

Trichoderma reesei QM 9414의 섬유소 분해 효소 생산을 위한 조절변이주의 분리 및 특성에 관한 연구

최건호 · 구윤모 · 소재성*
인하대학교 생물공학과

Isolation and Characterization of Regulatory Mutant for Cellulase Production from *Trichoderma reesei* QM 9414

Kun-Ho Choi, Youn-Mo Koo and Jae-Seong So*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT: Two regulatory mutants of *Trichoderma reesei* QM 9414 were isolated by treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, and the effects of various inducers on the carboxymethylcellulose (CMC) and filter paper (FP) production were investigated. Induction of CMCase and FPase production of mutants was shown higher level than wild type strain in 1% lactose minimal broth. When induced by glucose, wild type showed glucose-repression for CMCase and FPase production and mutants showed glucose-derepression. Mutant 1 showed 8.38 fold higher CMCase activity and 5.68 fold higher FPase activity than wild type strain. Mutant 2 showed about 8.42 fold higher CMCase activity and 5.41 fold higher FPase activity than wild type strain. Enzyme activities from the mutants and wild type had the same optimum pH of 4.8 and optimum temperature of 60°C.

KEYWORDS: Cellulase, Regulative mutant, *Trichoderma reesei*

펄프의 표백에서 염소 또는 염소 화합물을 사용하는 재래식 화학공정은 반응 부산물에 염소계 유기물질을 포함하기 때문에 환경친화적이지 못하다 (Gamerith 등, 1992; Burchert 등, 1994). 따라서, 펄프의 표백에 효소의 사용을 통한 생물학적 처리가 관심을 끌기 시작하였다 (Paice 등, 1988; Gamerith 등, 1992; Burchert 등, 1994). 이러한 폐지 재생 청정공정의 개발에 있어서의 효소의 사용은 어떠한 효소를 사용할 것인가 하는 효소의 선택이 중요하며 경제적 재생 공정의 개발을 위해서는 효소원으로서 적절한 미생물의 선정 또한 중요하다. 폐지 재생에 사용되는 효소는 cellulase, hemicellulase, xylanase, lipase 등이 주를 이루며 이 효소들은 fungi, bacteria, algae 등의 미생물에 의해 생산된다.

섬유소는 자연계에서 존재하는 가장 풍부한 다당

류이며 β -1,4-glucosidic 결합으로 연결된 glucose 중합체이다. Cellulase는 endoglucanases(β -1,4-glucanglucanohydrolase), β -glucosidase(cellobiase), exoglucanase(β -1,4-glucanocellobiohydrolase)로 구성되어 있으며 각 효소는 서로 다른 몇 개의 소단위 성분의 작용으로 섬유소분해 효소 기능을 가진 복합 효소(Winkelmann, 1992; 홍 등, 1996)로 알려졌다. 또한, cellulase 생합성은 induction과 catabolite repression에 의해 조절됨이 밝혀져 있다(Stewart와 Leatherwood, 1976; El-Gogary 등, 1989).

Cellulase는 fungi의 다양한 성장조건에서 생산되어지며 cellulase 생산을 위해 조사된 미생물 중에서는 *Trichoderma* species가 가장 광범위하게 사용되어진다(Penttila 등, 1986; Winkelmann, 1992; Kurzatkowski 등, 1996; Kleman-Leyer 등, 1997; Ilmen 등, 1997). *Trichoderma reesei*는 cellulase 분비량이 매우 우수하고 배양이 쉽고,

*Corresponding author

짜기 때문에 식품 및 사료산업에 널리 사용되며 최근에는 textile, pulp, paper industries에서의 응용에도 이용되고 있다(Rouvinen, 1990; Gam-erith 등, 1992; Burchert 등, 1994; Sanchez-Torres 등, 1994; Nevalainen 등, 1995; Nakari-Setälä와 Penttilä, 1995). *Trichoderma reesei*에서 endoglucanases와 cellobiohydrolases는 다양한 형태의 결정형, 비결정형섬유소에 의해 유도되며 섬유소의 최종대사산물인 glucose에 의해 그 활성이 억제된다. 이러한 carbon catabolite repression을 극복하여 cellulase 생산성을 향상시키기 위해 돌연변이체를 얻기위한 많은 실험이 이루어졌으며(이, 1979; Stewart와 Leatherwood, 1976; Wiley, 1982; Durand 등, 1988; Ponce-Noyola와 Torre, 1995), 현재 heterologous host expression (Arsdell 등, 1987; Wong 등, 1988; Sanchez-Torres 등, 1994; Aho 등, 1996), gene cloning (Shoemaker 등, 1983), protoplast fusion (Ogawa 등, 1987)을 이용한 유전공학기술을 이용하는 시도 또한 보고된 바 있다.

