

Pseudomonas sp.의 Catabolite Repression 저항성 변이주로부터 Cellulase의 생산

정영철¹ · 노종수 · 강신권 · 성낙계*
경상대학교 식품공학과, ¹진주전문대학 식품영양과

Cellulase Production from the Catabolite Repression Resistant Mutant of *Pseudomonas* sp.

Chung, Young-Chul¹, Jong-Soo Roh, Shin-Kwon Kang and Nack-Kie Sung*

Department of Food Science and Technology, Gyeong Sang
National University, Chinju 660-701, Korea

¹Department of Food and Nutrition,
Chinju Technical College, Chinyang Munsan 127, Korea

Abstract — The production of cellulase by *Pseudomonas* sp. LBC505 isolated was under the strict genetic and biochemical control mechanisms such as catabolite repression and induction. These biochemical control reduced cellulase production. Thus LBC505 was mutated to increase enzyme yields. Cell growth and cellulase production were inhibited by the addition of 2-deoxy glucose (2-DG), which is presumed to function as repressor for the selection of high cellulase yielding mutant. Catabolite repression resistant mutants were obtained through the treatment of NTG and UV, enrichment culture in 20 mM 2-DG, and the selection of colony forming yellow zone in PY-glucose medium with congo red stain. Two mutants, PM21 and PM45 isolated from *Pseudomonas* sp. were catabolite repression resistant mutants that were not repressed by glucose and produced cellulase in the presence of 2-DG. The mutant PM 21 was increased 1.5 fold higher β -glucosidase activity than that of wild type. CMCase and avicelase activity of PM 45 were 1.3 times and 1.6 times as much as that of wild type, respectively. Mutant strain PM21 and PM45 were also resistant to catabolite repression by 2~3% glucose, indicating that cellulase production in the mutants was converted to be constitutive.

광합성 작용으로 매년 재생산되는 biomass의 생물 전환 공정에 있어 애로점 중의 하나는 cellulose 및 hemicellulose를 oligosaccharide 또는 당당류로 분해시키는 효소의 생산단가가 전공정에 40~60%를 점유하고 있으므로 먼저 자연계로부터 cellulose complex와 xylan계 분해효소를 강력하게 분비하는 미생물을 탐색하여 효소 고생산균주를 개발하는 것이 중요하다. 자연계에서는 강력한 분해효소 생성균이 있어도 이들 미생물이 생성하는 섬유소 분해효소는 일반적으로 β -1,4결합을 가진 당류의 존재하에서 유도

되는 유도효소이며 또한 catabolite repression feedback 제어와 같은 생합성 대사기작을 가지고 있는 특징이 있다.

그러므로 효소 분비능을 증가시키기 위해서는 이런 생합성 조절기구를 변이에 의해 해제, 구성화시켜 효소합성을 증가시키거나, 값싼 기질로부터 효소생산을 가능하게 해야 한다(1-5). 변이에 의한 섬유소 분해효소 생성능의 향상에 관한 연구를 보면 Virenda 등(6)과 다른 연구자들(7-9)은 *Trichoderma reesei*, Smith 등(10)은 *Cellulomonas*로부터 변이주가 유도된 보고는 있으나 효소활성이 낮은 결점이 있어 더 개발 여지가 많다. 본 연구실에서 자연계로부터 분리한 섬유소분해 효소 생성 미생물인 *Pseudomo-*

Key words: *Pseudomonas* sp. LBC505, cellulase, catabolite repression resistant mutant

*Corresponding author

nas sp. LBC505는 catabolite repression 조절하에 있고, 또한 β -1,4-linkage를 가지고 있는 cellulose 그리고 sophorose 등에 의해 유도되는 유도효소이며 효소 당화시 cellulase 작용으로 유리되어 나오는 glucose의 농도가 높으면 효소의 생합성이 저해되는 end-product inhibition을 받고 있음이 이미 밝혀졌다.

