

*Aspergillus nidulans*에서 유도한 섬유소 분해능 결함 돌연변이주의 특성분석

洪淳佑 · 河永七 · 尹利相

서울대학교 自然科学大学 微生物学科

Characterization of Cellulose Nonutilizing Mutants from *Aspergillus nidulans*

Hong, Soon-Woo, Yung-Chil Hah and Yi-Sang Yoon

Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University

From *Aspergillus nidulans* FGSC168, mutant strains (TCD27, NCN2, ACN14 and ACN3) were obtained by NTG and 4-NQO treatments. These four mutant strains were unable to grow on medium supplemented with CMC as a sole carbon source and showed lower levels of CMCase activity in comparison with FGSC168. Some characteristics of these four mutant strains in CMCase production were examined. It was appeared that the permeases for CMCase inducer in all the four mutants were not affected. Two mutants, TCD27 and NCN2, might have some defects in regulatory gene for CMCase production. Analyses of enzyme components of CMCase showed that ACN14 might be defective in structural gene for CMCase.

현재까지의 cellulase에 대한 연구는 크게 두 가지 방향으로 진행되어왔다. 그 하나는 주로 cellulase수득율이 높은 *Trichoderma* 속에 속하는 균주를 이용한 효소 역가가 높은 균주의 개발이고 (Montenecourt 등 1977; Demain 1976), 다른 하나는 Halliwell 등 (1973), Nisizawa 등 (1972)에 의한 효소학적 연구가 그것이다 (Berghe 등 1973, 1975; Okada 등 1975). 이와같은 연구의 결과를 종합해 보면 cellulose는 적어도 세가지의 복합효소인 β -1, 4-glucan gluca-nohydrolase (CMCase, Cx, endoglucanase), β -1, 4-g-lucan cellobiohydrolase (Avicelase, C₁, cellobiohydrolase), 와 β -1, 4-glucosidase (cellobiase)에 의해 glucose로 분해되며, 이 cell-

ulase는 일반적으로 β -linked disaccharide에 의해 induction되고, glucose와 같이 쉽게 이용될 수 있는 기질에 의해 catabolite repression된다는 것이다 (Sternberg 등 1979, 1980; Zhu 등 1982; Hulme 등 1971). 이와 같은 cellulase의 작용 기작이나 합성 조절 기작들은 주로 생화학적·생리학적 연구 결과로서, 이를 확실히 뒷받침해 줄 수 있는 증거로서 무엇보다도 유전자 수준에서의 해석이 가능하도록 하는 유전학적 연구가 필요하다고 하겠다. 그러나 현재까지의 cellulase에 대한 유전학적 연구는 Eberhart 등 (1964)과 Myers 등 (1966)에 의한 *Neurospora crassa*에서의 초보적인 연구 외에는 극히 미미한 상태이다. 이러한 견지에서 유전

본 연구는 1984년도 한국과학재단의 연구비에 의하여 수행되었음.

학적 연구에 매우 유용한 균주인 *Aspergillus nidulans*에서 cellulase와 β -glucosidase가 분리·정제됨에 따라 (Maeng 등 1980; Chang 등 1982), cellulase의 합성과 그 조절 기작을 밝히기 위한 기초 작업으로서 *Aspergillus nidulans*로부터 CMC배지에서 자라지 못하는 돌연변이주들을 얻어 내어 이들의 성질을 분석하였다.

材料 및 方法

균주 및 배지

본 실험에는 *Aspergillus nidulans* FGSC 168과 163이 사용되었으며 FGSC 168로 부터 새로이 CMC배지에서 자라지 못하는 돌연변이주를 얻어내었다. *Aspergillus nidulans*는 37°C에서 완전배지나 최소배지에 배양하였다 (Harsanyi, 1977). CMC배지는 carbon source로서 dextrose대신 CMC(carboxymethyl cellulose)를 첨가한 최소배지를 사용하였다. 평판배지 실험에서는 한천의 농도를 1.6%로 하였고, colony의 크기를 줄이기 위하여 0.08% (w/v)의 sodium deoxycholate를 배지에 첨가하였다.

돌연변이 유발

돌연변이 유발원으로 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)과 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO)를 사용하였다. *A. nidulans* FGSC 168의 conidia에 NTG는 최종농도 200 μ g/ml 되게 37°C에서 90분간 처리하고, 4-NQO는 5 μ g/ml로 15분간 처리하였으며, 이들의 표현형을 발현 (phenotype expression)시킨 후 500 unit/ml의 nystatin을 처리하여 enrichment시켰다 (Ditchburn 등, 1971; Nevalainen 등, 1978). 이들을 dextrose 최소배지와 CMC 최소배지에 각각 옮겨 심어서 dextrose배지에서는 정상적으로 자라지만 CMC배지에서는 자라지 못하는 돌연변이주들을 골라 내었다. 이들 돌연변이주들은 세번 반복하여 확인되었다.

