

섬유소분해균인 *Trichoderma*屬의 群體生長의 유도에 관하여

朴 喜 門 · 洪 淳 佑 · 河 永 七

서울대학교 自然科學大學 微生物學科

Induction of Colonial Growth of the Cellulolytic Fungus, Genus *Trichoderma*

Park, Hee-Moon, Soon-Woo Hong and Yung-Chil Hah

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

ABSTRACT

The effect of growth inhibitors on colonial growth of cellulolytic fungus, genus *Trichoderma*, was investigated to develop a method for the effective screening of various auxotrophs and hypercellulolytic strains.

As the results, it was revealed that non-ionic detergents such as Sodium deoxycholate and Triton X-100 were the better ones as a growth inhibitor than Oxgall which has been used to restrict the colony size in genus *Trichoderma*. Each individual colony remained distinct on minimal plate supplemented with 0.05% Triton X-100 for as long as two or more weeks. The screening of 150 to 200 colonies simultaneous on a single plate was possible in the presence of Triton X-100. The effect of Triton X-100 on simultaneous screening was higher than that of Oxgall by a factor of two.

緒 論

*Trichoderma*屬의 絲狀菌類는 섬유소분해능이 높은 菌類들로 이미 섬유소분해효소의 특성(Bergham 등 1975; Halliwell 등 1973; Kubicek, 1982; Wood 등 1982) 및 효소 생산에 관한 조절기작 등에 대하여 많이 연구된 바 있으며(Loewenberg 1984; Nisizawa 등 1972; Sternberg 등 1982; Zhu 등 1982), 본인등에 의하여 세포학, 유전학적 연구 및 우수균주 개발의 일환으로 原形質體의 生成 및 融合에 이용되어지고 있다(Cho 등 1981a, b 1982; Lim 등 1983; Park 등 1982, 1983; Picataggio 등 1983). 그런데, 이들 菌類에서 섬유소분해능이 향상된 菌株과 다양한 유전자표식을 갖는 돌연변이주들을 효과적으로 선별해낼 수 있다면 이들 菌類의 活用가능성은 더욱 진작되어질 수 있을 것이다.

돌연변이주를 효과적으로 선별하기 위하여는 한장의 평판배지에 가능한한 많은 수의 菌體를

접종할 수 있어야 할 것이다. 그러나, *Trichoderma*屬의 菌類들은 일반적으로 고체배지상에서 퍼져자라, 균체를 각기 구분할 수 없는 단점을 갖고 있어 효과적인 돌연변이주의 선별이 상당히 어렵다. 菌類의 성장을 줄여 colonial growth를 유도하기 위하여 사용되는 성장저해제(growth inhibitor 또는 paramorphogen)들로는 *Neurospora crassa*에 최초로 이용된 L-Sorbose를 비롯하여 Rose-bengal, Sodium deoxycholate 등이 있으며, *T. viride*의 경우 Montenecourt와 Eveleigh(1977)가 Oxgall을 사용하여 균체의 성장을 줄일 수 있음을 보고한 바 있다. 그러나, *Aspergillus*屬의 경우 Sodium deoxycholate에 의하여 균체의 생장이 효과적으로 저해되는데 반하여, *Trichoderma*屬의 경우 Oxgall에 의하여 균체의 생장이 초기에는 다소 효과적으로 저해되기는하나 conidiation된후 약 4~5일정도 경과하면 각각의 colony가 상호접촉하여 균체의 구분이 어려웠다. 따라서, 본인등은 평판배지상에서 보다 효과적으로 균체의 크기를 줄일 수 있는 방법을 조사한

바 소기의 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌株 및 培地

菌株로는 *T. koningii* ATCC 26113을 사용하였으며, Potato dextrose agar (Difco) 사면배지에 접종한 후 28°C에서 3~4일간 培養하여 4°C에 보관하였다. 완전배지로는 Malt extract agar 培地 (malt extract 20g, peptone 1g, dextrose 10g, agar 10g/L)를 사용하였으며 최소배지로는 Mandel의 배지를 다소 변형하여 사용하였다 (Table 1 참조).

