

Cellulase를 생산하는 *Bacillus* sp. 79-23 분리와 효소 생산성

윤기홍* · 정경화¹ · 박승환¹

우송산업대학교 식품생명공학과, ¹생명공학연구소 미생물분자유전학전문연구 Unit

Isolation and Enzyme Production of a Cellulase-producing *Bacillus* sp. 79-23. Ki-Hong Yoon*, Kyung Hwa Jung¹ and Seung-Hwan Park¹. Department of Food Biotechnology, Woosong University, Taejeon 300-100, Korea, ¹Bacterial Molecular Genetics RU., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea - A bacterium producing the extracellular cellulases was isolated from soil and has been identified as *Bacillus* sp. The isolate, named *Bacillus* sp. 79-23, was shown to be very similar to *B. subtilis* on the basis of its biochemical properties. The carboxymethyl cellulase (CMCase) of culture supernatant was most active at 60°C and pH 6.0, and retained 90% of its maximum activity at pH 7.0. The additional carbon sources affected the CMCase productivity than nitrogen sources in the culture medium. The carbon sources including wheat bran, rice straw, maltose and glucose increased the enzyme productivity. Especially, the maximum CMCase production was 5.2 units/ml in LB medium supplemented with 3% (w/v) wheat bran, which was 13-folds more than that in LB medium. It was found that the enzyme production was in association with the growth of *Bacillus* sp. 79-23. But, whean bran did not affect the growth of isolate, suggesting that increasement of CMCase production was owing to the induction of CMCase biosynthesis by wheat bran. In addition, both water-soluble and insoluble components of wheat bran was involved in induction of CMCase biosynthesis.

Endo- β -1,4-glucanase(carboxymethyl cellulase:CMCase)는 exo- β -1,4-glucanase, β -glucosidase와 더불어 cellulase계 구성효소로서 재생자원인 농·임산 폐자원의 당화, 과일음료와 맥주의 청징, 사료의 가공 및 폐지의 재생 등에 이용되는 산업용 효소이다(1, 2). 최근들어 cellulase는 면직물 제품의 보습성과 촉감의 유지를 위한 세제로써 뿐만 아니라 indigo로 염색된 청바지의 탈색가공 효소로 사용량이 급격히 증대되면서 전체 효소시장에서 차지하는 비중이 약 15%에 달하고 있다.

자연계에 존재하는 중온성, 고온성, 산성, 염기성, 중성, 혐기성, 호기성의 여러종류 곰팡이와 세균에서 다양한 cellulases가 분리·정제되어 효소적 특성이 밝혀졌다. 그리고 그들을 코딩하는 유전자들의 염기배열이 결정되어 효소의 1차 구조로부터 효소간의 활성지역의 분석을 통한 유사성 비교 연구가 가능해짐에 따라 현재 CMCase는 xylanase와 함께 9개 그룹으로 분류되고 있다(3-5). 섬유물질 분해세균은 대부분이 *Trichoderma reesei*와 같은 곰팡이와는 달리 cellulase계 효소들을 모두 효과적으로 생산하지 못하지만 CMCase는 보편적으로 생산하며 곰팡이와 같이 2개 이상의 서로 다른 CMCase를 생산하기도 한다. 한편, 곰팡이의 cellulase는 중

온과 산성 pH에서 최대반응 활성을 보이는 것이 대다수인데 비해 세균이 생산하는 cellulase의 반응특성은 다양하여 중성이나 알칼리성 또는 내열성 CMCases들이 발견되었으므로 세균의 효소 생산성이 낮기는 하지만 용도에 알맞는 효소를 확보하기 위해서는 세균성 CMCases를 탐색하는 것이 바람직하다.

