

## 셀룰라아제와 베타글루코시다아제의 혼합효소를 사용한 섬유소-가수분해반응의 최적조건

손민일·†김태옥  
명지대학교 공과대학 화학공학과  
(접수 : 1997. 8. 7., 게재승인 : 1997. 12. 1.)

### Optimum Conditions of Cellulose-Hydrolysis Reaction with Mixed Enzymes of Cellulase and $\beta$ -Glucosidase

Min-Il Son and Tae-Ok Kim†

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Myong Ji University, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea  
(Received : 1997. 8. 7., Accepted : 1997. 12. 1.)

Optimum conditions of the cellulose-hydrolysis reaction with mixed enzymes (cellulase extracted from *Penicillium funiculosum* mixed with  $\beta$ -glucosidase extracted from Almond) were investigated to increase the production of glucose from cellulose. Experimental results showed that optimum conditions for pH, activity ratio of  $\beta$ -glucosidase to cellulase, concentration of mixed enzymes, concentration of cellulose as a substrate, and temperature range were 4.2, 0.4, 0.8 U/mL, 40 g/L, and  $37 \pm 3$  °C, respectively. In these conditions, quantities of glucose productions by using mixed enzymes were larger than those by using cellulase at optimum conditions.

Key Words : optimum condition, cellulose-hydrolysis reaction, mixed enzymes, glucose production

#### 서론

지구상에서 생성되고 축적되어 있는 바이오매스(biomass), 즉 생물체의 양은 대단히 많으며 특히 이들은 매년 생산되고 있기 때문에 가장 풍부한 자원 중의 하나로 볼 수 있다. 그 중에서도 원목으로부터 생산되는 생물체인 섬유소나 헤미셀룰로오스(hemicellulose)를 가수분해하여 당류나 알코올을 생산하기 위한 연구는 오랫동안 진행되어 왔으나(1-3) 경제성이 낮아서 실용화되지 못한 실정이다(4). 더욱이 최근에는 화석연료의 고갈에 따른 새로운 대체에너지원으로 섬유소 등이 중요한 자원으로 부각되고 있으며 특히 종이 및 펄프공장 등에서 발생하는 폐섬유소는 여러 공정을 거치면서 전처리가 잘 되어 있어서 목재보다 당화율이 클 뿐만 아니라 최대 환원당을 약 55% 함유하고 있기 때문에(5) 폐섬유소를 가수분해하는 당화공정의 개발은 공해물질의 배출억제, 자원 재활용, 그리고 식품문제 해결 등의 측면에서 상당히 시급하다고 판단된다.

또한 지금까지 섬유소의 가수분해에 대한 대부분의 연구는 단일효소인 셀룰라아제(cellulase)를 사용하여 진행되어 왔는데(6-8) 셀룰라아제는 그 생성자원(세균, 곰팡이 등)의 특성에 따라 3가지 효소성분, 즉  $C_1$ ,  $C_x$ , 그리고 베타글루코시다아제( $\beta$ -glucosidase)가 일정하게 포함되어 있지 않기 때문에 당화율 효과적으로 진행시키기 위해서는 부족한 효소성분을 보충해 주어야 한다.

Okazaki 등(9)과 Suga 등(10)은  $C_x$ 성분인 endo형과 exo형 효소의 혼합비율에 따라, 그리고 섬유소의 결정도에 따라 효소-가수분해 반응속도가 영향을 받는다고 보고하였으며 endo형 성분이 많이 포함되어 있는 곰팡이(penicillium)에서 추출한 셀룰라아제는 불규칙하게 섬유소의 사슬을 절단하는 효소로 볼 수 있기 때문에 단쇄의 과당류를 주로 생성한다고 생각할 수 있다(11). 따라서 셀룰라아제에 적절한 양의 베타글루코시다아제를 추가해 줌으로써 단쇄의 과당류에 대한 가수분해속도와 글루코오스의 생성량을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

그러나 단일효소에서와는 달리 가격에 비하여 효소의 활성이 우수하고 저분자 과당의 분해능력이 뛰어난 셀룰라아제와 단쇄의 과당을 가수분해하는 능력이 뛰어난 베타글루코시다아제를 적절한 비율로 혼합한 혼합효소를 사용하여 섬유소의 효소-가수분해반응의 최적조건과 속도론, 그리고 반응기의 성능해석을 체계적으로 해석한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 효소-가수분해반응에 의해 폐섬유소로부터

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Myong Ji University, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea  
Tel : 0335-30-6388, Fax : 0335-37-1920  
E-mail : kimto@wh.myongji.ac.kr