본 보고에서는 특정 미생물에서 cellulase의 대량 생산을 억제하는 이러한 생합성 대사조절기구들을 변이에 의해 해제하여 구성화 시킨 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양방법

공시균주는 본 연구실에서 분리된 cellulase complex와 xylanase를 동시에 분비하는 *Pseudomonas* sp. LBC505를 사용하였으며, 효소생산용 배지는 변형된 PY-CMC 배지(CMC, 1% ; yeast extract, 0.5% ; polypeptone, 0.3% ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% ; NaCl, 0.5% ; K_2HPO_4 , 0.2% ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% ; CaCl_2 , 0.04% ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.001%) (11)를 사용하여 37°C 에서 진탕배양하였다.

변이방법

Pseudomonas sp. LBC505를 PY-glucose 배지에서 대수증식기 초기까지 배양한 후 원심분리하여 집균한 다음 50 mM Tris-malate buffer(pH 6.8)로 2회 세척하여 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가한다음 50°C 에서 20, 30, 60분간 각각 처리시켰다. 동일 buffer로서 2회 세척하여 NTG를 제거한 후 멸균 증류수로 5배 희석하여 petri-dish에 넣어 30~40 cm 거리에서 2분간 UV를 조사하는 혼합처리를 하였으며, antimetabolite로 작용하는 2-deoxyglucose(2-DG)에 저항성 변이주를 집적하기 위해 20 mM의 2-DG가 첨가된 PY-CMC 배지에 0.1 mL씩 접종하여 pH 6.8, 40°C (10 hr)에서 배양한 후 0.5% CMC와 0.5% glucose를 함유한 배지에 평판하여 congo red 처리시 clear zone을 형성하는 균주를 선별하였다.

효소활성 측정

Carboxymethyl cellulase(CMCase) 활성은 Hori-koshi 등(12)의 방법에 준하였다. 즉 조효소액 0.3 mL과 0.02 M citrate-phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인

1% CMC용액 0.7 mL을 혼합하여 50°C 에서 10분간 반응시켜 DNS 용액 1 mL을 첨가하여 생성된 환원당을 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 분당 효소액 1 mL이 1 mg의 환원당을 생성할 때를 1 unit로 정하였다. β -glucosidase 활성은 p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG)를 사용하여 Kohchi 등(13)의 방법에 따랐다. 조효소액 1 mL과 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 6.5)로 용해한 4 mM PNPG 1 mL을 혼합하여 37°C 에서 5분간 반응시켰다. 0.5 M Na_2CO_3 2 mL을 가한 상정액을 400 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 p-nitrophenol을 정량하였다. 효소활성단위는 분당 효소액 1 mL이 1 μM 의 PNP를 생성할 때를 1 unit로 정하였다. Avicelase 활성은 1% avicel을 기질로 사용하여 50°C 에서 60분간 반응시킨후 4°C 에서 10분간 원심분리하여 avicel을 제거한 다음 CMCase 활성 측정과 동일한 방법으로 측정하였다. 효소활성 단위는 분당 효소액 1 mL이 1 μM 의 환원당을 생성할 때를 1 unit로 정하였다.

결과 및 고찰

Pseudomonas sp.의 효소생성 및 생육에 미치는 2-deoxy glucose의 영향

분리균 *Pseudomonas* sp. LBC505가 carbon catabolite repression 조절하에 있고, 또한 β -1,4-linkage를 가진 cellulose에 의해 유도되는 유도효소이며, end-product inhibition을 받고 있음이 이미 밝혀졌다. 이런 생합성 대사조절기구를 변이에 의해 해제시키기 전에 carbon catabolite repression resistant 변이주를 선발하기 위해서 glucose analog인 2-DG(2, 6, 8, 14, 15)를 PY-CMC 액체배지에 탄소원을 제거하고 0.5% CMC와 2-DG를 농도별로 첨가하여 균증식 및 효소활성을 조사하였다(Table 1).

탄소원이 제거된 배지, 30 mM 2-DG만 첨가된 배지 및 0.5% glucose에 2-DG를 농도별로 첨가한 배지에서는 효소활성이 검출되지 않았고, 0.5% CMC와 2-DG를 동시에 첨가했을 경우에는 2-DG의 농도가 증가함에 따라 효소활성이 현저하게 감소하는 것으로 보아 2-DG는 공시균주에 antimetabolite로 작용하여 catabolite repression의 repressor임이 밝혀졌다.