유전자 조작에 의해 cellulase를 과잉 생산하는 유전자 재조합 균주의 개발이 이루어지고 있지만 (6), 실제 아직까지 cellulase의 생합성 조절 기작이 확실하게 밝혀지지 않았다. 일반적으로 cellulase의 생합성은 섬유소보다 쉽게 대사될 수 있는 분자량이 작은 탄소원의 존재에 의해 억제되거나 섬유소와 섬유소 분해물에 의해 유도되는 2가지 조절기작에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다. 몇 종류의 세균에서 cellulase 생합성 조절에 대한 연구가 진행되었는데 *Thermomonospora fusca*에서 CMCase 생합성은 세포내의 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 수준에 의해 영향을 받으며 cellulose와 cellobiose에 의해 유도된다(7). *Cellulomonas fimi*(8)와 *Clostridium thermocellum*(9, 10)에서는 cellulase계 각 효소 유전자는 다른 조절기작에 의해 전사되는 것으로 알려져 있는데, *C. thermocellum*에서 Avicel 분해효소 생합성이 쉽게 대사되는 탄소원에 의해 억제되는 반면에 CMCase 생합성은 영향을 받지 않는다. *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*에서는 CMCase가 Avicel, CMC, filter paper에 의해 생산이 유도되고 cellobiose, glu-

*Corresponding author

Tel. 82-42-630-9742, Fax. 82-42-636-2676

E-mail: ykh@ns.woosong.ac.kr

Key words: *Bacillus*, Identification, Wheat bran, Cellulase, Cellulase production

cose, xylose에 의해 억제되는 것으로 보고되었다(11).

본 연구에서는 중성 CMCcase를 생산하는 미생물을 토양으로부터 분리하여 이를 동정하고 배지조성이 분리균의 CMCcase 생산성에 미치는 영향과 효소의 반응특성을 검토하였다.

재료 및 방법

배지

토양으로부터 미생물을 분리하기 위해서 복합 한천배지(yeast extract, 5 g; bacto-tryptone, 5 g; polypeptone, 5 g; beef extract, 5 g; NaCl, 2 g; K_2HPO_4 , 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; agar, 22 g; water, 1 liter; pH 7.0)를 사용하였으며 CMCcase를 생산하는 분리균 *Bacillus* sp. No. 79-23의 효소 생산량 조사를 위한 기본배지로는 LB 액체 배지와 Spizizen의 최소배지(SMM)를 사용하였다(12).

Cellulase 생산균의 탐색

Cellulase를 생산하는 고온성 미생물 분리를 위해 토양 시료 1 g을 0.85% NaCl 용액 10 ml에 현탁하고 현탁액의 적당량을 취하여 0.5%의 carboxymethyl cellulose (CMC)와 trypan blue(80 mg/l)를 첨가한 복합한천 배지에 도말한 후 55°C에서 배양하였다. 콜로니가 형성된 후 그 주위의 CMC의 분해 환이 나타난 균들을 선별하였다. 선별균주의 동정은 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사함으로써 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(13)에 따라서 실시하였다.

CMCase 활성 측정

Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다(14). 증류수에 현탁시킨 1.0%(w/v) CMC 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 glucose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다.

효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 CMC로부터 1 μ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

Cellulase 생산균의 분리와 동정 및 특성

Table 1. Morphological and biochemical properties of *Bacillus* sp. 79-23

| Characteristics | <i>Bacillus</i> sp. 79-23 |
|-----------------------------|---------------------------|
| Gram staining | + |
| Motility | + |
| Cell form | Rod |
| Spore formation | + |
| Catalase | + |
| Voges-Proskauer | + |
| Acid from glucose | + |
| β -Galactosidase | + |
| Arginine dihydrolase | - |
| Lysine decarboxylase | - |
| Ornithine decarboxylase | - |
| Citrate utilization | + |
| H ₂ S production | - |
| Urease | - |
| Tryptophan deaminase | - |
| Indole production | - |
| Nitrate reduction | + |
| Gelatin hydrolysis | + |

+, Positive; -, Negative.