균체 배양과 효소 활성도 측정

효소 용액의 제조; (1) 각 돌연변이주와 FGSC 168 및 각 돌연변이주와 FGSC 163과의 이배체의 사면 배양체로부터 0.02% tween 80으

로 conidia 현탁액을 만들어 완전 액체배지에 각각 5.0×10^5 conidia/ml media 농도로 접종한 후 37°C에서 18시간 동안 진탕배양하였다. 자란 균체를 멸균된 식염수로 세척하여 다시 CMC 최소 액체배지에 각각 접종하여 진탕배양하면서 매 4시간 간격으로 시료를 채취하여 얻은 상등액을 효소용액으로 사용하였다. 한편 원심분리하여 얻어진 균체 침전물을 0.05M 초산 완충용액 (pH 5.0)으로 세척한 후 16,000psi에서 French press로 균체를 파괴하여 원심분리하여 그 상등액을 세포 내 효소용액으로 사용하였다.

(2) (1)에서와 같은 방법으로 얻은 conidia 현탁액을 CMC 최소 액체배지에 각각 5.0×10^5 conidia/ml media 되도록 접종하여 37°C에서 진탕배양하면서 10일동안 매 24시간 간격으로 시료를 채취하여 원심분리하여 얻은 상등액을 효소용액으로 사용하였다.

효소 활성도 측정; (1) CMCase; 0.05M 초산 완충용액 (pH 5.0)에 녹인 0.5% CMC용액 0.8ml와 효소용액 0.2ml를 섞어 45°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson 방법 (1952)으로 파장 660nm에서 측정하였다.

(2) β -glucosidase; 0.05M 초산 완충용액 (pH 5.0)에 녹인 1mM PNPG (*p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside) 0.8ml와 효소용액 0.2ml를 섞어 45°C에서 30분간 반응시킨 뒤에 2.0ml의 1M Na_2CO_3 를 넣고 증류수 10ml로 희석시켜서 유리된 *p*-nitrophenol (PNP)의 양을 420nm에서 측정하였다. 각 효소의 specific activity 1 unit은 효소 1mg이 30분간 반응하여 역가 측정시 O. D. 값 1을 변화시키는 효소의 양으로 정하였다.

단백질 정량; 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry 등 (1951)의 방법으로 하였으며 280nm에서 O. D. 값을 측정하였다.

Cellobiose uptake 속도 측정

각 돌연변이주와 FGSC 168의 conidia 현탁액을 얻어 효소 용액의 제조(1)와 동일한 조건으로 완전배지에서 18시간 진탕배양하여 얻은 균체를 멸균된 식염수로 세척하여, glucose 대신에 2mM cellobiose가 포함된 최소 액체배

지에 재접종하여 6 시간 동안 진탕배양하면서 매 1 시간 간격으로 시료를 채취하여 원심분리한 상등액의 환원당을 Somogyi-Nelson 방법 (1952) 으로 파장 660nm에서 측정하였다.

Cellulase Complex의 부분정제

배양 ; FGSC 168 및 각 돌연변이주의 conidia 현탁액을 완전 액체배지에 5×10^5 spore/ml media 되게 접종하여 37°C에서 18시간 동안 공기를 주입시키며 진탕배양한 후 균체를 멸균 식염수로 씻어 CMC최소 액체배지에 재접종하여 12시간 동안 배양하였다.

황산 암모늄 분획 ; CMC최소 액체배지에서 배양이 끝난 후 여과지로 균체를 제거한 여과액을 crude enzyme으로 사용하여 30~80%의 고체 황산 암모늄으로 염석시켜 12,000×g 로 40분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 침전물을 0.05M 초산 완충용액 (pH 5.0)에 녹여 투석막에 넣고 동일 완충용액에서 12시간 동안 투석하였다.

Bio-Gel P-150에 의한 gel permeation chromatography ; 투석이 끝난 효소용액을 원심분리한 상등액을 Bio-Gel P-150으로 충전된 column (1.7cm×80cm)에서 동일한 완충용액으로 용출시켰다. 용출속도는 7 ml/hr로 하였고, 2.5ml씩 분획하였다.