Catabolite repression 저항성 변이주의 분리 및 선정

Pseudomonas sp. LBC505를 변이시킨 뒤 2-DG

Table 1. Effects of 2-deoxy glucose on the growth and enzyme activity of *Pseudomonas* sp. LBC 505

Carbon source	Growth (660)	Enzyme activity(U)		
		CMCase	Avicelase	β -glucosidase
None carbon source	0.78	0.22	0.21	0.11
30 mM 2DG	0.84	0	0	0
0.5% CMC	1.04	3.13	2.24	3.03
0.5% CMC + 30 mM 2DG	0.91	0.10	0.02	0.02
0.5% CMC + 3 mM 2DG	1.03	0.16	0.18	0.14
0.5% CMC + 0.3 mM 2DG	1.21	0.52	0.65	0.37
0.5% CMC + 0.03 mM 2DG	1.30	0.85	0.74	0.53
0.5% Glucose	1.34	0	0	0
0.5% Glucose + 30 mM 2DG	1.35	0	0	0
0.5% Glucose + 3 mM 2DG	1.38	0	0	0
0.5% Glucose + 0.3 mM 2DG	1.48	0	0	0
0.5% Glucose + 0.03 mM 2DG	1.52	0	0	0

Strains were aerobically grown on PY-CMC medium containing CMC, 2DG and CMC, or 2DG instead of CMC at 42°C for 36 hours.
2DG: 2-Deoxy glucose

Table 2. Comparisons of wild type and mutants during growth on PY-CMC and PY-glucose medium

Strains	Enzyme activities(U)		
	CMCase	Avicelase	β -glucosidase
Wild type (LBC505)	3.41(0)	2.60(0)	3.48(0)
Mutant			
PM21	3.78(0.27)	2.51(0)	5.27(4.30)
PM37	3.81(1.21)	3.24(0)	2.21(0)
PM45	4.46(4.62)	4.20(3.75)	2.47(0)
PM74	4.21(1.21)	1.25(0)	3.08(0)
PM78	5.28(0.75)	0.27(0)	1.28(0)
PM86	4.15(0.85)	2.47(0)	1.51(0)
PM102	4.28(2.21)	1.47(0)	2.68(0)
PM115	3.21(1.48)	3.21(1.21)	2.21(0)
PM136	2.51(0.74)	3.11(1.21)	3.51(0)

Strains were aerobically grown on PY-CMC and PY-glucose medium at 42°C for 36 hours.
Parenthesis is indicated enzyme activity of cells cultured on PY-glucose medium.

함유배지에서 catabolite repression 저항성 균주만을 집적배양시킨 뒤 탄소원으로 glucose와 CMC 함유배지에서 도말하여 clear zone을 형성하는 130여개의 colony를 분리하여 PY-glucose 배지와 PY-CMC 배지에서 진탕 배양한 후 효소활성을 측정해서 야생주보다 효소활성이 높거나 특성이 있는 9개의 변이주를

일차 선정하였다(Table 2). Cellulase complex의 구성성분인 CMCase(endo-glucanase), avicelase(exo-glucanase) 및 β -glucosidase 효소활성이 야생주보다 모두 높은 변이주는 분리되지 않았다. 변이주 PM21은 β -glucosidase의 활성이 야생주에 비하여 1.5배, PM45는 CMCase와 avicelase 활성이 야생주에 비하여 각각 1.3배, 1.6배 증가하였고, glucose 배지에서도 효소생성이 용이한 것으로 보아 catabolite repression 조절기구가 해제된 것으로 나타났으나, PM 74, PM 78, PM 86 및 PM102는 avicelase와 β -glucosidase 활성이 PM 115와 PM 136은 CMCase와 β -glucosidase 활성이 감소된 특성을 보였다. 이들 변이주 중에 β -glucosidase 활성이 높은 PM 21과 CMCase와 avicelase 활성이 높은 PM 45를 최종선정하여 변이주의 특성을 조사하였다.