2. colonial growth 유도를 위한 배지 조성

최소평판배지에 L-Sorbose와 Oxgall은 최종농도가 1, 2, 3, 4, 5% (w/v) 되게 첨가하고 Sodium deoxycholate와 Triton X-100은 최종농도가 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0%가 되도록 첨가한 후 멸균하여 직경 9cm의 멸균된 petridish에 멸균된 pipette로 20ml씩 부어 그 두께가 일정한 평판배지를 만들었다.

3. Radial growth rate (Kr)의 측정

최소 평판배지에서 자란 균사체를 직경 4mm의 크기로 베어내어 새로운 최소평판배지에 옮겨 28°C에서 이틀간 배양한 후, 각종 성장저해제가 첨가된 上記의 최소평판배지에 4mm 직경으로 옮겼다. 이 평판배지들을 28°C에서 4~5일간 배양하면서 6시간 간격으로 균체의 직경을 측정하여 Kr값을 결정하였다. Kr값은 단위시간당 균

체의 직경증가를 측정하는 것으로 1971년 Trinci가 定義한 다음의 식에 의거하여 계산하였다.

$$Kr = \frac{R_1 - R_0}{t_1 - t_0}$$

R_1 ; colony radius at time t_1

R_0 ; colony radius at time t_0

4. Replica plating

T. koningii ATCC 26113의 conidia 현탁액을 최소평판배지에 접종한 후 28°C에서 4~5일간 培養하여 충분히 conidiation시키고, 이를 멸균된 이쑤시개로 성장저해제가 첨가된 최소평판배지와 완전평판배지에 접종하여 한장의 평판배지당 접종가능한 균체의 숫자를 조사하였다. 또한 conidia 현탁액을 적절히 희석한 후 최종농도가 0.05% (v/v) 되게 첨가된 완전평판배지 및 최소평판배지에 0.1ml씩 접종하고 멸균된 유리봉으로 도말하여 구분가능한 균체의 숫자를 조사하였다.

結果 및 考察

*T. koningii*의 경우 성장저해제를 첨가하지 아니한 평판배지에 접종한 경우 평판배지 전면에 퍼져자라 (Plate 1) 효과적인 돌연변이주의 선별을 위하여서는 균체의 크기를 줄일 필요가 있다. 지금까지 菌類에 있어 colony의 크기를 줄이기 위하여 L-Sorbose, Oxgall, Rose-bengal, Sodium deoxycholate, Saponin, Phosphon D, Polyethylene glycol, Triton X-100 등의 paramorphic agents들을 여러 絲狀菌類에 사용하여 왔다 (Table 2). 그런데 Montencourt 등이 *T. viride*의 경우 1.5% Oxgall을 배지에 첨가한 결과 효과적으로 균체의 크기를 줄일 수 있다고 하였으나, 이 경우 conidiation된 후 4~5일 경과하면 각 균체의 구분이 어려웠다. 따라서 *T. koningii*의 균체 크기를 효과적으로 줄일 수 있는 paramorphogen을 찾기 위하여 각종 paramorphogen의 첨가에 따른 colony의 radial growth rate를 조사·비교하여 보았다.

1. 각종 paramorphogen에 의한 radial growth rate의 변화

지금까지 colony의 크기를 효과적으로 줄일 수 있는 물질을 찾기 위하여 사용한 방법은 各種

Table 1. Ingredients of the minimal medium

Glucose	10g
KH ₂ PO ₄	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	1.4g
Urea	0.3g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3g
CaCl ₂	0.3g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4mg
MnSO ₄ ·7H ₂ O	1.56mg
CoCl ₂	2.0mg
Agar	15g
Distilled water	up to 1 L



Plate 1. *Trichoderma koningii* ATCC 26113 were seeded on the complete (A) and minimal (B) plates and incubated at 28°C for 3~4 days.