Table 1. Characteristics of strains.

strain	growth level		recessiveness or dominance of mutation
	Glc	CMC	
FGSC168	+++	+++	
TCD27	+++	-	
NCN2	+++	-	
ACN14	+++	-	
ACN3	+++	±	
TCD27×FGSC163	+++	+++	recessive
NCN2×FGSC163	+++	+++	recessive
ACN14×FGSC163	+++	+++	recessive
ACN3×FGSC163	+++	+++	recessive

+++ : good growth
 ± : growth, 3day later
 - : no growth until 1 week

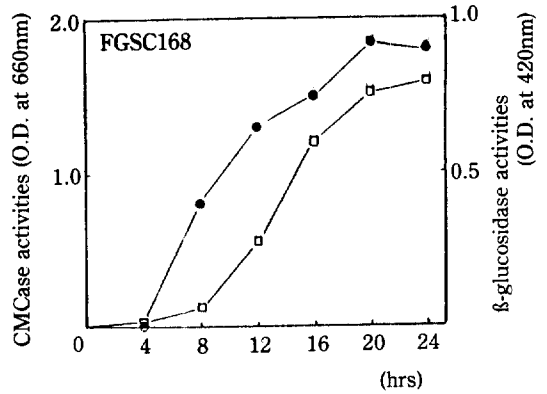


Fig. 1. The changes of cellulase activities in FGSC168.

●—● : CMCase
 □—□ : β-glucosidase

結果 및 考察

돌연변이주들의 분리 및 형질 검증

Aspergillus nidulans FGSC 168의 conidia에 NTG 및 4-NQO를 생존율이 1%되게 처리하여 CMC 배지에서 자라지 못하는 돌연변이주 TCD 27, NCN 2, ACN 14, ACN 3를 얻었다. 이 중 TCD 27은 NTG를 처리하여 얻었고, 나머지 3가지의 돌연변이주는 4-NQO를 처리하여 얻어 내었다. 이들은 dextrose 최소 고체배지에서는 정상적으로 잘 자랐으나, CMC최소 고체배지에서는 자라지 못하였다. 그러나 ACN 3는 CMC최소 고체배지에서 3일이 지나면 자라기 시작하였다 (Table 1). 이들 돌연변이주들의 형질을 검증하기 위하여 CMC배지에서 잘 자라는 FGSC 168을 표준 균주로 하여, 각 돌연변이주의 CMCase 및 β-glucosidase 활성을 측정해 보았다 (Fig. 1, 2, 3, 4). 그 결과 TCD 27과 NCN 2는 FGSC 168의 약 1/2 정도의 CMCase 활성을 가지고 있었고, ACN 3는 FGSC 168과 거의 비슷한 수준의 CMCase 활성을 가지고 있었으나 ACN 14는 CMCase 활성이 거의 없었다. 한편 β-glucosidase 활성은 대부분 비슷하였으나 NCN 2와 ACN 14는 FGSC 168의 1/2 수준을 나타내었다. ACN 14를 제외한 나머지 돌연변이주에서의 이와 같은 결과는 CMC최소 고체배지에서 자라지 못하는 성질, 즉 cellulase의 합성이나 그의 조절기작에 결함이 있

