

독청버섯아재비 균주가 생산하는 Carboxymethyl Cellulase의 정제 및 효소학적 특성

유관희* · 장형수¹

*상지대학교 이공과대학 생명과학과, ¹식품영양학과

Purification and Characterization of Carboxymethyl Cellulase from *Stropharia rugosoannulata*

Kwan-Hee Yoo* and Hyung-Soo Chang¹

*Department of Life Science and ¹Food & Nutrition, Sang-Ji University, Wonju 220-702, Korea

(Received March 5, 2002)

ABSTRACT: A Carboxymethyl Cellulase (CMCase) has been isolated and purified from the edible mushroom, *Stropharia rugosoannulata*. The molecular weight of CMCase was estimated to be 54 kDa by SDS polyacryl amide gel electrophoresis. The maximum activity of the purified CMCase was observed at pH 4.0 and 40°C, and stable for pH 3.0 to 11.0 to maintain 40% activity. The CMCase activity was activated by AgNO₃, MgSO₄ and KCl. However, its activity was inhibited by 1,10-phenanthroline, KCN and L-cysteine. Also, the enzyme activity was decreased by the addition of EDTA, suggesting that the purified CMCase is metalloenzyme.

KEYWORDS: Carboxymethyl Cellulase, Metalloenzyme, *Stropharia rugosoannulata*

식물체로부터 생산되는 연간 약 40억톤 규모의 섬유소 (Coughlan, 1990)는 자연계에 널리 존재하고 있는 고분자 유기물질로 활용가치가 높은 재생자원이나 일부 미생물과 반추동물에 의해 이용되어질 뿐 대부분 폐기되고 있는 (Lee, 1976) 실정이다. 그러나 섬유소는 지구상에서 가장 풍부한 탄소원으로, 연료, 식품, 화학약품생 산에 쓰이는 포도당을 섬유소분해효소(Cellulase)를 이용하여 포도당의 생산을 증대시키는 면으로 많은 연구가 이루어지고 있다 (Saddler, 1993; Wyman *et al.*, 1986; Tagagi, 1987).

섬유소분해효소는 산업적으로 이용도가 매우 높다. 즉 면직물에 진균류의 침해를 방지하는데(Mandels and Reese, 1964) 이용되며, 축산업에서는 축산분뇨의 퇴비화 촉진과 소화율을 높이기 위한 사료 첨가제, 펄프 및 제지업에서는 표백제, 의류업에서는 면직물 제품의 보습성과 촉감의 유지를 위한 세제와 indigo로 염색된 청바지의 탈색효소로 사용되고 있으며, 식품산업에서도 과일음료와 맥주의 청징 등에 이용되고 있고(Beguin and Albert, 1994; Gilbert and Hazlewood, 1993), 문화재 보호면에도 이용되고 있다 (정 등, 1987).

산업적으로 가장 효과적인 섬유소 분해효소는 *Trichoderma* 속균에서 생성된 효소이며, 이외에도 *Aspergillus* 속균, *Penicillium* 속균, Basidiomycetes를 이용한 섬유소 분해효소 생산에도 많은 연구가 이루어지고 있다(Drauz

and Waldmann, 1995). 또한 섬유소분해효소의 생산을 위한 배지와 배양조건의 최적화, 고수율 변이주의 개발에 대한 연구가 이루어지고 있으며(Ryu and Mandels, 1980; Andreotti *et al.*, 1981), 최근에는 유전자 조작기법을 이용한 섬유소분해효소 유전자 클로닝과 원형질체 융합을 시도 하여 균주를 개량시키려는 노력이 행해지고 있으나 대부분의 경우 ATCC 균주만이 연구대상이 되고 있다(Robson and Chamblies, 1989; 김, 1988).

일반적으로 섬유소를 분해하는 세균으로는 *Bacillus* 속균(Fumiyasu *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997), *Pseudomonas* 속균(Berghem *et al.*, 1976; Wood, 1968), *Clostridium* 속균(Fagerstam and Pettersson, 1979; Hakansson *et al.*, 1978) 및 *Cellulomonas* 속균(Chey *et al.*, 1990, 1992) 등이 알려져 있으며, 진균으로는 *Mycrothecium verrucaria*, *Actinomyces* 속균, *Aspergillus fumigatus*, *A. luchuensis*(Reese *et al.*, 1950), *Rhizopus* 속균(정, 1968), *T. viride*(Nisizawa *et al.*, 1972), *T. koningii*(Wood and McCrae, 1972; Hong *et al.*, 1976), *Sporotrichum pulverulentum*(Eriksson *et al.*, 1975), *Pyricularia oryzae*(전, 1979) 등에 관한 연구가 있으며, 담자균으로는 *Lyophyllum decastes*(홍 등, 1988), *Trametes trogii*(김 등, 1997), *Pleurotus sajor-caju*(홍 등, 1984), *Ganoderma lucidum*(홍 등, 1986) 등이 있다. 진균에서는 endoglucanase와 exoglucanase 그리고 β -glucosidase가 동시에 존재하여 이들의 상승작용에 의해 섬유소 분해가 촉진되나, 일반세균

*Corresponding author <E-mail: khyoo@chiak.sangji.ac.kr>

에서는 섬유소를 분해하는 세 종류의 cellulytic계 효소를 모두 생산하지 못하며 곰팡이에 비해 상대적으로 활성이 낮다(Son *et al.*, 1997).