글루코오스를 공업적으로 생산하기 위한 연구의 일환으로 순수 섬유소의 효소-가수분해반응에 대한 최적조건, 즉 각 효소들과 혼합효소의 최적 pH, 글루코오스의 생성을 최대화시키기 위한 주 효소인 셀룰라아제에 대한 보조 효소인 베타글루코시다아제의 최적 활성혼합비, 혼합효소의 최적농도, 기질의 최적농도 그리고 최적 반응온도범위를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

기질은 폐섬유소 중의 섬유소 성분과 비슷한 순수 섬유소( $\alpha$ -cellulose : SIGMA C-8002)를 사용하였다. 그리고 효소는 *Penicillium funiculosum*에서 추출한 셀룰라아제(cellulase extracted from *Penicillium funiculosum*, PFC : SIGMA C-0901) 및 *Trichoderma reesei*에서 추출한 셀룰라아제(cellulase extracted from *Trichoderma reesei*, TRC : SIGMA C-9422)의 두 종류와 Almond에서 추출한 베타글루코시다아제(SIGMA G-0395)를 사용하였다.

### 효소의 활성측정

셀룰라아제와 베타글루코시다아제의 활성을 측정하기 위하여 일정한 반응온도와 pH, 그리고 효소농도에서 기질을 각각 셀로바이오스(cellobiose)와 *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside(PNPG : SIGMA N-7006)를 사용하여 일정한 기질농도에서 반응시켰다. 그리고 셀룰라아제는 dye oxidation법(12)에 의해 UV 분광 광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 글루코오스의 농도를 산출하여, 그리고 베타글루코시다아제는 *p*-nitrophenol의 검량곡선을 이용하여 각각 효소의 활성을 산출하였다.

또한 셀룰라아제 중의 베타글루코시다아제의 활성은 순수한 베타글루코시다아제에서와 동일한 실험방법으로 측정하였다. 기질로 PNPG를 사용하는 경우에는 주로 베타글루코시다아제가 기질 중에서  $\beta$ -D-glucopyranoside를 분해하여 *p*-nitrophenol을 생성시키기 때문이다.

### 셀룰라아제의 선택

섬유소를 가수분해하기 위한 주 효소인 셀룰라아제를 선택하기 위하여 다음과 같은 두가지 방법으로 실험하였다.

먼저 TRC가 최고의 활성을 나타내는 pH 4.8과 37°C의 반응온도에서(13) 셀로바이오스의 초기농도를 0.375 g/L로, 그리고 각 효소의 농도는 정확한 활성(U/mg)을 측정하기 이전이므로 초기농도를 0.008 g/L로 유지시키고 부피가 20 mL인 시험관 반응기에서 5분동안 반응시킨 다음 글루코오스의 농도를 측정하고 글루코오스의 생성에 대한 셀룰라아제의 활성을 산출하였다.

또한 섬유소-가수분해반응에서 셀룰라아제의 종류에 따른 글루코오스의 생성량을 비교하기 위하여 pH 4.8과 37°C의 반응온도에서 기질인 섬유소와 각 효소들의 초기농도를 각각 0.735 g/L와 0.0375 g/L로 유지시킨 시험관 반응기에서 섬유소-가수분해반응을 수행하고 dye oxidation법에 의해 글루코오스의 생성량을 측정하였다.

### 단일효소의 최적 pH

단일효소인 셀룰라아제와 베타글루코시다아제의 경우에는 초산

염과 인산염 완충용액으로 pH를 3.0~8.0으로 변화시키면서 각각 기질인 셀로바이오스와 PNPG의 농도를 0.375 g/L와 0.755 g/L로, 그리고 각 효소농도를 0.0075 g/L와 0.00125 g/L로 37°C에서 5분동안 반응시킨 후 채취한 2 mL의 시료에 0.2 M의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 2 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 효소의 활성측정법과 동일한 방법으로 각 효소의 활성을 산출하였다.

### 혼합효소의 최적 pH 및 활성혼합비

혼합효소의 최적 pH는 37°C의 회분식 교반반응기에서 pH를 단일효소의 최적 pH사이에서 변화시키고 기질을 PNPG로 사용하여 측정된 셀룰라아제(C)의 활성(0.2 U/mL)에 대한 베타글루코시다아제(B)의 활성혼합비(B/C)를 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8, 1.4로 변화시키면서 10 g/L의 섬유소와 일정한 시간동안 반응시킨 후 3 mL의 시료를 채취하고 0.2 M의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 4 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 4°C 이하로 급랭시킨 다음 원심분리하고 상부액을 채취하여 생성된 글루코오스의 농도를 측정하였다.