CMC와 trypan blue를 첨가한 배지를 사용하여 토양으로부터 cellulase를 생산하는 고온성 미생물을 탐색하여 CMCcase 활성이 높은 균을 최종적으로 1주 분리하였다. 분리 균주는 호기성 균이며 그람 양성간균으로 밝혀졌고 API 20 E 균 동정 kit를 이용하여 생화학적 특성을 조사한 결과, Table 1에서 나타난 것과 같이 *Bacillus*속 균주로 판별되었으므로 이를 *Bacillus* sp. 79-23으로 명명하였다. 또한 API 50 CHB 균 동정 kit(bioMerieux Vitek, Inc.)를 이용하여 *B. subtilis* IS75와 비교한 결과 50종류의 탄수화물에 대한 조사항목 중 raffinose에 대해서만 성격을 달리하고 나머지는 동일한 것으로 나타나 분리균은 *B. subtilis*에 속하는 것으로 판단된다. 배양온도를 조사한 결과 *Bacillus* sp. 79-23은 60°C 이상에서는 생육하지 못하였으나 55°C까지는 정상적인 성장을 하였으며 액체배지에서 진탕배양한 결과 배양온도를 45°C로 하였을 때 가장 생육정도가 우수한 것으로 나타났으며 *B. subtilis* IS75와는 달리 배양시 점질성물질을 많이 생산하였다.

Cellulase의 반응특성

Bacillus sp. 79-23이 세포외로 분비 생산하는 cellulase가 CMC를 가수분해하는데 있어서 반응온도와 pH가 미치는 영향을 조사하기 위해 배양상등액을 ultrafiltration하여 분자량 10 kDa 이상의 단백질을 농축하고 이 농축액을 ammonium sulfate로 분획하여 얻은 침전물을 20 mM Na \cdot phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁한 후 동일한 완충용액으로 투석하였다. 분획된 단백질 중 CMC-