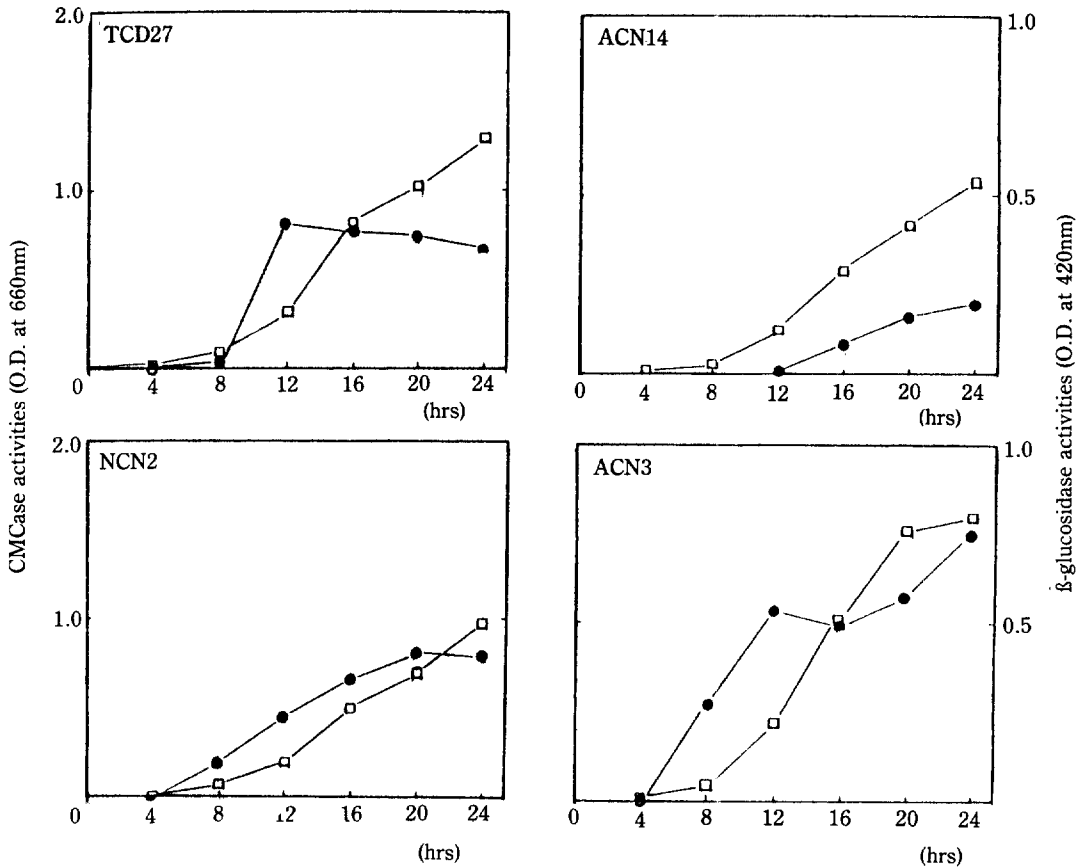


Fig. 2. The changes of cellulase activities in mutant strains.

●—●: CMCase

□—□: β-glucosidase

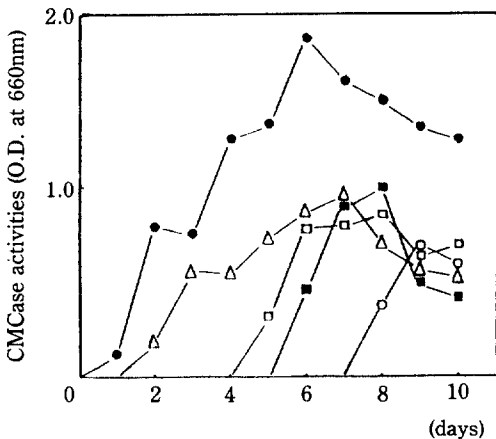


Fig. 3. The changes of CMCase activities of the mutant strains and FGSC 168 in CMC minimal liquid medium.

●—●: FGSC 168 ○—○: ACN14
 ■—■: TCD27 □—□: NCN2
 □—□: ACN3

우리라는 추측과는 다른 결과를 나타내는데, 이의 확인을 위하여 CMC 최소 액체배지에 직접 conidia를 접종하여 매 24시간마다 세포외 CMC 활성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 돌연변이주들은 CMCase에 대해 야생형인 FGSC168보다 성장시작점이 매우 늦었으며 CMCase 활성도도 낮은 수준으로 나타났다. 한편 ACN 14의 경우 세포내에서는 정상적으로 합성된 CMCase가 세포벽이나 세포막의 손상으로 인하여 분비가 되지 못하는 것인지의 여부를 확인하기 위하여 세포내 효소의 활성도를 측정해 본 결과 세포외 측정양상과 동일한 결과를 얻었다(Fig. 4).

돌연변이주들의 우열성 검증

TCD27, NCN 2, ACN 14, ACN 3의 돌연변이 형질이 우성인지 열성인지를 알아내기 위하여

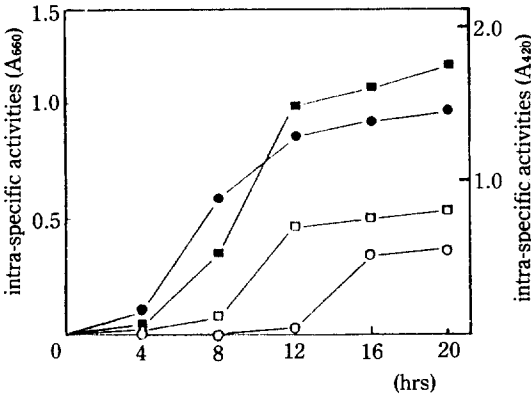


Fig. 4. The changes of intracellular specific activities of cellulase in ACN14 and FGSC 168.

- : CMCase of FGSC 168
- : CMCase of ACN14
- : β-glucosidase of FGSC 168
- : β-glucosidase of ACN14

여, CMCase에 대한 야생형 균주로 알려진 FGSC 163(Hong 등, 1982)과 이들 돌연변이주들 간의 이배체를 얻어내어 CMCase 최소 고체배지에 접종해 보았다. 그 결과 이들 이배체들은 모두 정상적으로 성장을 하였으며 따라서 돌연변이가 일어난 유전자들은 모두 열성 형질을 가지고 있음을 알 수 있었다(Table 1).

