification and some properties of two different β -1,4-glucanohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* **61**: 621-630.
 Berghem, L. E. R. and Pettersson, L. G. 1973. The mechanism of enzymatic cellulose degradation; Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose. *Eur. J. Biochem.* **37**: 21-30.
 Berghem, L. E. R. and Pettersson, L. G. 1974. The mechanism of enzymatic cellulose degradation; Isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* **46**: 295-305.
 Chey, D. C., Hur, N. Y., Yu, J. H. and Oh, D. H. 1990. Purification of cellulase produced from *Cellulomonas* sp. YE-5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 376-382.
 Deshpande, V., Raman, H. S. and Rao, M. 1983. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol using *Penicillium funiculosum* cellulase and free or immobilized *Saccharomyces uvarum* cells. *Biotechnol Bioeng.* **25**: 1679-1684.
 Duff, S. J. B., Cooper, D. G. and Filler, O. M. 1985. Effect of colloidal materials on cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 934-938.
 Eriksson, K. E. and Hamp, S. G. 1978. Regulation of endo-1, 4- β -glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* **90**: 183-190.
 Gunase, K. M. 1980. Physiological studies on *Phymatotrichum omnivorum* XI. Cellulolytic enzyme. *Mycologia.* **72**: 759.
 Herr, D. 1979. Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ATCC-1433 in submerged culture on different substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 136-137.
 Hiroi, T. and Eriksson, K. E. 1970. Microbiological degradation of lignin. Part 1. influence of cellulose on the degradation of lignins by the white rot fungus *Pleurotus os-*

- treatus*. *Svensk Papperstidning nr 5*: 157-161.
- Hong, J. S. and Namgung, H. 1975. Studies on the enzymes produced by *Pleurotus ostreatus*. Part I. Properties of crude cellulase *Bull. Agri. Col., Chonbuk Nat. Univ.* **6**: 101-105.
- Hong, J. S., Lee, J. B., Koh, M. S., Kim, J. S., Lee, K. R. and Jung, G. T. 1986. Studies on cellulases produced by *Pleurotus* spp. on synthetic medium. (II) Effects of vitamins, inorganic salts and cultural conditions. *Kor. J. Mycol.* **14**: 37-41.
- Hong, J. S., Choi, Y. H. and Yum, S. E. 1986. Studies on the cellulolytic enzymes produced by *Ganoderma lucidum* in synthetic media. *Kor. J. Mycol.* **14**: 121-130.
- Kim, J. H., Lee, J. C., Lee, Y. K., Kim, K. H., Chun, S. B. and Chung, K. C. 1993. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase IV from *Penicillium verruculosum*. *Kor. J. Mycol.* **21**: 28-37.
- Kim, M. S., Hong, J. S., Kim, M. K., Yoon, S. and Choi, Y. H. 1997. Effects of carbon and nitrogen sources in the production of cellulolytic enzymes by *Trametes trogii*. *Kor. J. Mycol.* **25**: 68-76.
- Lee, B. H. and Blackburn, T. H. 1975. Cellulase production by a thermophilic *Clostridium* sp. *Appl. Microbiol.* **30**: 346-353.
- Lee, H. S., Choi, B. I., Lee, Y. H., Park, Y. B. and Ha, J. H. 1991. Isolation of *Clostridium thermocellum* producing high activity of cellulase. *Kor. J. Microbiol.* **29**: 184-188.
- Lee, K. J. 1976. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Kor. J. Pharmacogn.* **7**: 85.
- Lee, K. K., Koh, J. S. and Park, S. O. 1976. Studies on the production of fermented feed from agricultural waste product, Part III. On the production of cellulase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *J. Kor. Agri. Chem. Sci.* **29**: 130-137.
- Li, L. H., Flora, R. M. and King, K. W. 1965. Individual roles of Celluase components derived from *Trichoderma viride*. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 439-447.
- Mandels, M. and Reese, E. T. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* **79**: 816-826.
- Margaritis, A. and Merchant, R. 1983. Xylanase, CM-cellulase and Avicelase production by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 265-270.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Rajoka, M. I. and Malik, K. A. 1984. Cellulase and hemicellulase production by *Cellulomonas flavigena* NIAB 441. *Biotechnol. Lett.* **6**: 597-500.
- Stoppok, W., Rapp, R. and Wanger, F. 1982. Formation, location and regulation of endo β -1, 4-glucanase and β -glucosidase from *Cellulomonas uba*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 44-53.
- Szudyga, K. 1978. *Stropharia rugosoannulata*. In: Biology and Cultivation of Edible Mushrooms, Chang, S.T. and Hayes, W.A. Eds. Academic Press, New York, p. 559.
- Takao, S., Kamgata, Y. and Sasaki, H. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. *J. Agri. Sci. Camb.* **93**: 217-222.
- Wood, T. M. and McCrae, S. I. 1972. The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochem. J.* **128**: 1183-1192.