### 혼합효소의 최적농도

효소-가수분해반응의 최적 pH와 혼합효소의 최적 활성혼합비에서 기질을 PNPG로 사용하여 측정된 셀룰라아제의 초기활성을 0.172, 0.344, 0.516, 1.000, 1.600 U/mL로 변화시키면서 37°C와 섬유소의 초기농도가 10 g/L로 유지된 100 mL의 회분식 교반반응기를 사용하여 반응시켰다. 그리고 앞 절과 같은 분석방법에 의해 글루코오스의 농도를 측정하였다.

### 섬유소의 최적농도

혼합효소의 최적 pH와 최적 활성혼합비에서 기질을 PNPG로 사용하여 측정된 셀룰라아제의 초기농도를 0.125 U/mL로, 그리고 베타글루코시다아제의 초기농도를 0.05 U/mL로 유지시킨 37°C와 100 mL의 회분식 교반반응기에서 최적 pH의 완충용액에 하루동안 침적시킨 섬유소의 초기농도를 5~100 g/L로 변화시키면서 반응시켰다. 이때 글루코오스의 농도는 앞 절과 같은 분석방법을 이용하였고 셀로바이오스의 농도는 DNS법(14)에 의해 총 환원당의 농도를 측정하고 본 연구에서 개발한 Kim-Son법(15)에 의해 정량하였다.

### 최적 온도범위

최적 pH에서 반응온도를 각각 30, 37, 50, 60, 70°C로 변화시키면서 온도변화에 따른 단일효소와 혼합효소의 활성변화를 측정하였다.

단일효소인 셀룰라아제와 베타글루코시다아제의 경우에는 각각 셀로바이오스와 효소의 초기농도를 0.375 g/L와 0.008 g/L로, 그리고 PNPG와 효소의 초기농도를 0.755 g/L와 0.00125 g/L로 유지시켰으며 혼합효소의 경우에는 최적 활성혼합비에서 PNPG와 혼합효소의 초기농도를 각각 0.755 g/L와 0.0026 g/L로 유지시키고 100 mL의 회분식 교반반응기에서 약 2주동안 반응하였다.

## 결과 및 고찰

### 셀룰라아제의 선택

Table 1에서와 같이 글루코오스의 생성에 대한 PFC의 활성

Table 1. Activities and glucose concentrations with cellulases at pH 4.8, 37°C.

Cellulase	Activity(U/mg) <sup>a)</sup>	Glucose concentration(g/L) <sup>b)</sup>
TRC	2.941	$4.879 \times 10^{-3}$
PFC	6.035	$8.319 \times 10^{-3}$

<sup>a)</sup> Experimental conditions: cellobiose conc.=0.375 g/L, enzyme conc.=0.008 g/L, reaction time=5 min.  
<sup>b)</sup> Experimental conditions: cellulose conc.=0.735 g/L, enzyme conc.=0.0375 g/L, reaction time=5 min.

은 6.035 U/mg으로 TRC의 2.941 U/mg보다 약 2배 정도가 큼을 알 수 있다. 또한 섬유소를 기질로 사용한 실제 반응계에서도 PFC는  $8.319 \times 10^{-3}$  g/L의 글루코오스를 생산한 반면에 TRC는  $4.879 \times 10^{-3}$  g/L로 PFC가 TRC보다 약 2배정도 큼을 알 수 있다.

따라서 PFC는 활성이 우수하고 가격이 TRC보다 약 70배가 저렴하여 섬유소-가수분해반응에서 글루코오스를 생산하는데 유리하므로 본 연구에서는 *Penicillium funiculosum*에서 추출한 셀룰라아제를 선택하여 실험한 결과를 해석하였다.

**효소의 최적 pH**

반응온도 37 °C에서 pH변화에 따른 셀룰라아제와 베타글루코시다아제의 활성변화는 Figure 1에 나타내었다. 그림에서 pH가 각각 4.2와 5.3부근에서 최대의 활성을 유지함을 알 수 있으며 이 결과는 40~60°C에서 C<sub>1</sub>과 C<sub>x</sub>효소의 최적 pH가 4.5~5.0인 문헌값(16)과 베타글루코시다아제의 최적 pH가 50 °C이하에서