Cellobiose uptake 속도 측정

*A. nidulans*에서는 cellobiose가 CMCase 를

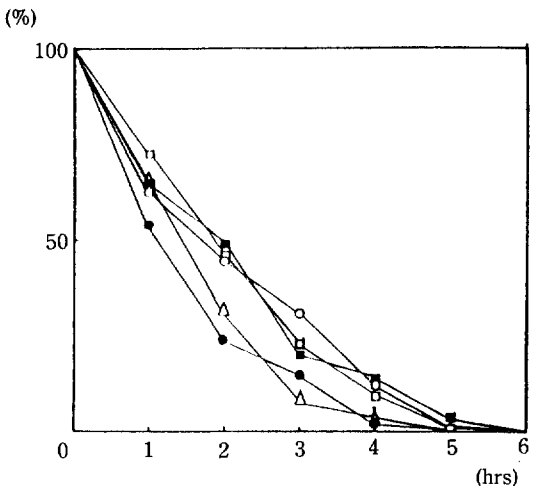


Fig. 5. Cellobiose uptake rates in the mutant strains and FGSC 168.

- : FGSC 168 ○—○ : ACN14
- : TCD27 □—□ : NCN2
- : ACN3

induction시킨다는 것으로 알려져 있다(Yoon, 1984). 그런데 만약 돌연변이주들이 CMCase 배지에서 자라지 못하는 이유가 inducer, 즉 cellobiose를 cell내로 받아들이지 못하기 때문이라면(inducer permease mutant), cellobiose uptake속도가 야생형인 FGSC 168보다 매우 낮을 것으로 예상할 수 있다. 세포의 β-glucosidase활성이 초기 4 시간여까지는 전혀 나타나지 않으므로, 적어도 이 시간 내에는 cellobiose가 glucose로 분해되지 않는다는 것을 이용하여, 각 돌연변이주와 FGSC 168의 cellobiose uptake속도를 측정해 본 결과 돌연변이주들과 야생형에서 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5). 그러므로 이들 4 가지의 돌연변이주들은 inducer permease를 만들어내는 유전자에는 손상이 없는 것을 알 수 있다.

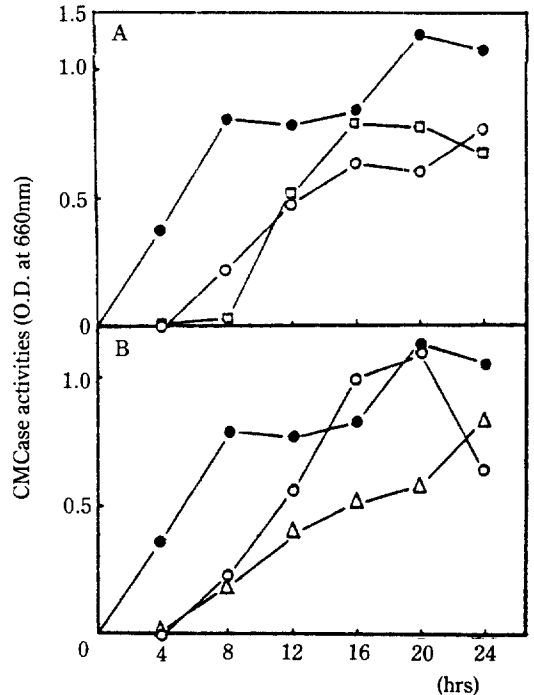


Fig. 6. A. The changes of CMCase activities of strains TCD27, TCD27xFGSC163 diploid and FGS168xFGSC163 diploid.

- : 168x163,
- : TCD27x163, □—□ : TCD27
- : 168x163,
- : NCN2x163, □—□ : NCN2

이배체 (mutant × FGSC 163) 들의 효소 활성도 측정

CMC배지에서 자라지 못하는 돌연변이주들의 돌연변이된 유전자가 야생형의 유전자에 대하여 우성인지 열성인지를 확인함과 동시에, 각 돌연변이주의 cellulase 합성조절기작의 이상 유무를 알아 보기 위하여 돌연변이주와 FGSC163과의 이배체 및 FGSC 168과 FGSC 163과의 이배체들의 효소 활성도를 조사하였다. Fig. 6에서 보듯이 TCD 27×FGSC 163 이배체와 NCN 2×FGSC 163 이배체의 경우에 이들의 C-MCase 활성도가 단배체인 TCD 27과 NCN 2의 CMCCase 활성도와 매우 비슷한 양상으로 낮게 나타나는 것을 볼 수 있다. 그러나 이들 두 종류를 제외한 나머지 두 종류의 이배체의 경우에는 야생형 이배체인 FGSC 168×FGSC 163의 CMCCase 수준과 별 차이를 보이지 않았다 (Fig. 7). 이러한 결과로부터 TCD 27과 NCN 2의 돌연변이된 유전자가, 앞서의 CMC 최소 고체배지에서 확인된 바와 같이, 비록 열성형질을 가지고 있긴 하지만, 이배체의 CMCCase 활성도를 측정해 본 결과로는 우선 표현형을 나타낼 수 있는 특성을 가지고 있는 것으로 볼 수 있다. 이로부터 아래와 같은 가정을 세울 수 있