본 실험에서는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를 사용하여 catabolite derepression 성질을 갖는 *T. reesei* 돌연변이주를 선별하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

본 실험에 사용된 균주인 *Trichoderma reesei* QM 9414는 생명공학연구소 유전자 은행에서 제공받았으며 Potato Dextrose agar(Difco) 사면배지에서 접종하여 28°C에서 약 4일간 배양한 후, 4°C에 보관하면서 사용하였다. 사면배지에 멸균증류수 10 ml를 가한 후, 유리봉으로 배지표면을 조심스럽게 긁고 잘 혼합한 후, 멸균여지(Whatman No.1)로 여과하여 포자현탁액을 만들어 돌연변이 실험과 액체배지 접종에 사용하였다. 돌연변이 선별 배지로는 Deoxycholate agar medium을 사용하였으며 조성은 다음과 같다. 1 l당 NaCl 5g, K₂HPO₄ 2g, Ferric citrate 1g, Sodium citrate 1g, Carboxymethylcellulose 10g, (NH₄)₂SO₄ 1.4g, agar 20g,

그리고 colony를 형성시키고 그 size를 제한하기 위하여 sodium deoxycholate를 0.15% 첨가하였으며 뚜렷한 clear zone을 형성하기 위하여 saponin을 0.1% 첨가하였다. 섬유소 분해효소 생산을 위한 배양은 lactose를 첨가한 Berkery medium을 사용하였으며 조성은 다음과 같다. 1 l당 (NH₄)₂SO₄ 11.5g, KH₂PO₄ 3.5g, MgSO₄·7H₂O 0.3g, CaCl₂·2H₂O 0.75g, Proteose peptone 2.9g, Tween-80 0.2g, Lactose 10g. 액체배지의 경우 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml씩 넣고 121°C, 15분간 가압 멸균한 후 포자현탁액을 1 ml 접종하여 28°C에서 왕복 진탕 배양하였다.

돌연변이 유도와 선별 및 확인

50 mM Tris maleic acid buffer(pH 6.0)로 조제한 포자현탁액 900 µl과 같은 완충액에 용해한 0.1% NTG 용액 100 µl을 섞어 최종농도가 100 µg/ml 되게 한 후, 28°C에서 30분간처리(50% 생존율)시킨 다음 원심분리하였다. 수확된 포자를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 2번 세척하고 1.5% 2-deoxy-D-glucose(Fennington 등, 1984; Ghosh 등, 1991)로 24시간 처리후, glucose가 2% 첨가된 돌연변이 선별배지에 도말, 28°C에서 약 1주간 배양한 후 colony가 형성되면 0.1% congo red로 1시간 staining한후 1% NaCl로 20분 destaining하여 형성된 clear zone을 확인(Leatherwood, 1982; Beguin, 1983; Wood 등, 1988)하여 cellulase 생산을 정성적으로 측정하였다.

효소활성 측정

모균주 *T. reesei* QM 9414와 돌연변이균주를 cellulase 생산기질로 lactose, glucose를 사용하여 Berkery medium에서 28°C에서 200 rpm으로 3일, 5일, 7일, 9일간 왕복 진탕 배양하였다. 조효소 용액을 얻기 위해 진탕 배양한 배양액을 0.45 µm cellulose acetate filter로 여과하였다.