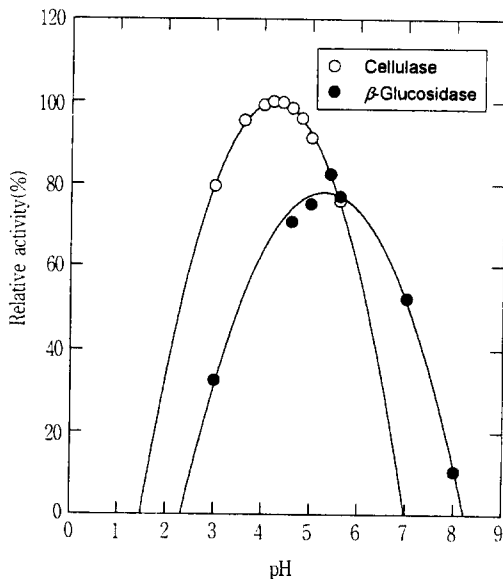


Figure 1. Variations of relative activities of cellulase and  $\beta$ -glucosidase with pH at 37°C.  
 Cellulase: enzyme conc.=0.0075 g/L and substrate(cellobiose) conc.=0.375g/L.  
 $\beta$ -Glucosidase: enzyme conc.=0.00125 g/L and substrate(p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside) conc.=0.765 g/L.

4.8~5.7범위라고 보고한 Woodward 등(17)과 37 °C에서 5.6이라고 한 Heyworth 등(18)의 결과와 거의 일치된다.

셀룰라아제와 베타글루코시다아제의 혼합효소의 경우에 다양한 반응시간과 혼합효소의 활성혼합비에서 pH의 변화에 따른 생성된 글루코오스의 농도변화는 Figure 2에 나타내었다. 그림에서와 같이 pH 4.2에서 가장 높은 당화율을 나타내고 있다. 이것은 글루코오스의 생성이 셀로바이오스를 분해하는 베타글루코시다아제의 영향보다 섬유소를 분해하여 셀로바이오스를 형성시키는 셀룰라아제에 의해 크게 영향을 받기 때문에 셀룰라아제의 최적 pH에 근접하는 것으로 보인다.

따라서 실험에서 pH는 4.2로 고정하였다.

**혼합효소의 최적 활성혼합비**

혼합효소의 최적 활성혼합비는 Figure 3에서와 같이 기질을 PNPg로 사용한 셀룰라아제의 활성에 대한 베타글루코시다아제의 활성혼합비가 낮은 경우에는 활성혼합비가 증가할수록 일정한 셀로바이오스의 생성량에 대해 셀로바이오스의 분해가 증가되어 글루코오스의 생성량이 증가하지만 활성혼합비가 약 0.4이상에서는 셀로바이오스의 가수분해반응이 평형에 근접하여 글루코오스의 농도가 거의 일정한 값을 나타내고 있다.

따라서 혼합효소의 최적 활성혼합비는 약 0.4임을 알 수 있었으며 혼합효소에서 글루코오스의 생성은 셀룰라아제만을 사용한 경우보다 증가하여 10 g/L의 섬유소 농도에서는 약 20 % 이상이 보다 많이 생성되었다.

**혼합효소의 최적 농도**

혼합효소의 최적 활성혼합비를 0.4로 유지시키고 pH 4.2, 반응온도 37°C, 그리고 섬유소의 초기농도 10 g/L의 반응조건하에서 혼합효소의 총 활성농도를 변화시키면서 얻은 글루코오스 생

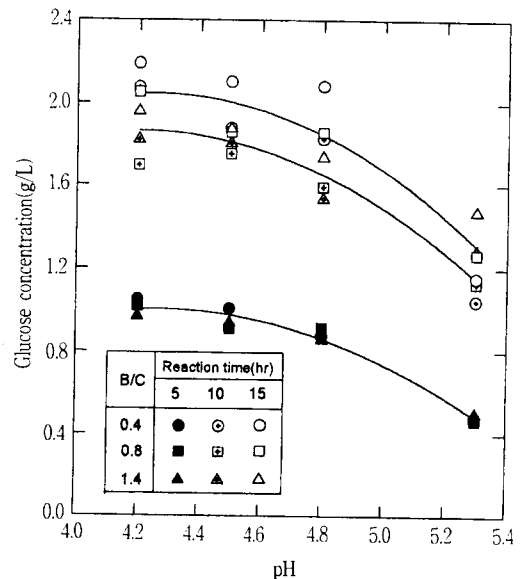


Figure 2. Effects of pH on glucose concentrations with various activity ratios of  $\beta$ -glucosidase(B) to cellulase(C) and reaction times at 37°C.  
 Experimental conditions: cellulase conc.=0.2 U/mL and cellulose conc.=10 g/L.