Table 2. List of paramorphogens used to induce the colonial growth of filamentous fungi

Paramorphogen	Organisms	References
Oxgall	<i>Fusarium graminearum</i>	Loureiro-Dias '82
	<i>Trichoderma viride</i>	Montenecourt & Eveleigh '77
	<i>Trichoderma koningii</i>	Park '82
Rose bengal	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Levadoux '80
	<i>Fusarium graminearum</i>	Loureiro-Dias '82
Sodium deoxycholate	<i>Aspergillus nidulans</i>	
	<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>	Gold & Cheng '78
	<i>Trichoderma viride</i>	Hyun et al. '77
L-Sorbose	<i>Coliobolus heterotrophs</i>	Leach et al. '82
	<i>Neurospora crassa</i>	Tatum et al. '49
	<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>	Gold & Cheng '78
Triton X-100	<i>Fusarium solani</i>	Van Etten & Kølmark '77
	<i>Neurospora crassa</i>	Rissler '83
	<i>Schizophyllum commune</i>	Morris & Motta '82
*Phosphon D		
Polyethyleneglycol	<i>Ceratocystis adiposa</i>	Skone & Dixon '81
	<i>Botrytis fabae</i>	"
	<i>Aspergillus chevalieri</i>	"
*Saponin		

*used with other paramorphogen (e.g. Oxgall, Sodium deoxycholate)

paramorphogen을 첨가한 평판배지에 conidia 현탁액을 접종한 후 배양하여 생성되는 colony중 구분이 가능한 균체의 수를 측정하여 paramorphogen의 효과를 판정하였다. 그러나 본 실험에서는 각종 paramorphogen을 첨가한 최소평판배지에 직경 4mm 크기의 균체를 접종하고 배양하면서, 각 균체의 radial growth rate을 측정하

여 가장 Kr 값이 적게 나타나는 경우를 가장 효과적으로 균체의 성장을 저해하는 것으로 판정하였다. 즉, 최소평판배지에 각종 paramorphogen을 첨가한 후 여기에 菌體를 접종하여 Kr 값을 결정하고(材料 및 方法 참조) paramorphogen을 첨가하지 아니한 최소평판배지상의 Kr 값을 기준으로한 백분율(% Kr 값)을 측정하였다. 그

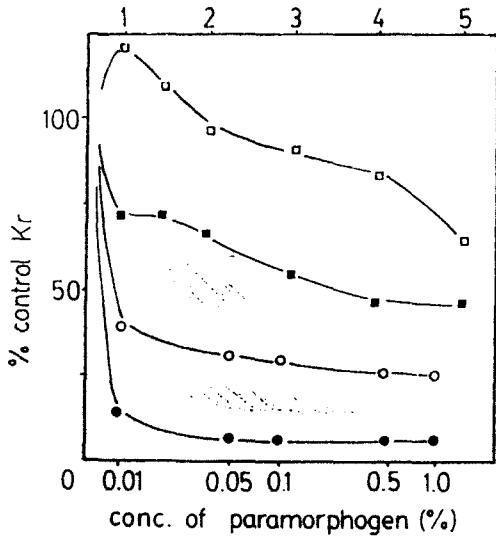


Fig. 1. Radial growth rates(Kr), as percentage control, of *T. koningii* on various concentration of sorbose(□), oxgall(■), sodium deoxycholate(○), and triton X-100(●).

結果 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 *N. crassa*의 경우에 효과적으로 사용된 바 있는 L-Sorbose는 최종 농도가 1%되게 첨가하였을 때, Kr 값이 증가하는 현상을 나타내었는데, 이는 *N. crassa*의 경우에도 이미 보고된 바 있듯이(Trinci 등 1973) L-Sorbose가 탄소원으로 이용되어 오히려 菌體의 성장을 촉진시켜주며, 고농도(5%)에서는 菌體의 성장을 억제시킴을 알 수 있다. 이미 *T. viride*에 있어 효과적인 성장저해제로 보고된 바 있는 Oxgall의 경우 최종농도가 1.5%일 때는 약 30%, 최종농도가 5%일 경우에는 50%정도 Kr 값이 감소함을 알 수 있었다. 반면 non-ionic detergent인 Sodium deoxycholate와 Triton X-100이 첨가된 경우에는 Kr 값의 감소가 급격히 이루어졌다. 즉, Sodium deoxycholate의 경우 최종농도가 0.01%(w/v)로 첨가되었을 때부터 Kr 값의 급격한 감소가 이루어지기 시작하여 최종농도가 1%인 경우에는 최소평판배지의 경우에 비하여 약 75%의 감소현상이 나타났다. Triton X-100의 경우 *Schizophyllum commune*과 (Morris 등 1982) *N. crassa*(Rissler 1983)의 경우와 마찬가지로 0.01%(v/v)의 저농도에서도 급격한 Kr 값의 감소(12.5%)가 이루어져 최종농도가 0.05% 이상일 때 95%이상의 Kr 값 감소현상이 이