Carboxymethylcellulase(CMCase) 활성의 측정은 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.8)에 용해시킨 1% CMC용액 0.5 ml에 조효소 용액 0.5 ml를 가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후, din-trosalicylic acid(DNS)용액 3 ml 가하고 95°C에

서 5분간 반응시킨 뒤 증류수를 2 ml 가한 후, 535 nm에서의 흡광도를 측정하여 유리된 환원당을 조사하였다. 이 효소의 활성도 1 unit는 1분 동안 최종 분해 산물인 glucose 1 mg을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. Filter Paper degradation activity(FPase)의 효소 활성은 기질로서 filter paper 50 mg, 0.1M sodium acetate buffer(pH 4.8) 1 ml, 조효소 용액 0.5 ml를 가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후, DNS용액을 가하여 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정 유리된 환원당을 조사하였다.

단백질 정량

단백질의 정량은 Bovine serum albumin을 사용하여 표준곡선을 만들어 정량하였다(Bradford, 1976).

결과 및 고찰

Glucose-derepression 돌연변이주의 선별

본 연구에서는 *Trichoderma reesei* QM 9414를 모균주로 하여 변이주 유도 조건으로 NTG를 30분간 처리하여 생존한 세포를 glucose가 2% 함유된 배지에 도말, 배양한 후 Congo red staining으로

glucose derepression 성질을 갖는 2개의 돌연변이주를 선별할 수 있었다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 모균주인 *T. reesei* QM 9414는 glucose가 repressor로 작용하여 섬유소분해효소 생성이 억제되었으나 돌연변이주들은 glucose에 repression을 받지 않고 섬유소분해효소를 생성함으로써 glucose derepression 돌연변이주임을 확인할 수 있었다.

모균주와 돌연변이주의 섬유소분해효소의 생성

T. reesei QM 9414와 돌연변이주로부터 생성된 효소의 활성을 비교, 조사하기 위해 탄소원으로 lactose를 첨가한 Berkery media에서 균주를 배양하여 6일, 9일째에서의 CMCase와 FPase 활성을 비교한 결과 Fig. 1에서 보았던 돌연변이주들을 포함하여 대부분의 돌연변이주들이 활성을 잃어버리는 반면에 Fig. 2, 3에서 볼 수 있듯이 2개의 돌연변이주(Mutant 18, 19)에서 효소활성이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 얻은 2개의 돌연변이주 mutant 18, 19를 돌연변이주 1, 2로 명명하여 다음실험에 임하였다.

모균주와 돌연변이주의 섬유소분해효소 생산의 생합성 조절

T. reesei QM 9414와 효소활성이 증가된 2개의 돌연변이주로부터의 섬유소 분해 효소 생성에 있어

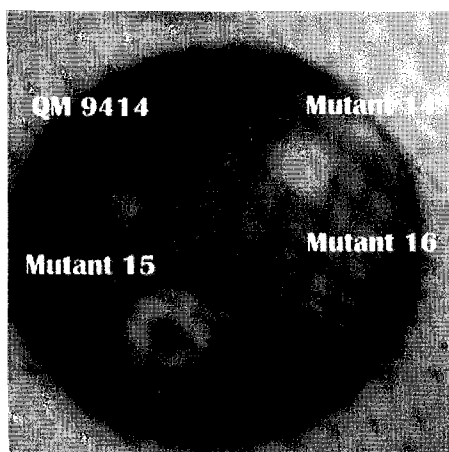


Fig. 1. Cellulase activity of wild-type (QM 9414) and several selected mutant strains of *Trichoderma reesei* in the presence of 2% glucose.

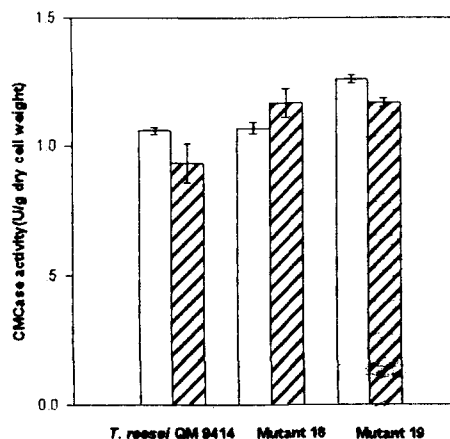


Fig. 2. Production of CMCase activity from *Trichoderma reesei* QM 9414 and mutants during 6 (□) and 9 (▨)-day incubations in the Berkery medium of 1% lactose.