성량의 변화는 Figure 4와 같다. 그림에서와 같이 혼합효소의 총 활성농도가 증가함에 따라 반응시간이 짧은 경우에는 글루코오스의 생성량이 거의 직선적으로 서서히 증가하지만 반응시간이 길어질수록 급격한 증가를 나타내고 있다. 즉, 반응시간이 약 120분 이후의 경우에 효소의 총 활성농도가 0~0.8 U/mL인 범

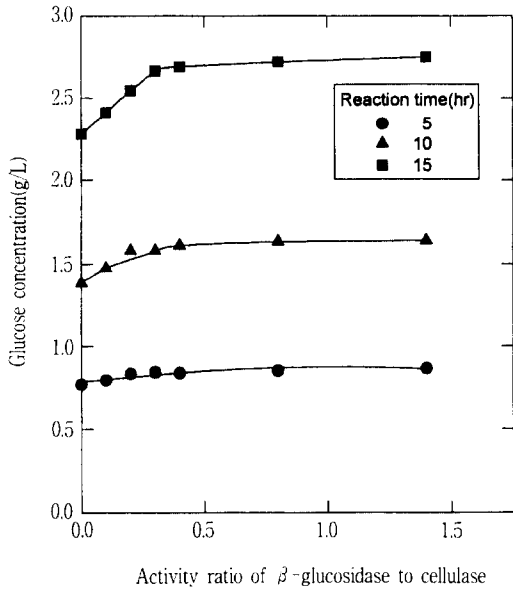


Figure 3. Effects of activity ratios of  $\beta$ -glucosidase to cellulase on glucose concentrations with various reaction times at pH 4.2, 37°C. Experimental conditions: cellulase conc.=0.2 U/mL and cellulose conc.=10 g/L.

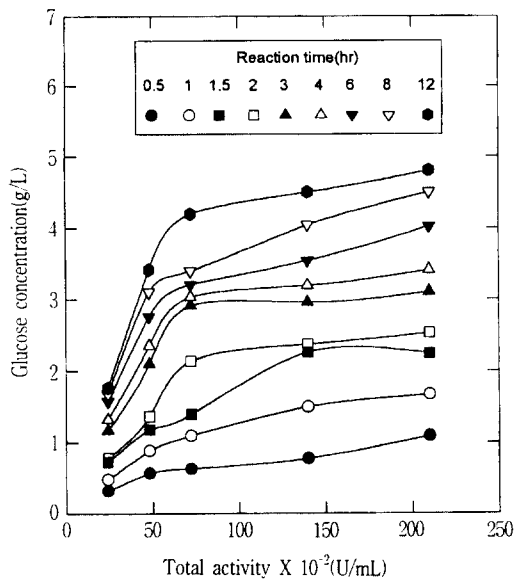


Figure 4. Effects of total activities of mixed enzymes on glucose concentrations with various reaction times at pH 4.2, 37°C. Experimental conditions: cellulose conc.=10 g/L and activity ratio of  $\beta$ -glucosidase to cellulase=0.4.

위에서는 글루코오스의 생성량이 총 활성농도의 증가에 따라 급격하게 증가하지만 그 이상의 활성농도에서는 서서히 증가하여 효소농도의 영향이 낮은 농도에서보다 감소되고 있다. 이와 같은 현상은 일반적으로 효소-기질반응이 반응에 따라 변화되는 기질의 농도에 의해 반응속도가 변화되기 때문이다(19).

따라서 본 연구에서는 혼합효소의 총 활성농도가 증가함에 따라 글루코오스의 생성량이 급격히 변화하는 약 0.8 U/mL를 혼합효소의 최적농도로 결정하였다.

**섬유소의 최적농도**

기질로 PNPG를 사용한 셀룰라아제(0.125 U/mL)와 베타글루코시다아제(0.05 U/mL)의 활성혼합비를 0.4로 유지시키고 pH 4.2에서 섬유소의 초기농도를 5~100 g/L로 변화시키면서 4, 8, 12시간동안 반응시켜 얻은 글루코오스의 생성량을 비교한 결과는 Figure 5와 같다. 그림에서와 같이 섬유소의 초기농도가 증가함에 따라 글루코오스의 생성량은 증가되지만 기질의 농도가 낮은 범위에서는 다소 급격하게 증가하고 약 40 g/L 이상에서는 글루코오스의 생성이 크게 증가하지 않고 거의 일정한 값에 수렴하는 경향을 나타내고 있다. 이와 같은 경향은 섬유소-가수분해반응의 중간 생성물인 셀로바이오스 생성량의 변화를 나타낸 Figure 6에서도 거의 비슷하게 나타내고 있는데 이것은 효소-기질반응의 반응속도가 기질, 즉 섬유소와 셀로바이오스의 농도에 따라 변화할 뿐만 아니라 기질의 농도가 높을수록 반응 생성물의 농도가 커서 이들 반응 생성물과 기질에 의한 효소의 억제영향이 증가하기 때문으로 생각된다. 이 결과는 셀룰라아제를 사용한 섬유소-가수분해반응의 정확한 메커니즘을 규명하기 위하여 기질의 억제영향이 거의 없는 범위인 50 g/L 이하의 섬유소 농도에서 실험한 대부분의 연구자들(9,20,21)의 실험조건과 일치한다.