Table 3. Radial growth rates (Kr) on various concentrations of Triton X-100 at 28°C

Concentration of Triton X-100	Radial growth rate at 28°C($\mu\text{m}/\text{h}$)	Percent Kr value
0	589 \pm 6	100
0.01	167 \pm 3	28.4
0.05	76 \pm 1	12.9

루어짐이 판명되었다. 이상의 결과로부터 종래에 사용한 Oxgall보다 nonionic detergent인 Triton X-100이 *Trichoderma*屬의 성장저해제로서 좋은 것임이 판정되었다. 실제 Triton X-100이 최종 농도 0.01% 및 0.05% 수준으로 첨가된 경우와 첨가되지 아니한 1% dextrose의 최소평판배지상의 radial growth rate를 자세히 살펴보면 Table 3에서와 같이, 1% dextrose의 최소 평판배지의 경우 단위시간당 약 589(\pm 6) μm 의 radial growth를 나타내는데 반하여 0.01% Triton X-100이 첨가된 경우에는 167(\pm 3) μm , 0.05% Triton X-100이 첨가된 경우에는 단위시간당 76(\pm 1) μm 수준의 radial growth를 나타내었다. 즉, 0.05% Triton X-100의 첨가에 의하여 Kr 값이 약 12.9% 수준으로 감소되었음을 알 수 있다. Triton X-100이나 Sodium deoxycholate 등의 paramorphogen이 이들 균류의 성장에 미치는 자세한 영향은 확실하지 않으나 *N. crassa*의 菌絲體 성장에 영향을 미치는 L-Sorbose의 경우와 유사하게(Trinci 등 1973), 菌絲의 성장시 branching이 더 많이 일어나게 하여 菌絲體 성장단위의 길이(length of growth units)를 상당수준 감소시킴으로써 종국적으로 균체의 균사체 밀도가 높은 colony가 형성되도록하거나, 菌絲體의 세포벽이나 원형질막에 영향을 주어 균사체의 자동분해(autolysis)를 촉진시킬 것으로 유추된다. Triton X-100이 균사체의 성장에 미치는 영향은 細胞學的 또는 生理學的 연구가 더 행해져야 할 것으로 이러한 연구는 지금 進行 중에 있으며 조만간 소기의 結果를 보고할 것이다.

2. 돌연변이주 선별에의 利用 가능성 검토

돌연변이주 특히 영양요구성 돌연변이주 선별의 경우를 감안하여 Triton X-100(0.05%)과 Oxgall(1.5%)가 각각 첨가된 최소평판배지와 완전평판배지에 멸균된 이쑤시개로 *T. koningii*