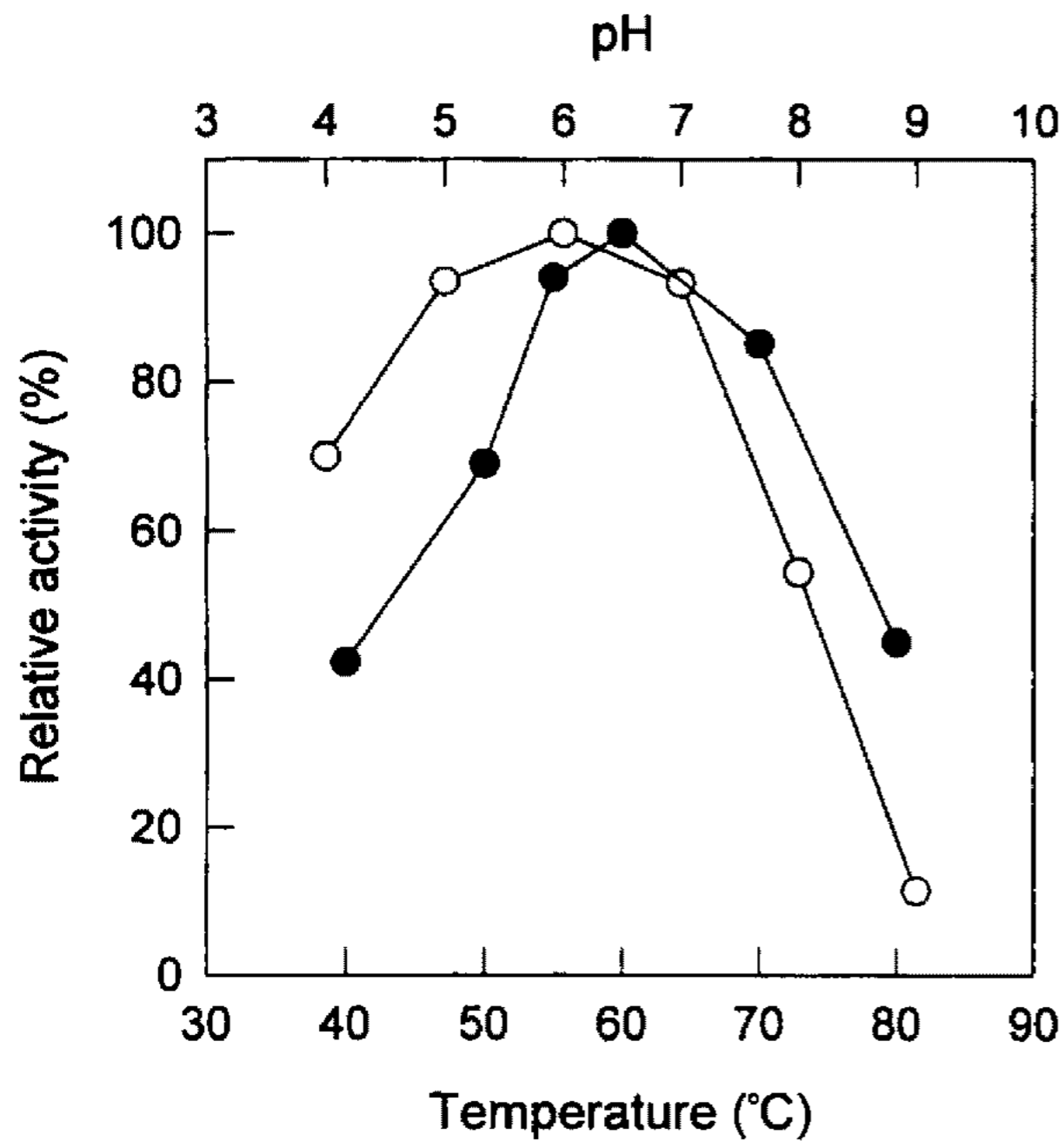


Fig. 1. Effects of reaction temperature and pH on the CMCase activity.

Temperature profile (—●—) was obtained by measuring the CMCase activities at pH 7.0 and different temperatures. The reactions was done at 50°C and various pHs for determining the pH profile (—○—). The following buffer systems were used: pH 4.0 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate; pH 8.0 to 9.0, 50 mM Tris · HCl.

ase 활성을 갖는 부분을 모아 조효소액으로 사용하여 반응온도와 pH를 달리하여 CMCase 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보인바와 같이 60°C와 pH 6.0에서 최고의 CMCase 활성을 보였으며 pH 7.0에서도 약 90% 이상의 활성을 나타내 *Bacillus* sp. 79-23이 생산하는 cellulase가 중성 pH에서 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 실제 *Bacillus* sp. 79-23이 생산하는 cellulase를 완전히 정제하지 않았기 때문에 몇 종류의 효소가 존재하는지는 알 수 없으나 반응에 사용하였던 조효소액에 의해 para-nitrophenyl β -glucoside가 전혀 분해되지 않는 것으로 확인되어 조효소액에는 β -glucosidase의 활성은 없는 것으로 판단된다. 또한 대부분의 *Bacillus*속 균주에서 exo- β -1,4-glucanase의 활성이 나타나지 않는 것으로 알려져 있으므로 반응에 사용하였던 *Bacillus* sp. 79-23의 조효소액의 cellulase 활성은 CMCase 활성으로 여겨진다.

탄소원의 종류에 따른 효소 생산성

미생물의 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄소원에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으므로 탄소원이 *Bacillus* sp. 79-23의 cellulase 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 LB 배지를 기본배지로 하여 부가 탄소원으로는 따로 멸균된 glucose, xylose, maltose, la-

Table 2. Effects of additional carbon sources on the CMCase production

| Carbon | CMCase production (Unit/ml) | Relative productivity (%) |
|------------|-----------------------------|---------------------------|
| None | 0.4 | 100 |
| Glucose | 1.3 | 325 |
| Xylose | 0.9 | 225 |
| Maltose | 1.4 | 350 |
| Lactose | 0.6 | 150 |
| Starch | 0.9 | 225 |
| CMC | 0.9 | 225 |
| Rice straw | 1.5 | 375 |
| Wheat bran | 1.7 | 425 |

ctose를 1%(w/v), 전분, CMC, 벧짚, 밀기울은 0.5%(w/v)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 9~10시간 배양하여 정지기에 이르렀을 때 배양상등액에 존재하는 CMCase 활성을 조사하였다. 이때 배양 상등액에 잔존하는 환원당으로 인해 효소활성 측정에 문제점이 있는 경우에는 배양상등액에 존재하는 단백질을 아세톤(-20°C)으로 침전하여 침전된 단백질을 효소 반응에 사용하였는데 밀기울, 벧짚, maltose, glucose를 첨가하였을 때 부가 탄소원을 첨가하지 않았을 때 보다 배양액당 효소의 생산성이 300% 이상 향상되었으며 특히 밀기울과 벧짚의 경우 효소 생산량이 약 400% 이상 상승되었음이 확인되었다(Table 2).