따라서 본 연구에서는 섬유소-가수분해반응에 의한 글루코오

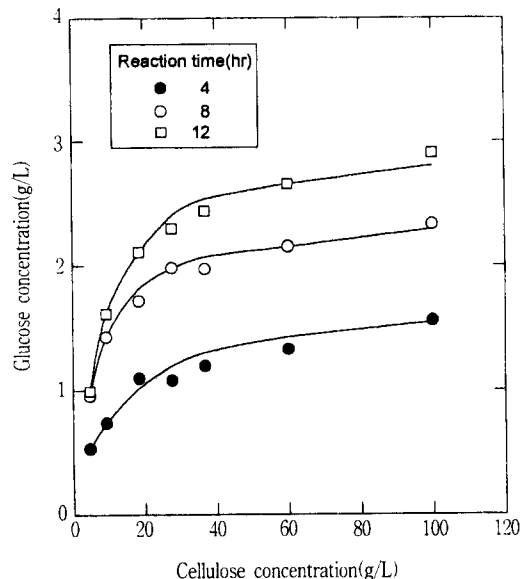


Figure 5. Effects of cellulose concentrations on glucose concentrations with various reaction times at pH 4.2, 37°C. Experimental conditions: cellulase conc.=0.125 U/mL and  $\beta$ -glucosidase conc.=0.05 U/mL.

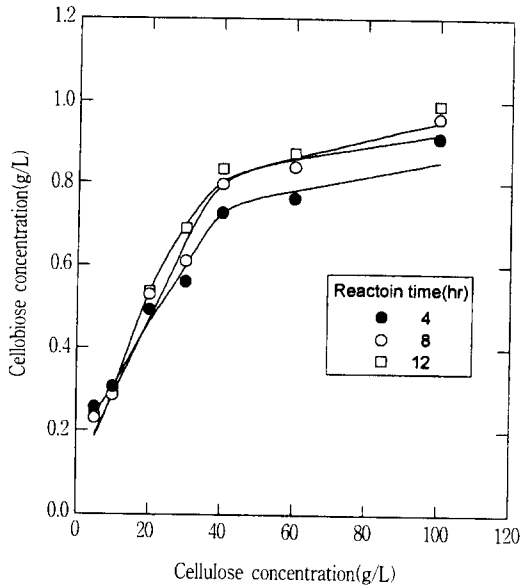


Figure 6. Effects of cellulose concentrations on cellobiose concentrations with various reaction times at pH 4.2, 37°C. Experimental conditions: cellulase conc.=0.125 U/mL and  $\beta$ -glucosidase conc.=0.05 U/mL.

스의 생성에서 기질의 억제영향이 거의 존재하지 않는 섬유소의 최적농도를 40 g/L로 결정하였다.