Catabolite repression 저항성 균주의 확인

변이주 PM 21과 PM 45가 catabolite repression 저항성 균주인가를 확인하기 위하여 CMC와 glucose를 농도별로 혼합 첨가한 PY-CMC 배지에 종배양액을 접종하여 효소 생성능을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 야생주 LBC505는 glucose의 농도가 증가함에 따라 효소 합성이 현저히 저해된 반면에 PM 21은 glucose 농도에 거의 영향을 받지 않고, β -glucosidase를 pM 45은 CMCase와 avicelase 생성을 용이하게 분비하는 것으로 보아 대사조절기구가 해제된

Table 3. Enzyme activity of wild type and mutants cultured on glucose, glucose and CMC, or CMC medium

Strains	Substrate	Enzyme activities(U)			
		CMCase	Avicelase	β -glucosidase	
Wild type	1% Glucose	0	0	0	
	0.8% Glucose + 0.2% CMC	0	0	0	
	0.5% Glucose + 0.5% CMC	0.26	0.41	0.64	
	0.2% Glucose + 0.8% CMC	1.45	1.48	1.72	
	1% CMC	3.41	2.60	3.48	
Mutants	PM 21	1% Glucose	0.27	0	4.30
		0.8% Glucose + 0.2% CMC	0.82	0	4.64
		0.5% Glucose + 0.5% CMC	1.54	0.89	4.91
		0.2% Glucose + 0.8% CMC	2.49	1.21	5.23
		1% CMC	3.28	2.51	5.27
	PM 45	1% Glucose	4.62	3.75	0
		0.8% Glucose + 0.2% CMC	4.58	3.80	0
		0.5% Glucose + 0.5% CMC	4.51	3.94	0
		0.2% Glucose + 0.8% CMC	4.48	4.05	1.23
		1% CMC	4.46	4.20	2.47

Strains were aerobically cultured on PY-CMC medium containing designated substrate instead of CMC at 42°C, for 36 hours.

Table 4. Effect of 2-deoxy glucose concentration on the growth and enzyme activity of LBC505, PM 21 and PM 45

Strains	2-DG concentration	Growth	Enzyme activities (U)		
			CMCase	Avicelase	β -glucosidase
LBC505	None	0.78	0.22	0.21	0.11
	30 mM 2-DG	0.84	0	0	0
	0.5% CMC	1.04	3.27	2.15	3.07
	0.5% CMC + 30 mM 2DG	0.91	0.10	0.02	0.02
	0.5% CMC + 3 mM 2DG	1.03	0.16	0.18	0.14
	0.5% CMC + 0.3 mM 2DG	1.21	0.52	0.65	0.37
	0.5% CMC + 0.03 mM 2DG	1.30	0.85	0.74	0.53
PM 21	None	0.80	0.25	0.37	1.43
	30 mM 2-DG	1.10	0.17	0.09	3.08
	0.5% CMC	1.02	3.01	1.08	3.50
	0.5% CMC + 30 mM 2DG	1.20	0.10	0.02	4.52
	0.5% CMC + 3 mM 2DG	1.12	0.16	0.18	4.44
	0.5% CMC + 0.3 mM 2DG	1.08	0.52	0.65	4.38
	0.5% CMC + 0.03 mM 2DG	1.02	0.85	0.74	4.30
PM 45	None	0.85	0.25	1.48	0.11
	30 mM 2-DG	0.90	2.55	2.83	0
	0.5% CMC	0.98	3.51	3.24	2.25
	0.5% CMC + 30 mM 2DG	1.34	4.10	3.21	0.02
	0.5% CMC + 3 mM 2DG	1.25	3.65	3.01	0.14
	0.5% CMC + 0.3 mM 2DG	1.20	3.57	2.95	0.37
	0.5% CMC + 0.03 mM 2DG	1.13	3.50	2.87	0.53

Strains were aerobically cultured on PY-CMC medium containing designated substrate of CMC at 42°C, for 36 hours.

것으로 생각된다. 특히, PM 45의 CMCase 활성은 glucose의 농도가 증가할수록 약간 증가되었는데 이는 catabolite repression이 거의 제거된 것으로 추정되며, avicelase는 효소의 활성이 약간 감소하는 경향을 보여 대사조절기구가 부분적으로 해제될 가능성이 있다.