질소원의 종류에 따른 효소 생산성

질소원이 CMCase 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 *Bacillus*속 균주의 최소배지인 SMM 배지성분 중 ammonium sulfate를 제거하고 탄소원으로는 glucose (0.5%) 혹은 밀기울(3.0%)을 첨가한 배지를 기본배지로 하여 질소원의 종류를 각각 달리하여 0.5%가 되도록 첨가한 후 배양하였다. 배양상등액에 존재하는 CMCase 활성을 측정한 결과, 무기질소원 보다는 유기질소원을 첨가하였을 때 효소 생산량이 많은 것으로 나타났으며 또한 부가 탄소원으로 glucose를 사용하였을 때 보다 밀기울을 사용하였을 때 효소 생산이 더 증대되었다(Table 3). 특히 무기질소원을 함유한 배지에서는 탄소원으로 밀기울이 첨가되었을 때보다 glucose가 첨가되었을 때 훨씬 효소 생산량이 적었는데, 이는 밀기울에 존재하는 유기질소원의 이용에 따른 것으로 무기질소원만 이용할 때는 성장정도가 낮기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 사용된 유기질소원 중에서 polypeptone, yeast extract, casamino acid, tryptone, bacto-peptone에 의해 비슷한 수준으로 효소 생산량이 증대되었으나 이는 밀기울 (0.5%)이 첨가된 LB 배지에서의 CMCase 생산성 보다는 낮았다. 이는 질소원의 함량과 관련이 되는 것으로 판단되며, 질소원이 탄소원보다는 효소 생산성에 미치는 영향이 적은 것을 알 수 있다.

Table 3. Effects of additional nitrogen sources on the CMCase production

| Nitrogen | CMCase production (Unit/ml) in SMM medium supplemented with | |
|-------------------|---|------------|
| | glucose | wheat bran |
| None | 0.2 | 0.6 |
| Ammonium sulfate | 0.2 | 0.7 |
| Ammonium chloride | 0.2 | 0.6 |
| Sodium nitrate | 0.2 | 0.7 |
| Yeast extract | 0.5 | 1.0 |
| Casamino acid | 0.5 | 0.9 |
| Bacto-peptone | 0.4 | 0.9 |
| Tryptone | 0.4 | 0.9 |
| Polypeptone | 0.6 | 1.0 |
| Skim milk | 0.3 | 0.7 |
| Soybean paste | 0.2 | 0.6 |

벼짚과 밀기울의 첨가량이 효소 생산성에 미치는 영향 부가 탄소원 중 밀기울과 벼짚에 의한 효소 생산량의 증가는 이들 탄소원이 값싼 원료라는 측면에서 매우 의미가 있다고 평가된다. 그러므로 배지내 이들의 첨가량이 효소 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 배지에 이들의 양을 달리 첨가하고 효소 생산량을 조사한 결과, 밀기울 첨가량이 2%가 될 때까지 효소 생산량이 증가되었으며 그 이상에서는 효소 생산량의 변화가 크게 일어나지 않았다(Table 4). 벼짚의 경우는 0.5%를 첨가하였을 때 가장 효소 생산량이 높았으나, 그 이상이나 이하의 양에서는 생산량이 감소하였다.

Bacillus sp. 79-23의 CMCase 생산량 증가의 현상이 밀기울의 성분 중 수용성물질과 불용성물질 중 어느 것에 의해 일어나는지 분석하기 위해 밀기울을 3%가 되도록 수용액에 녹이고 원심분리함으로써 침전되는 불용성

물질과 상등액의 수용성물질을 각각 첨가한 LB 배지를 제조하였다. 이러한 배지에서 *Bacillus* sp. 79-23의 CMCase 생산량을 3%의 밀기울을 그대로 첨가한 배지에서 생산된 효소량과 비교한 결과, 밀기울을 그대로 첨가하였을 때 생산량이 가장 우수하였으며 이에 비해 수용성물질을 첨가한 배지에서는 약 38%, 불용성물질을 첨가한 배지에서는 58%의 효소 생산성을 보였다. 그러나 수용성이나 불용성물질만을 첨가하였을 때 효소 생산량은 낮아졌지만 부가탄소원을 첨가하지 않은 LB 배지에서 보다는 배양액에 효소활성이 높은 것으로 보아 밀기울에 존재하는 물질 중 불용성성분과 수용성성분이 모두 효소 생산량 증대에 관여하는 것으로 판단된다.