**최적 온도범위**

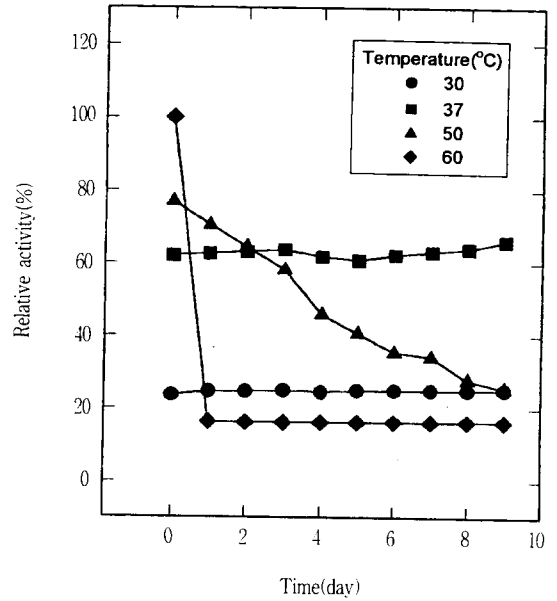
최적 pH인 4.2에서 반응온도와 시간의 변화에 따른 단일효소인 셀룰라아제와 베타글루코시다아제의 활성변화는 Figure 7과 같다. 60 °C에서는 효소의 활성이 초기에는 가장 우수하였으나 약 24시간 이후에는 급격히 감소하였고 50 °C에서 셀룰라아제 경우는 활성이 서서히 감소하여 온도에 대한 안정성이 60 °C보다 증가하고 있다. 그러나 50 °C에서 베타글루코시다아제 경우는 60 °C에서와 거의 비슷한 활성과 안정성을 나타내었다. 이와 같이 효소의 활성은 온도가 낮을수록 초기에는 낮으나 효소의 분해가 감소되어 안정성은 증가하였으며 베타글루코시다아제보다 셀룰라아제가 온도에 대한 안정성이 우수하였다. 특히 셀룰라아제는 30 °C와 37°C에서 장시간동안 거의 일정한 활성을 유지하였으나 베타글루코시다아제는 이 온도범위에서도 효소의 활성이 서서히 감소하고 있다.

혼합효소의 경우, 최적 활성혼합비와 pH에서 온도변화에 따른 활성변화는 Figure 8과 같이 셀룰라아제에서와 거의 유사한 경향을 나타내고 있는데 이것은 혼합효소중 셀룰라아제의 활성농도가 크기 때문이다.

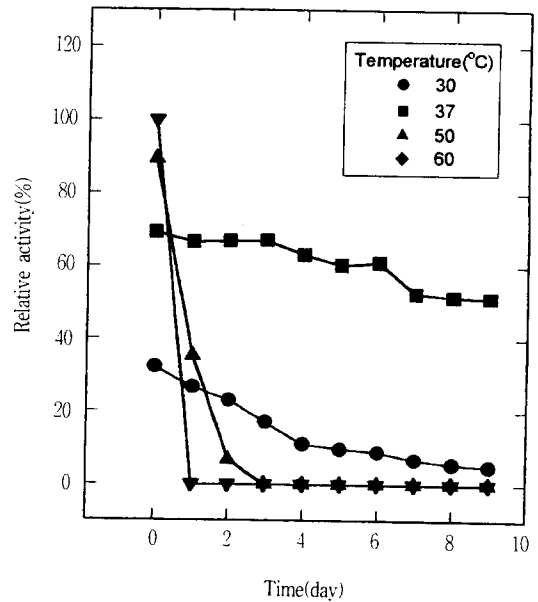
따라서 혼합효소의 활성은 온도가 높을수록 초기에는 높지만 온도에 대한 안정성이 매우 낮기 때문에 안정성이 좋은 온도범위에서 효소활성이 가장 큰 최적 온도범위는 약 37±3°C임을 알 수 있었다.

**요 약**

섬유소로부터 글루코오스의 생성을 증대시키기 위하여 *Penicillium funiculosum*에서 추출한 셀룰라아제와 Almond에서 추



(a) Cellulase



(b)  $\beta$ -Glucosidase

Figure 7. Variations of relative activities of cellulase and  $\beta$ -glucosidase with reaction times and temperatures at pH 4.2.

(a) Cellulase: enzyme conc.=0.008 g/L and substrate(cellobiose) conc.=0.375 g/L.

(b)  $\beta$ -Glucosidase: enzyme conc.=0.00125 g/L and substrate(p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside) conc.=0.755 g/L.

출한 베타글루코시다아제를 혼합한 혼합효소를 사용하여 섬유소-가수분해반응의 최적조건에 대하여 해석하였다. 그 결과 pH, 셀룰라아제에 대한 베타글루코시다아제의 활성혼합비, 혼합효소의 농도, 기질인 섬유소의 초기농도, 그리고 온도범위에 대한 최적조건은 각각 약 4.2, 0.4, 0.8 U/mL, 40 g/L, 37±3°C이

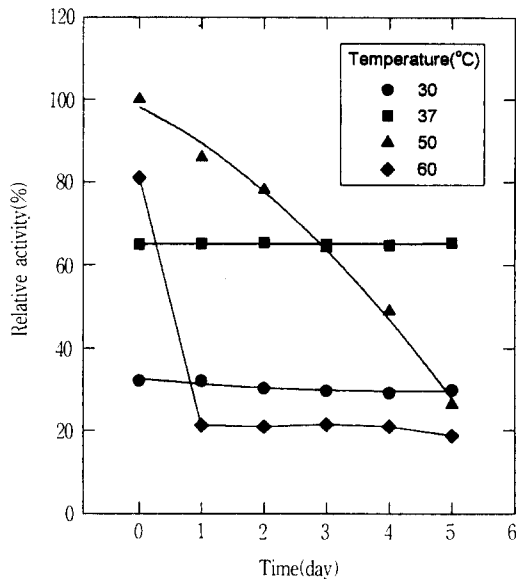


Figure 8. Variations of activities of mixed enzymes with reaction times and temperatures at pH 4.2.