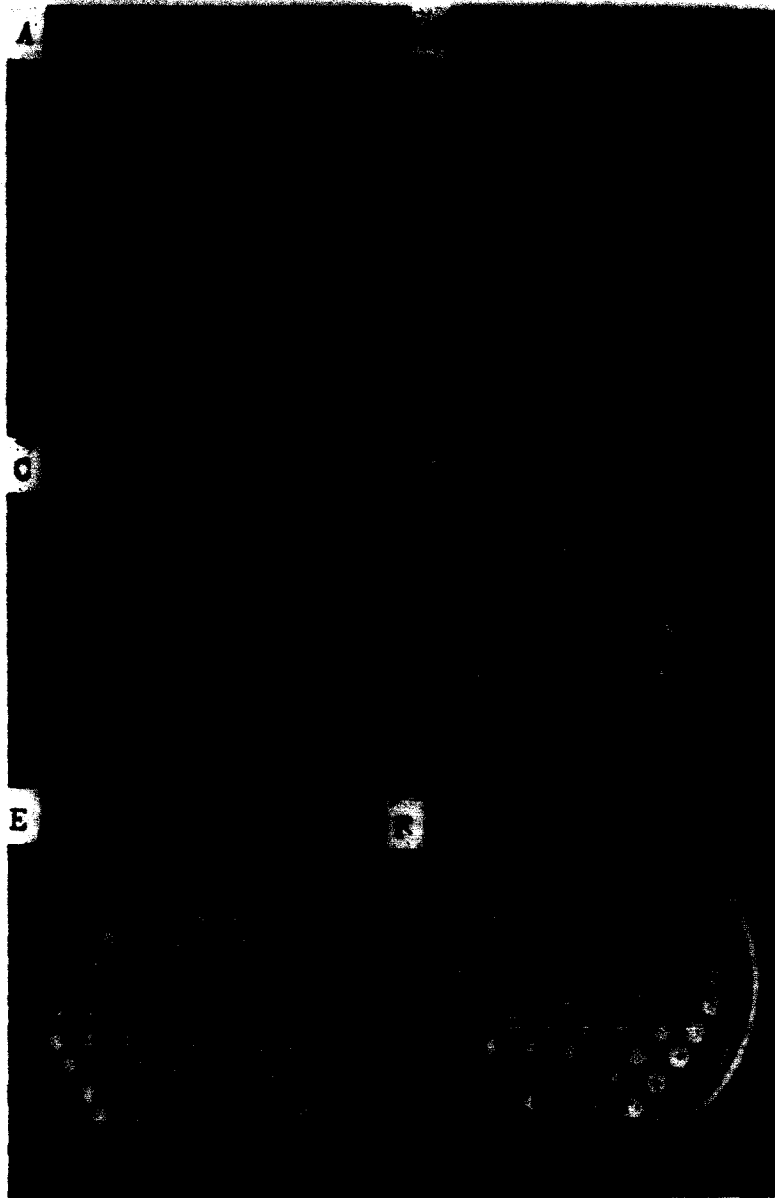


Plate 2. *Trichoderma koningii* ATCC 26113 were inoculated on the complete (A, C, E) and minimal (B, D, F) plates with sterilized tooth-picks. A, B; 1.5% (w/v) Oxgall was added, C, D, E, F; 0.05% Triton X-100 was added.

의 conidia를 접종하여 보았다. 그 結果, Plate 2에서 볼 수 있듯이, 각각 26개의 colony를 접종하였을 때 종래에 사용한 Oxgall의 경우(A, B) conidiation된 후 4~5일이 경과하면 균체가 상호 겹쳐져 각기의 colony를 구분하기 어려운데 반하여, Triton X-100이 첨가된 경우에는 완전평판배지 및 최소평판배지 모두 각 colony의 구분이 명확하게 이루어졌으며, 배양기간을 더 연장

하여도(1주일 이상) 이 현상은 유지되었다(Plate C, D). Plate E, F에서 볼 수 있듯이 완전평판배지와 최소평판배지에 60개의 균체를 접종한 경우에도 명확한 균체의 구분이 가능하였다.

T. koningii ATCC 26113의 conidia현탁액을 적절히 희석한 후 0.05% Triton X-100이 첨가된 완전평판배지와 최소평판배지에 0.1ml씩 접종하여 멸균된 유리봉으로 도달하고 28°C에서

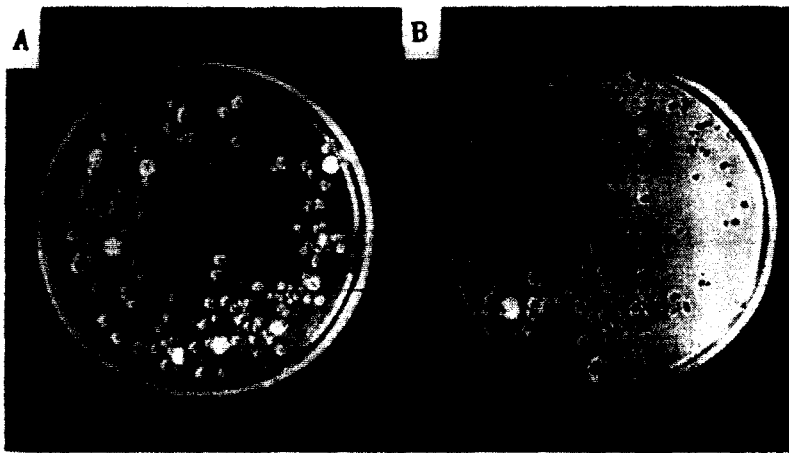


Plate 3. *Trichoderma koningii* ATCC 26113 spore suspension was plated on complete (A) and minimal (B) agar medium supplemented with 0.05% Triton X-100.