2-Deoxy glucose의 영향

야생주 LBC505에 antimetabolite인 것으로 밝혀진 2-DG가 변이주에 어떤 작용을 하는가를 조사하기 위하여 PY-CMC 배지에 CMC와 2-DG를 농도별로 첨가하여 진탕배양하였을때 균증식과 효소활성은 Table 4와 같다.

LBC 505는 2-DG의 첨가에 따라 균증식 및 효소 합성이 현저한 저해현상을 보이나, 변이주 PM 21과 PM 45는 2-DG 농도가 30 mM까지 첨가할 경우에는 각각 균증식 및 PM21은 특히 β-glucosidase, PM45는 CMCase와 avicelase의 효소합성이 약간 증가하는 경향을 보였다. 이런 현상은 변이주에서는 2-DG가 antimetabolite가 아닌 에너지로의 대사가 일어나서 세포생육속도를 촉진시켜 결국 cell mass량을 증가시켜 효소활성을 증가시키는 것으로 사료되며, *Thermomonospora curvata*의 변이주에서도 비슷한 결과를 얻었다 (15).

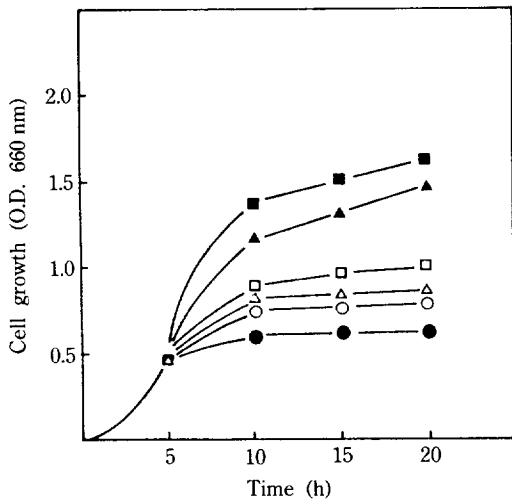


Fig. 1. Effect of the addition of 20 mM 2DG on the cell growth of *Pseudomonas* sp. LBC 505 and mutant. PM 21, PM 45 after growth for 5 hours. LBC 505: addition (●), no addition (○); PM 21: addition (▲), no addition (△); PM 45: addition (■), no addition (□)

배양중 2-DG 첨가에 따른 균증식 및 효소 생합성의 영향

변이주인 PM 21과 PM 45가 2-DG에 대한 균증식과 효소 생합성을 조사하기 위하여 PY-CMC 배지에서 5시간과 10시간 동안 진탕 배양한 후 2-DG를 첨가하였다. Fig. 1은 5시간 배양후 2-DG를 첨가했을 때 균증식을 나타낸 것으로 야생주는 첨가 직후부터 균증식 속도는 완만하였으나 PM 21과 PM 45는 첨가후 1.5시간 후부터 증식속도가 급격히 증가하였으며, 20시간까지 균체증식이 있는 것으로 밝혀졌는데, 이런 결과는 2-DG가 변이주에 대해 에너지원으로 이용되는 것으로 추론할 수 있다(15). 배양중 2-DG 첨가에 의한 PM 45의 CMCase 합성은 대조구에 비하여 촉진되었으며 avicelase 활성도 CMCase보다 증가폭이 다소 낮았으나 비슷한 경향을 보였다(Fig. 2). PM 21의 β-glucosidase 활성도 2-DG의 첨가로 훨씬 증가하였다(Fig. 3). 배양중 2-DG를 첨가했을 때 효소활성이 증가되는 것으로 보아 변이주는 catabolite repression resistant 변이주임이 재확인 되었으며, 또한 2-DG가 세포생육도를 증가시켜주는 탄소원 또는 에너지원으로 대사되어 cell mass를 증가시켜줌으로써 결국 효소활성이 증가되는 경우와 CMCase, avicelase 및 β-glucosidase 유전자의 발현에 관여하는 조절기작이 해제됨으로써 효소활성이 증가되는 두가지