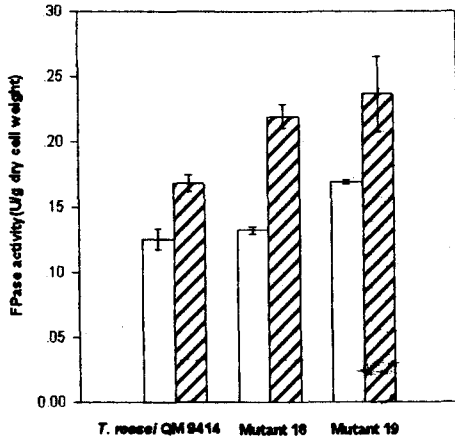


Fig. 3. Production of FPase from *Trichoderma reesei* QM 9414 and mutants during 6 (□) and 9 (▨)-day incubations in the Berkery medium of 1% lactose.

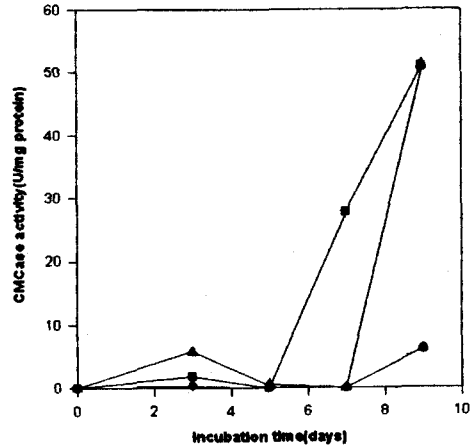


Fig. 4. Production of CMCCase from *Trichoderma reesei* QM 9414 (●) and mutant 1 (■) and mutant 2 (▲) in the Berkery medium of 1% glucose.

서 catabolite-derepression 성질을 정량적으로 조사하기 위해 repressor로 알려진 glucose를 탄소원으로 첨가한 Berkery media에서 균주를 배양하여 activity를 측정 한 결과를 Fig. 4, 5에 나타내었다. Cellulase의 생합성이 glucose에 저해를 받는다는 보고(El-Gogary 등, 1989)에서와 같이 모균주인 *T. reesei*는 glucose가 1% 첨가된 배지에서 cellulase합성에 저해를 받았다. 그 반면에 돌연변이주들은 CMCCase activity 경우 배양 9일째 각각 50.76 U/mg protein, 51.04 U/mg protein으로써 최고 활성을 나타내었으며 모균주와 비교 8.38, 8.42배 증가하는 것으로 나타났다. FPase activity의 경우 돌연변이주 1의 경우 배양 3일째 섬유소분해효소의 생성이 관찰되었으며 그 이후로 감소하여 다시 증가 배양 9일째 22.55 U/mg protein으로 최고활성을 나타내는 것으로 나타났으며 돌연변이주 2의 경우 배양 9일째 21.46 U/mg protein으로 최고활성을 나타내었으며 모균주와 비교 각각 5.68, 5.41배 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 돌연변이주들은 cellulase 생합성에서 glucose에 의한 catabolite repression을 받지않은 성질(즉, glucose-derepression)을 갖는 것으로 나타났다.

섬유소분해효소생성에 있어 유도체로 알려진 lactose(Ilmen 등, 1997; Morikawa 등, 1995)를

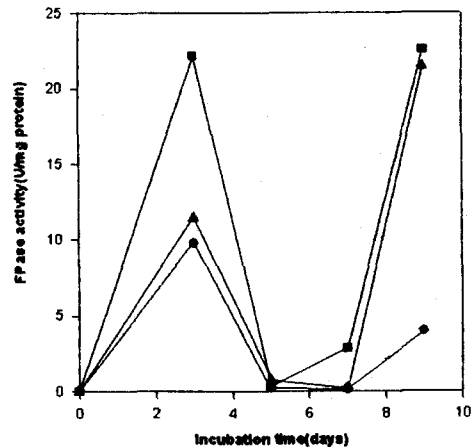


Fig. 5. Production of FPase from *Trichoderma reesei* QM 9414 (●) and mutant 1 (■) and mutant 2 (▲) in the Berkery medium of 1% glucose.