Bacillus sp. 79-23의 성장과 cellulase 생산

질소원에 따라서도 효소 생산성에 차이는 있었지만 탄소원에 의한 효소 생산성의 차이보다는 적었으므로, 효소 생산량에 가장 영향을 미치는 것으로 확인된 밀기울을 사용하여 효소 생산량 증가가 미생물의 성장정도의 증가에 기인된 것인지 아닌지를 검토하였다. 탄소원을 첨가하지 않은 LB 배지와 부가 탄소원으로 밀기울이 3% 되도록 첨가된 LB 배지를 각각 200 ml씩 함유한 1-liter baffled 플라스크에 미리 LB 배지에서 배양된 *Bacillus* sp. 79-23 배양액을 1%가 되도록 접종하여 37°C에서 진탕배양하면서 일정시간 마다 미생물의 성장과 효소 생산과의 관계를 조사하였다. 이때 밀기울을 첨가한 배양액의 흡광도를 측정하는 것이 불가능 하였으므로 미생물의 성장은 배양액을 희석하고 LB 한천배지에 도말하여 형성되는 콜로니 수를 측정함으로써 조사하였고 배양액에 존재하는 CMCase의 활성을 측정함으로써 효소 생산성을 결정하였다.

Bacillus sp. 79-23는 Fig. 2에서 보인바와 같이 두 배지에서 모두 매우 빠른 성장을 하였으며 성장정도도 유사하여 약 6시간 후에는 정지기에 이르는 것으로 나타났다. CMCase의 생산성은 미생물의 성장 정도에 따라 증가하는 현상을 보여 배양시간이 10시간이 될 때까지 계속적으로 증가하였는데 LB 배지에서는 생산성 증가정도가 미약하여 0.39 U/ml이었으나 밀기울을 첨가한 배지에서는 4.0 U/ml로 밀기울에 의해 약 10배 이상 효소 생산성이 높은 것으로 나타났다. 또한 Fig. 2에는 나타내지 않았지만 24시간 후에 배양액의 효소활성을 측정한 결과, LB 배지에서는 배양상등액의 CMCase 활성이 0.33 U/ml로 약간 줄어들었지만 밀기울을 첨가한 배지에서는 5.2 U/ml로 10시간 배양하였을 때 보다 증가된 것으로 확인되었다. 이와 같이 균의 성장정도에는 차이가 없는 데도 불구하고 밀기울 첨가에 의해 효소의 생산성이 증가되는 것으로 보아 밀기울에 존재하는 물질들에 의해 CMCase 생산이 유도되는 것을 알 수 있다. 이러한 *Ba-*

Table 4. Effects of various amounts of wheat bran and rice straw on the CMCase production

| | CMCase production (Unit/ml) | Relative productivity (%) |
|------------|-----------------------------|---------------------------|
| None | 0.4 | 100 |
| Wheat bran | | |
| 0.5% | 1.6 | 400 |
| 1.0% | 2.5 | 625 |
| 2.0% | 3.8 | 950 |
| 3.0% | 4.0 | 1,000 |
| 4.0% | 3.9 | 975 |
| 5.0% | 4.0 | 1,000 |
| Rice straw | | |
| 0.1% | 1.0 | 250 |
| 0.3% | 1.0 | 250 |
| 0.5% | 1.4 | 350 |
| 0.7% | 1.0 | 250 |
| 1.0% | 1.1 | 275 |
| 3.0% | 0.8 | 200 |