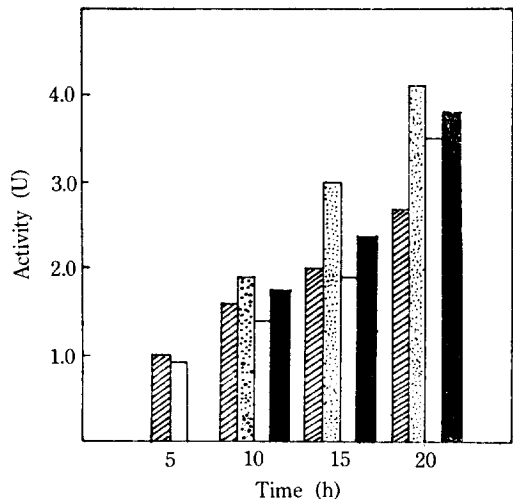


Fig. 2. Effect of the addition of 20 mM 2DG on the CMCase and avicelase activity of mutant, PM 45 after growth for 5 and 10 hours respectively. CMCase activity: addition (▨), no addition (▩); Avicelase activity: addition (■), no addition (□)

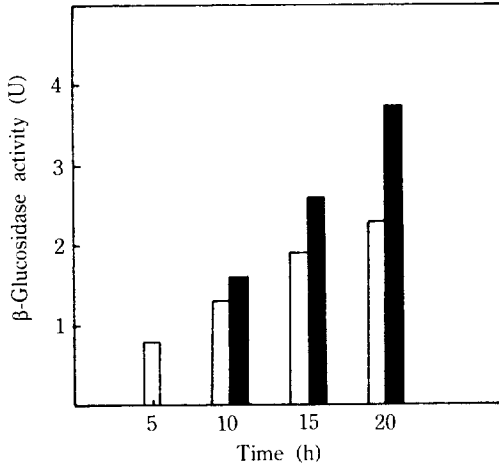


Fig. 3. Effect of the addition of 20 mM 2-DG on the β -glucosidase activity of mutant, PM 45 after growth for 5 and 10 hours respectively. β -Glucosidase activity: addition (■), no addition (□)

경우로 생각되어진다.

Glucose 농도에 대한 저항

변이주 PM 21과 PM 45가 효소생성에 있어 어느 정도의 glucose 농도에 대해 저항성이 있는가를 알아보기 위하여 PY-CMC 배지에 CMC대신 glucose를 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0% 및 5.0% 각각 첨가하여 효소활성을 조사한 결과는 Fig 4와 같이 두개의 변이주가 약간의 차이는 있었지만 PM 45의 CMCase 활성은 약 3.5%, avicelase 활성은 2.0%, PM 21의 β -glucosidase 활성은 2.5%까지 저항성이 인정되었다. 이는 당 저항성 *Tricoderma reesei*의 2.0~5.0%에 비해 비슷하거나 또는 약간 낮았다(7-9).

요 약

섬유성 분해효소를 분비하는 분리균 *Pseudomonas* sp. LBC 505는 catabolite repression과 특정유도 물질에 의해 효소 생합성이 유도되는 대사조절기구의 영향을 받고 있음이 밝혀졌다. 2-Deoxy glucose(2-DG)는 공시균주의 증식 및 효소 생합성을 현저하게 저해시키는 것으로 나타났는데, 이는 2-DG가 antimetabolite로 작용하여 catabolite repressor임이 밝혀졌다. 공시균주를 NTG와 UV로 유기시킨 다음 2-DG에서 집적배양하여 glucose가 함유된 배지에서 congo red 염색으로 halo를 형성하는 변이주 중에서 효소

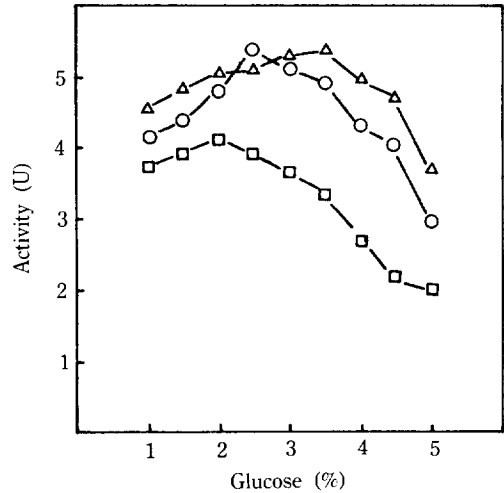


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the enzyme production of mutant PM 21 and PM 45. PM 21: β -Glucosidase activity (○), PM 45: CMCase activity (△), Avicelase activity (□)