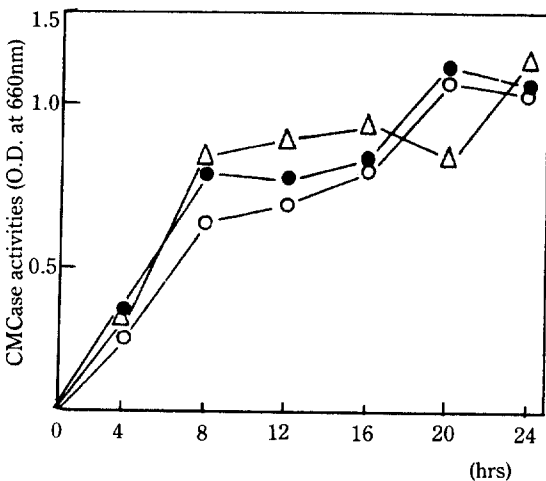


Fig. 7. The changes of CMCCase activities of diploid strains.

- — ● : FGSC168xFGSC163
- — ○ : ACN14xFGSC163
- △ — △ : ACN3xFGSC163

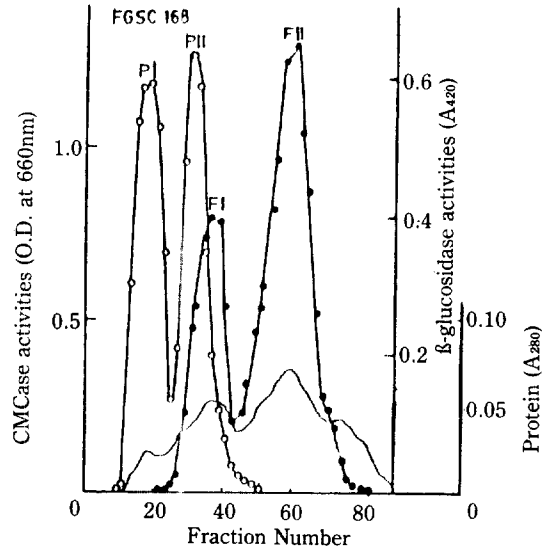


Fig. 8. Bio-Gel P-150 chromatography of crude enzyme prepared from FGSC168.

1 fraction = 2.5 ml.

- — ● : CMCCase activity
- — ○ : β-glucosidase activity
- : protein

다. TCD 27과 NCN 2의 두 돌연변이주에서 C-MCase 합성의 induction을 억제하는 repressor protein을 만드는 조절 유전자에 돌연변이가 일어나 inducer와 결합을 못하거나 DNA (operator)로부터 떨어져 나올 수 없는 변형된 repressor protein이 합성된다고 가정하면, 이 결과에서처럼 돌연변이주와 야생형의 이배체의 CMCCase 활성이 낮은 수준으로 나타날 수 있다. 그러나 Fig. 2, 3의 결과와 같은 활성을 보이는 이유는 이들 돌연변이주의 변형된 repressor는 CMCCase 합성을 완전히 억제하지 못하거나, 공동으로 작용하는 2 개 이상의 repressor gene 중의 하나에 돌연변이가 일어났기 때문일 수 있다. 따라서 TCD 27이나 NCN 2와 같은 불완전한 돌연변이주와 야생형과의 이배체는 CMC 배지에서 충분히 성장할 수 있기 때문에 이들의 돌연변이된 유전자가 열성형질을 가지는 것으로 나타나지만 (Table 1), 이배체의 CMCCase 합성 수준은 낮아질 것으로 생각된다 (Fig. 6). 만일 이와 같은 추정적 결론이 사실이라면, *A. nidulans*의 CMCCase의 합성은 inducer-repressor system을 통한 negative control에 의