Berkery media에 첨가 섬유소분해효소를 유도시켜본 결과를 Fig. 6, 7에 나타내었다. Fig. 6에서 본 CMCCase activity결과 모균주는 cellulase의 생산이 5일까지 증가한 후 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 lactose의 분해에 의해 생성된 glucose가 배지 내에 축적 되어 cellulase 생산이 저해되는 것으로 추정된다. 돌연변이주 1은 cellulase 생산이 서서히 증가 배양 5일 이후 서서히 감소하는 것을 보였으며 돌연변이주 2는 배양 3일째 최고활

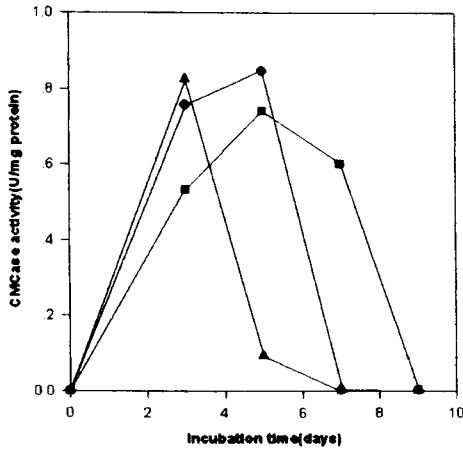


Fig. 6. Production of CMCCase from *Trichoderma reesei* QM 9414 (●) and mutant 1 (■) and mutant 2 (▲) in the Berkery medium of 1% lactose and 1% glucose.

성을 보인 후 급격한 감소를 보였다. Fig. 7에서 나타난 FPase activity 결과 모균주인 *T. reesei*는 배양 5일째 최고활성을 보인 후 cellulase 생산의 급격한 감소를 보였으며 돌연변이주 1은 배양 3일째 0.46 U/mg protein으로 최고활성을 보인 후 서서히 감소하였으며 돌연변이주 2는 배양 3일 이후 급속한 감소를 보였다. Fig. 6, 7의 결과로 돌연변이주 1은 모균주에 비해 lactose 유도시 결정형과 비결정형 섬유소의 중간형태인 filter paper의 분해

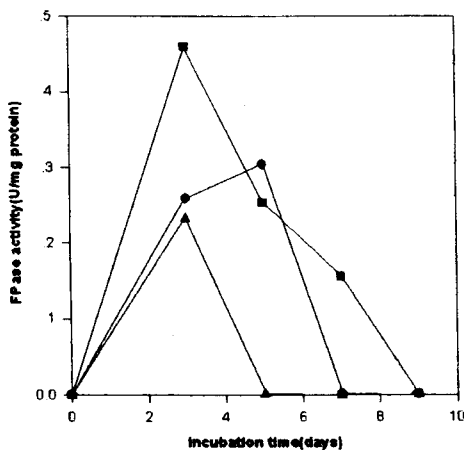


Fig. 7. Production of FPase from *Trichoderma reesei* QM 9414 (●) and mutant 1 (■) and mutant 2 (▲) in the Berkery medium of 1% lactose and 1% glucose.

능에 있어서 1.77배의 증가된 결과를 보였으며 cellulase 생산에 있어서 급격한 감소 없이 안정된 생산 형태를 보였다. 이에 반해 돌연변이주 2는 cellulase 생산의 유도에 있어서 모균주보다도 더 떨어지는 결과를 보였다. 이상의 결과로 돌연변이주 1이 더 우수한 돌연변이주로 추정된다. 따라서 cellulase 생산에서 최고의 inducer로 알려진 sophorose(El-Gogary 등, 1989; Morikawa 등, 1995; Ilmen 등, 1997)에 의한 유도실험이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

섬유소 분해효소의 일반적인 특성

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 여러 온도범위에서 효소액과 기질을 반응시켜 섬유소 분해 효소의 효소활성을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 모균주와 돌연변이주 모두 60°C에서 가장 높은 활성을 보임을 알 수 있었다. 또한, 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 측정하기 위하여 여러 pH범위를 갖는 각각의 완충용액을 만든 후 효소액과 기질을 반응시켜 섬유소분해효소의 효소활성을 측정하고 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. pH 3~6까지는 0.1 M Citrate-Phosphate buffer, pH 7, 8은 0.1 M Potassium Phosphate buffer, pH 9는 Glycine-NaOH buffer를 사용하여 섬유소분해효소활성을 측정하였다. 섬유소 분해