Experimental conditions: cellulase conc.=0.0026 g/L and p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside conc.=0.755 g/L.

었다. 이때 반응의 최적조건에서 혼합효소를 사용한 경우에는 섬유소로부터 글루코오스의 생성이 셀룰라아제에서보다 증가하였다.

참 고 문 헌

- Wyman, C. E. (1994), Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, and Opportunities, *Biores. Technol.*, **50**(1), 3-16.
- Goldstein, I. S. and J. M. Easter (1992), An Improved Process for Converting Cellulose to Ethanol, *TAPPI*, **75**, 135-140.
- Ohmine, K., H. Ooshima, and Y. Harano (1983), Kinetic Study on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose by Cellulase from *Trichoderma viride*, *Biotechnol. & Bioeng.*, **25**, 2041-2053.
- Oh, K. D. and C. Kim (1986), A Study on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in an Attrition Bioreactor, World Congress III of Chemical Engineering, Vol. I, pp. 832-838, Tokyo.
- 온두현, 전병관, 심규섭 (1985), 紙·Pulp工場の廢纖維素의 資源化에 關한 研究(II)-酸에 의한 sludge의 加水分解에 關하여, *펄프·종이 技術*, **17**(1), 38-44.
- Ballerini, D., J. P. Desmarquest, J. Pourquie, F. Nativel,

- and M. Rebeller (1994), Ethanol Production from Lignocellulosics: Large Scale Experimentation and Economics, *Biores. Technol.*, **50**(1), 17-23.
- Kirk, T. K. and T. L. Highley (1973), Quantitative Changes in Structural Components of Conifer Woods During Decay by White- and Brown-Rot Fungi, *Phytopathology*, **63**, 1338-1342.
- Shuler, M. L. and F. Kargi (1992), *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, pp. 58-102, Prentice-Hall, New Jersey.
- Okazaki, M. and M. Moo-Young (1978), Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Analytical Description of a Mechanistic Model, *Biotechnol. & Bioeng.*, **20**, 637-663.
- Suga, K., G. van Dedem, and M. Moo-Young (1975), Enzymatic Breakdown of Water Insoluble Substrates, *Biotechnol. & Bioeng.*, **17**, 185-201.
- Van Dedem, G. and M. Moo-Young (1975), A Model for Diauxic Growth, *Biotechnol. & Bioeng.*, **17**, 1301-1312.
- Harris, D. A. and C. L. Bashford (1987), *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry*, pp. 69-70, IRL Press, Washington DC.
- Caminal, G., J. Lopez-Santin, and C. Sola (1985), Kinetic Modeling of the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Cellulose, *Biotechnol. & Bioeng.*, **27**, 1282-1290.
- Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
- 손민일 (1997), "혼합효소에 의한 섬유소-가수분해반응 속도론과 공기리프트 생물반응기에서 글루코오스의 생산", 박사학위 논문, 화학공학과, 명지대학교, 경기도.
- 文星明 (1988), *化學藥品大辭典*, pp. 2235-2236, 화학사전연구사, 서울.
- Woodward, J. and A. Wiseman (1982), Fungal and Other β-D-Glucosidases-Their Properties and Applications, *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 73-79.
- Heyworth, R. and P. G. Walker (1962), Almond-Emulsin β-D-Galactosidase, *Biochem. J.*, **83**, 331-335.
- Aiba, A., A. E. Humphrey, and N. F. Millis (1973), *Biochemical Engineering*, 2nd ed., pp. 1-129, University of Tokyo Press, Japan.
- Dwivedi, G. P. and T. K. Ghose (1979), A Model on Hydrolysis of Bagasse Cellulose by Enzyme from *Trichoderma reesei* QM 9414, *J. Ferment. Technol.*, **57**(1), 15-24.
- Huang, A. A. (1975), Kinetic Studies on Insoluble Cellulose-Cellulase System, *Biotechnol. & Bioeng.*, **17**, 1421-1433.