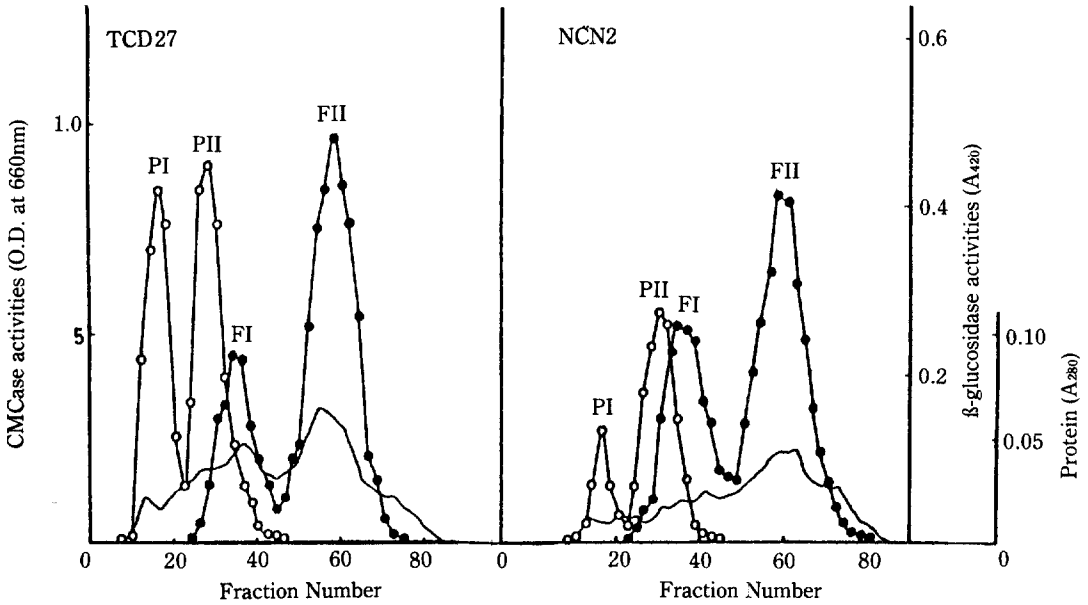


Fig. 9. Bio-Gel P-150 chromatography of crude enzyme prepared from TCD27 and NCN2. 1 fraction = 2.5 ml.
 ●——● : CMCase activity, ○——○ : β-glucosidase activity, ——— : protein

해 조절된다고 말할 수 있다.

Cellulase 복합효소의 부분정제에 의한 효소 성분의 이상 유무 조사

각 돌연변이주와 FGSC 168로부터 CMC에 의해 cellulase를 induction시키고, 여기서 얻은 crude enzyme를 Bio-Gel P-150으로 gel permeation chromatography를 하여 각 효소성분

의 이상 유무를 비교하였다. ACN 14를 제외한 TCD 27, NCN 2, ACN 3에서 CMCase의 성분 효소인 FI, FII는 FGSC 168과 비교할 때 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 8, 9, 10). ACN 14의 경우 CMCase의 두 성분인 FI, FII의 활성도가 모두 나타나지 않았다. 그러나 이들 성분에 해당하는 protein은 상당량 존재하는 것

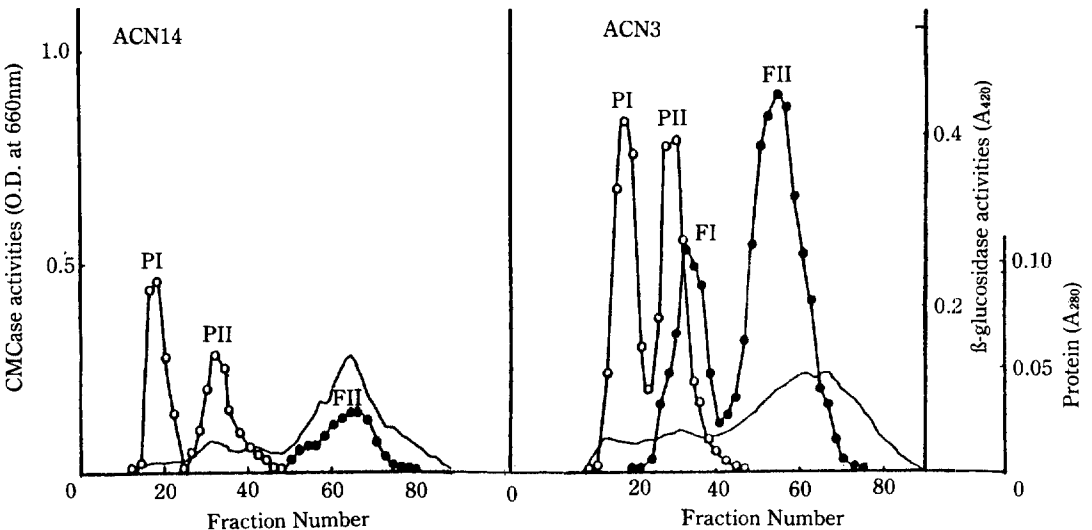


Fig. 10. Bio-Gel P-150 chromatography of crude enzyme prepared from ACN14 and ACN3. 1 fraction = 2.5 ml.
 ●——● : CMCase activity, ○——○ : β-glucosidase activity, ——— : protein

으로 보아 ACN 14는 CMCase의 구조유전자의 돌연변이주로 생각된다. 또한 약간의 활성도를 가지고 있는 FII의 위치에도 변화가 있음을 알 수 있다(Fig. 10). 그런데 ACN14는 한 위치에 돌연변이가 일어난 것으로서(Yoon, 1984) 이와 같이 구조유전자의 한 위치에 돌연변이가 일어남으로써 두 가지 성분의 CMCase가 함께 영향을 받는 경우는 다음과 같을 수 있다. 즉, (i) CMCase의 구조유전자로 부터 하나의 polycistronic mRNA가 만들어지고, 이들이 post-transcriptional 또는 post-translational processing과정을 통해 두개의 성분으로 나누어지거나, (ii) 이 유전자로 부터 한 종류의 protein이 만들어지지만 post-translational modification을 통해 polymeric state가 달라져 분자량