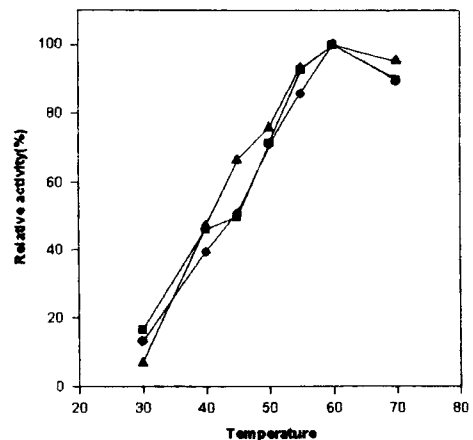


Fig. 8. Effect of temperature (°C) on the CMCCase activities of the enzyme from *Trichoderma reesei* QM 9414 (●) and mutant 1 (■) and mutant 2 (▲).

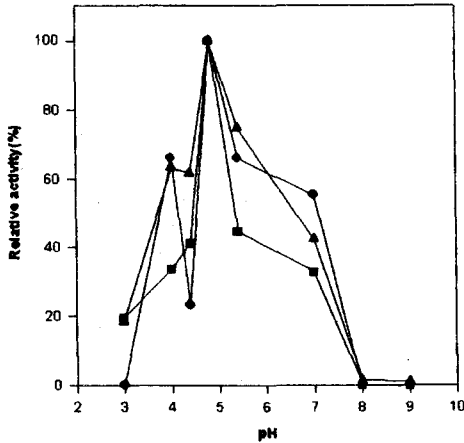


Fig. 9. Effect of pH on the FPase activities of the enzyme from *Trichoderma reesei* QM 9414 (●) and mutant 1 (■) and mutant 2 (▲).

효소는 모균주와 돌연변이주 모두 pH 4.8에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 pH 4.4~5.4의 산성조건에서 비교적 높은 활성을 나타내었고 pH 8이상의 알칼리성 조건에서는 활성이 급격히 감소됨을 보였다.

적 요

Trichoderma reesei QM 9414를 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine으로 처리하여 얻은 돌연변이주들을 여러 탄소원에서 배양했을 때 carboxymethylcellulose(CMC), filter paper 등의 기질에 대한 활성측정결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 모균주가 catabolite repression을 받는 반면에 돌연변이주들의 cellulase 활성은 glucose를 탄소원으로 사용한 배지에서 모균주에 비해 CMCase 8.4배, FPase가 5.4~5.7배 증가함으로써 glucose-derepression성질을 갖는 돌연변이주들을 얻었으며 glucose를 탄소원으로 사용하고 lactose로 효소의 생산을 유도시켜본 결과 모균주에 비해 효소의 생산에 안정성을 갖는 것으로 나타났으며 돌연변이주 1이 상대적으로 더 우수한 돌연변이주로 나타났다. 돌연변이주들에 의해 생산된 효소는 모균주와 마찬가지로 pH 4.8, 60°C에서 최적활성을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 인하대학교 교내연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 이철한. 1979. 섬유소 분해 효소 생산을 위한 조절 변이주의 개발 및 특성에 관한 연구. 고려대 석사학위 논문.
- 홍미경, 한효영, 정영희, 민경희. 1996. 고온성 변이균주 *Talaromyces luteus* 2004의 분리와 Carboxymethylcellulase의 생성 조절 및 효소의 특성. 한국균학회지 24(3): 206-213.
- Aho, S., Arffman, A. and Korhola, M. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* mutants selected for increased production of *Trichoderma reesei* cellulases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 36-45.
- Arsdell, J. N. V., Kwok, S., Schweickart, V. L., Ladner, M., Gelfand, D. H. and Innis, M. A. 1987. Cloning, characterization, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology.* 5: 60-64.
- Beguin, P. 1983. Detection of cellulase Activity in Polyacrylamide Gels Using Congo Red-Stained Agar Replicas. *Analy. Biochem.* 131: 333-336.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchert, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J. and Viikari, L. 1994. *Trichoderma reesei* cellulases in the bleaching of kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 941-945.
- Durand, H., Clanet, M. and Tiraby, G. 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme. Microb. Technol.* 10: 341-346.
- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D. E. and El-Dorry, H. 1989. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6138-6141.
- Fennington, G., Neubauer, D. and Stutzenberger, F. 1984. Cellulase Biosynthesis in a Catabolite Repression-Resistant Mutant of *Thermomonospora curvata*. *Appl. Environ. Mi-*