활성이 높고 대사조절기구가 해제된 PM 21과 PM 45는 2-DG 및 glucose에 균증식 및 효소 생성능에 저항성이 있었다. 변이주 PM 21은 β -glucosidase 활성이 야생주에 비하여 1.5배 증가하였고 glucose 존재하에서도 효소생성이 용이하였다. PM 45는 CMCase와 avicelase 함유 배지에서도 약간 높은 활성을 보였다. 특히, PM 45의 CMCase 활성은 glucose 농도가 증가할수록 약간 상승되었는데 이는 catabolite repression이 완전히 해제된 것으로 추측되며, avicelase는 glucose 농도의 증가에 따라 효소활성이 약간 감소하는 경향을 보여 대사조절기구가 부분적으로 해제된 것으로 나타났다. PM 21의 β -glucosidase 생합성도 avicelase와 비슷한 경향을 보였다. 또한 야생주의 강력한 repressor로 작용하는 2-DG에 변이주 PM 21과 PM 45를 시간과 농도별로 배양하였을 때 효소활성 및 균증식이 양호하였으며 glucose에 대한 저항성도 PM 45의 CMCase는 3.5%, avicelase는 2.0%, PM 21의 β -glucosidase는 2.5%까지 인정되었다.

참고문헌

- Hagett, K.D., W.Y. Choi, and N.W. Dunn, 1978. Mutants of *Cellulomonas* which produce increased levels of β -glucosidase. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6: 189-191.
- Lee, Y.N., and S.K., Koh. 1982. Enhanced produ-

- ction of cellulase by a mutant strain of *Aspergillus phoenicis*. *Kor. Jour. Microbiol.* **20**: 125-133.
3. Mandels, M. and D. Sternberg. 1976. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* **54**: 267-286.
 4. Nisizawa, T., and Hiroshi Suzuki. 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**: 999-1007.
 5. Stutzenberger, F., G. Ferrigton, C. Neubauer. 1984. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression resistant mutant of *Aspergillus curvata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 201-204.
 6. Virendra, S.B. and T.K. Ghose. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: Substrate, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 90-104.
 7. Acebal, C., 1986. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM p 414 on physically treated wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 218-223.
 8. Mikio Kawamori, Yutaka Ado and Seigo Takasawa. 1986. Preparation and application of *Trichoderma* mutants which enhanced β -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2477-2482.
 9. Sajor Mishra, and K.S. Gopalkrishnan. 1984. New method of for isolation of cellulase constitutive mutants in *Trichoderma reesei* and partial characterization of one. *J. Ferment. Technol.* **62**: 49.
 10. Sell, C.C. Maintland. 1967. The cellulase of *Trichoderma viride*. *Biochem. J.* **104**: 716-724.
 11. Sternberg, D. and G.R. Mandels. 1980. Regulation of the Cellulolytic System in *Trichoderma reesei* by Sorpharose. *J. Bacteriol.* **144**: 1197-1199.
 12. Horikoshi, K. 1984. Cellulase of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Can. J. Microbiol.* **30**: 774-779.
 13. Kohchi, C., and A. Tohe. Cloning of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene and its expression in *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 14.M.E. Penttila, K.M. Helena, A. Raynal, and J.K.C. Knowls. 1984. Cloning of *Aspergillus nigers* in Yeast-Expression of the gene coding *Aspergillus* β -glucosidase. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 494-499.
 14. Garcia-Martinez, D.V., A. Shinmyo, A. Madia., and A.L. Demain. 1980. Studies on cellulase production by *Clostridium thermocellum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 189-197.
 15. Stutzenberger, F.J. 1984. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 201-204.

(Received November 20, 1993)