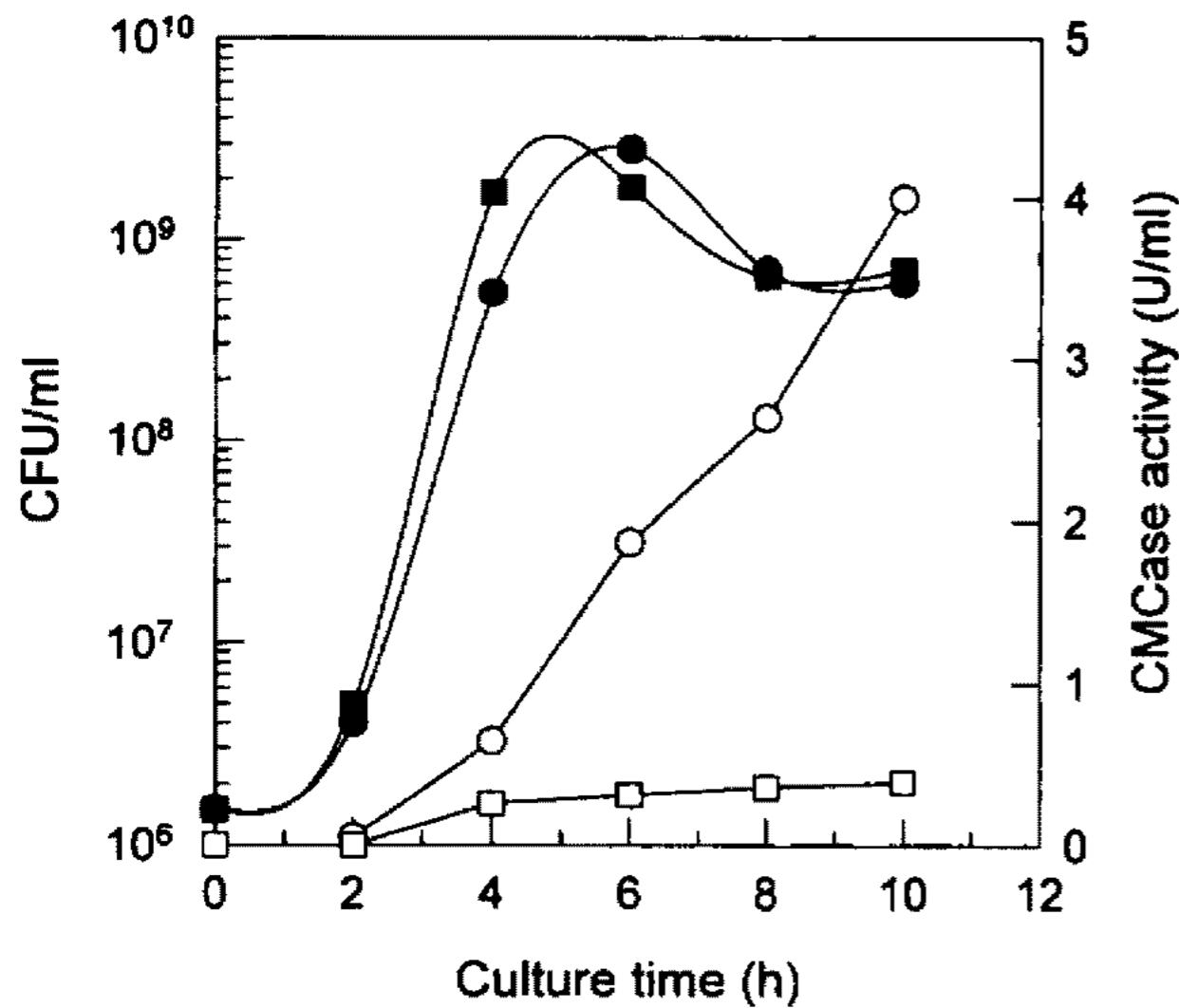


Fig. 2. Growth and CMCCase production of *Bacillus* sp. 79-23. *Bacillus* sp. 79-23 was grown respectively in LB broth (squares) and LB broth supplemented with 3% wheat bran (circles) at 37°C with vigorous shaking. The colony forming units of culture broth (closed symbols) were determined by measuring numbers of colonies formed on the LB agar plates. CMCCase activities (open symbols) were determined with the culture supernatants.