배양한 결과 Plate 3과 같이 두 가지 평판배지 상에서 모두 150~200개의 菌體를 구분할 수 있었는데, 이러한 결과는 Oxgll(1.5%)을 첨가하여 70~100개 가량의 *T. reesei* QM9414의 菌體를 상호 구분할 수 있었다고 보고한 Montencourt 등의 實驗結果보다 두 배가량 그 효율이 높은 것이었다. 또한 Triton X-100이 培地에 첨가된 경우 菌體의 생장은 저해되나 conidia 생성량은 별 변화가 없었으며, *T. koningii* 이외의 다른 絲狀 菌類에의 응용 가능성을 검토하기 위하여 *T. reesei* QM9414의 conidia 현탁액을 집중한 경우에도 *T. koningii*의 경우와 거의 同一한 結果를 얻을 수 있었다. 또한 *Aspergillus*屬의 菌類와 표고버섯類의 경우도 Triton X-100의 첨가에 의하여 菌體의 생장이 효과적으로 줄여짐을 관찰할 수 있었다.

이상의 結果들로부터, Triton X-100을 완전평

판배지와 최소평판배지에 첨가할 경우 *Trichoderma*屬의 생장이 colonial form으로 이루어져, 효율적인 돌연변이주의 선별이 가능한 것으로 사료되며, *Trichoderma*屬 뿐만아니라 여러 絲狀 菌類의 성장저해제로 使用될 수 있어 경제적인 돌연변이의 선별이 가능할 것으로 사료되는 바이다. 또한 菌絲體의 밀도가 높은 compact colony의 形成을 손쉽게 유도할 수 있으므로, phosphoric acid swollen cellulose나 carboxymethyl cellulose(CMC)를 기질로하는 평판배지 상에서, 이들 기질(탄소원)분해에 따른 clearing zone이 명확하게 나타남을 관찰할 수 있었다. 이로써, 섬유소분해능이 우수한 菌株(hypercellulolytic strain)의 선별이 종래의 方法보다 용이하게 이루어질 것이며, 이에 대한 자세한 實驗結果는 곧 보고할 예정이다.

摘 要

섬유소분해능이 높은 菌類로 알려져있는 *Trichoderma*屬의 야생형 菌株로부터 다양한 종류의 영양요구성 돌연변이주 및 섬유소분해능이 향상된 菌株를 效果의 방법으로 선별할 수 있는 方法을 개발하기 위하여, 菌體의 생장을 효율적으로 줄일 수 있는 성장저해제를 조사하여 보았다. 그 結果, 종래에 사용된 바 있는 Oxgall보다 Sodium deoxycholate나 Triton X-100등의 non-ionic detergent가 훌륭한 성장저해제로 作用함을 알 수 있었으며, 0.05% Triton X-100을 평판배지에 첨가한 경우 한 장의 평판배지 상에서 150~200여개의 菌體를 구분할 수 있었으며, 각각의 菌體는 최소평판배지 상에서는 2주일 가량 배양하여도 구분이 가능하였다. 이러한 結果는 종래에 사용되고 있는 Oxgall의 경우보다 훨씬 경제적이며 그 효율 또한 두 배 이상 높은 것이었다.