이 다른 두 성분으로 구분되어질 수도 있겠다. 이들 4 가지 돌연변이주들 중 ACN 3의 경우 야생형과 비교하여 볼 때, 세포의 CMCase의 각 구성성분이나 효소 활성도의 수준이 별 차이가 없음에도 불구하고 CMC배지에서 자라지 못하는 현상을 보여주는 것은 cellulase의 합성조절기작의 직접적인 결함에 기인하는 것이라기 보다는 진핵세포내에 존재하는 복잡한 조절기작중의 한 단계에 돌연변이와 같은 어떤 요인에 의해 결함이 생겼으나, 또한 이러한 요인들에 의해 세포들이 catabolite repression이나 catabolite inhibition에 sensitive한 성질을 가지게 되었기 때문일 것으로도 추정해 볼 수 있다. 이와 같은 가능성은 TCD 27이나 NCN 2의 경우에서도 배제할 수는 없을 것이다.

摘 要

Cellulase의 합성 및 그의 조절기작을 밝히기 위한 기초연구로서 *Aspergillus nidulans* FGSC 168로 부터 CMC배지에서 자라지 못하는 돌연변이주인 TCD27, NCN2, ACN 14, ACN3를 얻어내어 이들의 성질을 분석하였다. 이들 4 가지 돌연변이주는 모두 inducer를 세포내로 수송하는 permease를 만들어 내는 유전자에는 아무 결함이 없었다. 이들 중 ACN3는 cellulase의 합성 및 그의 조절 기작과는 직접 관련이 없는 돌연변이주로 추정되나, TCD 27과 NCN2는 조절 유전자에 돌연변이가 일어났을 가능성이 있고, ACN 14는 구조 유전자 돌연변이주일 것으로 추정되었다.

REFERENCES

- Berghem, L.E.R. and L.G. Pettersson, 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., L.G. Pettersson and U.B.A. Fredricksson, 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.
- Chang, T.Y., Y.H. Rhee and S.W. Hong, 1982. Purification and properties of β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* FGSC 159. *Kor. Biochem. J.* **15**, 81-94.
- Demain, A.L., 1976. Comments on cellulase production. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 6, 79-81, John Wiley & Sons, Inc.
- Ditchburn, P. and K.D. Macdonald, 1971. The differential effects of nystation on growth of auxotrophic and prototrophic strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **67**, 299-306.
- Halliwell, G., and M. Griffin, 1973. The nature and mode of action of the cellulolytic component C₁ of *Trichoderma koningii* on native cellulose. *Biochem. J.* **135**, 587-594.
- Harsanyi, Z., I. A. Granek and D.W.R. Mackenzie, 1977. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *A. nidulans*. *Mut. Res.* **48**, 51-74.
- Hong, H.J., Y.C. Hah and S.W. Hong, 1982. On carboxymethylcellulase gene mapping in *Aspergillus nidulans*. *J. Nat. Acad. Sci.* **21**, 501-517.

9. Hulme, M.A. and D.W. Stranks, 1971. Regulation of cellulase production by *Myrothecium verrucaria* grown on noncellulosic substrates. *J. Gen. Microbiol.* **69**, 145-155.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
11. Maeng, P.J., S.W. Hong and Y.C. Hah, 1980. Purification and properties of carboxymethylcellulases from *Aspergillus nidulans* FGSC 159. *Kor. J. Microbiol.* **18**, 133-147.
12. Montencourt, B.S. and D.E. Eveleigh, 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* **105**, 45-50.
13. Nevalainen, K.M.H. and E.T. Palva, 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride* unable to hydrolyze cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**(1), 11-16.
14. Nisizawa, T., H. Suzuki and K. Nisizawa, 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**, 999-1007.
15. Okada, G. and K. Nisizawa, 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*; Transglycosylation properties of two cellulase components of random type. *J. Biochem.* **78**, 297-306.
16. Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
17. Strenberg, D. and G.R. Mandels, 1979. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* **139**, 761-769.
18. Sternberg, D. and G.R. Mandels, 1980. Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* **114**, 1197-1199.
19. Yoon, Y.S. 1984. Genetic analysis of cellulose nonutilizing mutants from *Aspergillus nidulans*. *Thesis for M.S. degree in S.N.U.*
20. Zhu, Y.S., Y.Q. Wu, W. Chen, C. Tan, J.H. Cao, J.X. Fei and C.N. Shih, 1982. Induction and regulation of cellulase synthesis in *Trichoderma pseudokoningii* mutants EA₃-867 and N₂-78. *Enzyme Microbiol. Technol.* **4**, 3-12.

(Received February 21, 1985)