- crobiol.* 47(1): 201-204.
- Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P. and Kubicek, C. 1992. Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* RUT-C30 on hemicellulose substrates. *Microbiol. Biotechnol.* 315-322.
- Ghosh, A., Chatterjee, B. and Das, A. 1991. Production of Glucoamylase by 2-deoxy-D-glucose Resistant Mutant of *Aspergillus Terreus* 4. *Biotechnology Letters.* 13(7): 515-520.
- Imen, M., Saloheimo, A., Onnela, M. and Penttila, M. 1997. Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4): 1298-1306.
- Kleman-leyer, K., Siika-aho, M., Teeri, T. and Kirk, T. 1997. The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilize Native Cotton Cellulose but Not To Decrease Its Molecular Size. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8): 2883-2887.
- Kurzatkowski, W., Torronen, A., Filipek, J., Mach, R., Herzog, P., Sowka, S. and Kubicek, C.P. 1996. Glucose-Induced Secretion of *Trichoderma reesei* Xylanases. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8): 2859-2865.
- Morikawa, Y., Ohashi, T., Mantani, O. and Okada, H. 1995. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 106-111.
- Nakari-Setälä, T., and Penttilä, M. 1995. Production of *Trichoderma reesei* Cellulases on Glucose-Containing Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(10): 3650-3655.
- Nevalainen, H., Lavygina, I., Neethling, D. and Packer, N. 1995. The biochemical nature of the cell envelope of a high cellulase-secreting mutant differs from that of the *Trichoderma reesei* wild type. *Biotechnology.* 42: 53-59.
- Ogawa, K., Brown, J. A. and Wood, T. M. 1987. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM 9414 by protoplast fusion using colour mutants. *Enzyme. Microbiol. Technol.* 9: 229-232.
- Paice, M. G., Bernier, R. and Jurasek, L. 1988. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol Bioeng.* 32: 235-239.
- Penttilä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. and Knowles, J. 1986. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequences of the endoglucanase I gene. *Gene.* 45: 253-263.
- Ponce-Noyola, T. and Torre, M. 1995. Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Celulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 709-712.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. C. and Jones, T. A. 1990. Three-Dimensional Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science.* 249: 380-386.
- Sanchez-Torres, P., Gonzalez, R., Perez-Gonzalez, J. A., Gonzalez-Candelas, L. and Ramon, D. 1994. Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 440-446.
- Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kovak, S., Myambo, K. and Innis, M. 1983. Molecular cloning of exocellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* L 27. *Bio/Technology.* 1: 691-696.
- Stewart, B. and Leatherwood, J. M. 1976. Derepressed Synthesis of Cellulase by *Celulomonas*. *J. Bacteriol.* 123(2): 609-615.
- Teather, R. and Wood, P. 1982. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(4): 777-780.
- Wiley, J. 1982. Improvement of *T. reesei* Strain through Mutation and Selective Screening Techniques. *Biotechnology and Bioengineering.* 24: 241-243
- Winkelmann, G. 1992. Microbial Degradation of Natural Products. Winheim. New York. Basel. Cambridge. 84-126.
- Wong, W. K. R., Curry, C., Parekh, R. S., Parekh, S. R., Wayman, M., Davies, R. W., Kilburn, D. G. and Skipper, N. 1988. Wood Hydrolysis by *Celulomonas Fimi* Endoglucanase and Exoglucanase Coexpressed as Secreted Enzymes in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Bio/Technology.* 6: 713-719.
- Wood, P. J., Erfle, J. D. and Teather, R. M. 1988. Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases. *Methods Enzymol.* 160: 59-74.