References

- Berghem, L.E.R. and U.B.A. Fredricksson, 1975. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: characterization and properties of a β -1,4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*, *Eur. J. Biochem.*, 53, 55-62.
- Cho, N.J., Y.H. Rhee and S.W. Hong, 1981a. Formation of protoplast from *Trichoderma koningii*, *Kor. J. Microbiol.*, 19(4), 186-191.
- Cho, N.J., H.M., Park and Y.H. Rhee, 1981b. Protoplast reversion of *Trichoderma koningii*, *Kor. J. Microbiol.*, 19(4), 192-198.
- Cho, N.J., 1982. Production of protoplast and protoplast fusion in *Trichoderma koningii*, M.S. Thesis, S.N.U.
- Gold, M.H. and T.M. Cheng, 1978. Induction of colonial growth and replica plating of the white rot Basidiomycete *Phanaerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 35(6), 1223-1226.
- Halliwell, G. and M. Griffin, 1973. The nature and mode of action of the cellulolytic components C₁ of *Trichoderma koningii* on native cellulose, *Biochem. J.*, 135, 587-594.
- Hyun, H.H., H.S. Baik, I.B. Lee and S.Y. Lee, 1978. Plating technique for cellulase mutants of *Trichoderma viride*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 6(3), 129-133.
- Kubicek, C.P., 1982. β -glucosidase excretion by *Trichoderma pseudokoningii*: correlation with cell wall bound β -1,3-glucanase activity, *Arch. Microbiol.*, 132, 349-354.
- Leach, J., B.R. Lang and O.C. Yoder, 1982. Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterotrophs*, *J. Gen. Microbiol.* 128, 1719-1729.
- Levadoux, W.L., K.F. Gregory and A. Taylor, 1981. Sequential cold-sensitive mutants in *Aspergillus fumigatus*. II. analysis by the parasexual cycle, *Can. J. Microbiol.*, 27, 295-303.
- Lim, H.M., H.M. Park, Y.C. Hah and S.W. Hong, 1983. Electron microscopic study of protoplasts released from mycelium of *Trichoderma koningii*, *Kor. J. Electron Microscopy*, 13(1), 49-61.
- Loewenberg, J.R., 1984. Sophorose induction of an intracellular β -glucosidase in *Trichoderma*, *Arch. Microbiol.*, 137, 53-57.
- Loureiro-Dias, M.C., 1982. Selective isolation of *Fusarium graminearum* mutants derepressed for production of β -glucosidase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(4), 744-746.
- Montenecourt, B.S. and D.E. Eveleigh, 1977. Semi-quantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(1), 178-183.
- Morris, B.B. and J.J. Motta, 1982. Isolation of an apparent temperature-sensitive cell cycle mutant of *Schizophyllum commune*, *Mycologia*, 74(3), 412-422.
- Nisizawa, T., H. Suzuki and K. Nisizawa, 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*, *J. Biochem.*, 71, 999-1007.
- Park, H.M., 1982. Studies on the mutagenesis by ultraviolet and segregation of hybrid in *Trichoderma koningii*, M.S. Thesis, S.N.U.
- Park, H.M., S.W. Hong and Y.C. Hah, 1983. Isolation of protoplast from conidiospore of *Trichoderma koningii*, *Kor. J. Microbiol.*, 21(4), 213-220.
- Picataggio, S.K., D.H.J. Schamhart, B.S. Montenecourt and D.E. Eveleigh, 1983. Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 121-128.
- Rissler, J.F., 1973. Azo dye colony staining technique to detect fungal mutants lacking β -glucosidase activity, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(1), 315-316.
- Skone, E.J. and P.A. Dixon, 1981. The effect of paramorphogens on growth kinetics of *Ceratocystis adiposa*, *Botrytis fabae* and *Aspergillus chevalieri*, *Microbios*, 32, 189-202.
- Sternberg, D. and G.R. Mandels, 1982. β -glucosidase induction and repression in the cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei*, *Experimental Mycology*, 6, 115-124.
- Tatum, E.L., R.W. Barratt and V.M. Cutter, 1949. Chemical induction of colonial paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*, *Science*, 109, 509-511.
- Trinci, A.P.J. 1971. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media, *J. Gen. Microbiol.* 67, 325-344.

- Trinci, A.P.J. and A. Collinge, 1973. Influence of L-sorbose on the growth and morphology of *Neurospora crassa*, *J. Gen. Microbiol.*, 78, 179-192.
- Van Etten, H.D. and H.G. Kolmark, 1977. Modifying the growth habit of the filamentous fungus *Fusarium solani* to facilitate replica plating procedures, *Canad. J. Bot.*, 55, 848-851.
- Wood, T.M. and S.I. McCrae, 1982. Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*, *J. Gen. Microbiol.*, 128, 2973-2982.
- Zhu, Y.S., Y.Q. WU, W. Chen, C. Tan, J.H. Gao, J.X. Fei and C.N. Shih, 1982. Induction and regulation of cellulase synthesis in *Trichoderma pseudokoningii* mutants EA₃-867 and N₂-78, *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 3-12.