Bacillus sp. 79-23의 효소 생산량 증가는 이 균주로부터 CMCCase 유전자를 크로닝하여 *B. subtilis*에서 과잉발현 시킴으로써 증가된 효소생산량인 8.5 U/ml과 비견될 수 있는 수준으로 평가되었다(15). 특히 재조합 *B. subtilis*의 발효시 재조합플라스미드의 불안정성으로 인해 효소 생산성이 감소되는 경우가 발생할 수 있다는 문제점을 고려해 볼 때(16), *Bacillus* sp. 79-23를 직접 이용한 CMCCase의 생산성 증대는 의미가 크다고 여겨진다. 또한 *Bacillus* sp. 79-23의 돌연변이 유도를 통한 변이주 개발과 배양 방법의 최적화를 통해 CMCCase의 생산성을 더 향상시킬 수 있을 것으로 판단되므로 현재 면직물 가공효소로 이용되고 있는 곰팡이 유래의 산성 cellulase를 중성 cellulase로 대체하는데 이용될 수 있을 것이다.

요 약

토양으로부터 CMC의 분해능이 우수한 *Bacillus* sp. 79-23을 분리하고 동정하였는데 분리균의 생화학적 성질은 *B. subtilis*와 거의 동일한 것으로 나타났다. 분리균이 생산하는 CMCCase는 60°C와 pH 6에서 최대활성을 보였으며 pH 7.0에서도 약 90% 정도의 효소 활성을 나타냈다. 배지의 탄소원은 질소원 보다 CMCCase 생산성에 크게 영향을 미치는 것으로 확인되었으며 밀기울, 벳짚, glucose, maltose 등에 의해 효소 생산성이 증가되었다. 특히 밀기울을 3% 함유한 LB 배지에서 24시간 배양하였을 때 배양상등액의 CMCCase 활성은 5.2 units/ml로 밀기울을 첨가하지 않았을 때 보다 13배 이상이 증가하였으

며 CMCCase는 미생물의 성장과 연계되어 생산되었다. 밀기울에 의해 *Bacillus* sp. 79-23의 성장정도는 달라지지 않았는데 이로 보아 밀기울에 의한 CMCCase 생산성 증가는 밀기울이 CMCCase 생합성을 유도하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 밀기울의 성분 중 수용성물질과 불용성물질이 모두 효소 생합성 유도에 관여하는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 과학기술처 선도기술개발 사업과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Beguin, P. and J.-P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 25-58.
- Gilbert, H. J. and G. P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.
- Gilkes, N. R., B. Henrissat, D. G. Kilburn, R. C. Miller, Jr. and R. A. J. Warren. 1991. Domains in microbial β -1,4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* **55**: 303-315.
- Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 39-67.
- Tomme, P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 1-81.
- Beguin, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 219-248.
- Lin, E. and D. B. Wilson. 1987. Regulation of β -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1352-1357.
- Greenberg, N. M., R. A. J. Warren, D. G. Kilburn, and R. C. Miller, Jr. 1987. Regulation and initiation of *cenB* transcripts of *Cellulomonas fimi*. *J. Bacteriol.* **169**: 4674-4677.
- Johnson, E. A., F. Bouchot, and A. L. Demain. 1985. Regulation of cellulase formation in *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2303-2308.
- Shinmyo, A., D. V. Garcia-Martinez, and A. L. Demain. 1979. Studies on the extracellular cellulolytic enzyme complex produced by *Clostridium thermocellum*. *J. Appl. Biochem.* **1**: 202-209.
- Hazlewood, G. P., J. I. Laurie, L. M. Ferreira, and H. J. Gilbert. 1992. *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*: an alternative model for bacterial cellulase. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 244-251.
- Spizizen, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 407-408.
- Claus, D. and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, Pp 1105-1139. In P. H. A. Sneath (ed.),

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
14. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**: 127-132.
 15. Jung, K. H., Y. C. Chun, J. -C. Lee, J. H. Kim, and K. -H. Yoon. 1996. Cloning and expression of a *Bacillus sp.* 79-23 cellulase gene. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1077-1082.
 16. Bron, S. 1990. Plasmids, Pp 75-175. In C. R. Harwood and S. M. Cutting (eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley & Sons, UK.

(Received 11 November 1997)