본 연구에서는 cellulase 생성균인 *S. rugosoannulata*의 배양학적 특성에 대해 보고한 전보(유·장, 1999)에 이어 *S. rugosoannulata*로부터 정제한 carboxymethyl cellulase (CMCase)의 효소학적 특성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 치악산 구룡계곡에서 채집한 CMCase 생산력이 높은 *Stropharia rugosoannulata* 균주를 사용하였다.

배지 및 배양법

전보(유·장, 1999)와 같이 효소생산배지는 액체배양용 기본배지 1 l에 xylose 8 g, NH₄Cl 3 g, malt extract 10 g을 첨가한 후 pH 5.0으로 조정하여 사용하였으며, 균 배양액은 250 ml 삼각 flask 10개에 효소생산배지를 각각 100 ml씩 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 후 30°C에서 10일간 배양하였다.

효소의 활성측정

전보(유·장, 1999)와 같이 CMCase 활성은 Kanda 등(1976)의 방법으로 측정하였다. 1% carboxymethyl cellulose(CMC)를 함유한 0.2 M sodium acetate buffer(pH 5.0) 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하여 40°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 환원당을 Somogyi 법(1962)으로 520 nm에서 비색 정량하였다.

Glucose 표준품을 사용하여 같은 방법으로 standard curve를 작성하였으며, 효소활성도는 1분당 1 μmole의 glucose를 생성하는 효소량을 1 unit로 하여 활성의 비교단위로 하였다.

단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였으며 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

효소의 정제

모든 효소의 정제 과정은 4°C에서 수행하였으며, 각 정제과정마다 CMCase 활성과 효소의 농도를 측정하였다. 최적화배지에서 10일간 배양한 배양액을 4°C에서 4,500 × g로 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 ammonium sulfate로 30%에서 80%까지 분별 침전시킨 후 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인 다음 같은 완충용액으로 24시간 투석하였다.

투석한 침전물을 동일한 완충용액으로 평형화한 DEAE-Sephrose CL-6B 컬럼(20 ± 200 mm)에 주입하고 NaCl 용액 0~0.5 M을 이용한 농도구배법으로 용출시켰다. 활성부분은 80% ammonium sulfate로 침전시키고 24시간 동안 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.5)에 투석시킨 후 동일한 완충용액으로 미리 평형시킨 Sephacryl S-200 컬럼(20 × 700 mm)에 흘려주었다. 활성이 있는 부분을 모아 농축 및 투석한 후 fast protein liquid chromatography(FPLC)의 Mono Q 컬럼(5.0 × 100 mm)에 주입하였다. 완충용액 3 ml로 씻어준 후 0~0.8 M NaCl의 농도 기울기로 분획당 용출량은 1 ml, 용출속도는 분당 1 ml로 용출시켰으며, 각 분획의 효소활성을 측정한 후 활성이 있는 부분을 모아 효소정제 실험에 사용하였다.

분자량 측정

분리한 단백질의 분자량은 10% SDS-PAGE를 사용하였다. 표준단백질로는 phosphorylase b(94 kDa), bovine serum albumin(67 kDa), ovalbumin(43 kDa), carbonic anhydrase(30 kDa), soybean trypsin inhibitor(20.1 kDa)를 사용하였으며, gel은 Coomassie blue R-250과 silver staining kit로 염색하였다.

열에 대한 안정성

S. rugosoannulata 균주가 생산하는 CMCase의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 10°C에서 80°C까지 각각의 온도에서 효소를 30분간 열처리한 후 40°C에서 30분간 기질과 반응시킨 후 잔류활성을 Somogyi법(1962)으로 조사하였다.

pH에 대한 안정성

S. rugosoannulata 균주가 생산하는 CMCase의 pH에 대한 안정성을 알아보기 위하여 pH 3.0에서 pH 11.0까지 각각의 pH로 조정하여 40°C에서 효소를 30분간 처리한 후 최적 pH인 5.0으로 조정하여 기질을 첨가하고 40°C에서 30분 반응시킨 다음 잔류활성을 상기와 같은 방법으로 조사하였다.

금속염에 대한 영향

S. rugosoannulata 균주가 생산하는 CMCase의 활성에 미치는 금속염에 대한 영향을 조사하기 위하여 KCl, Al₂O₃, CaCl₂, FeCl₃, AgNO₃, BaCl₂, MgSO₄, CuSO₄, HgCl₂, MnSO₄, ZnSO₄ 등 11종류의 금속염을 효소반응액에 최종농도가 각각 1 mM과 5 mM이 되도록 첨가한 후 40°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 Somogyi 방법을 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해제에 대한 영향

S. rugosoannulata 균주가 생산하는 CMCase의 활성에

미치는 각종 저해제에 대한 영향을 조사하기 위하여 PMSF, SDS, EDTA, EGTA, 1,10-phenanthroline, KCN, L-cysteine 등 7종류의 저해제를 효소반응액에 최종농도가 1 mM과 5 mM이 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 처리한 후 상기와 같은 방법으로 조사하였다.

EDTA 농도에 대한 영향

S. rugosoannulata 균주가 생산하는 CMCCase의 활성에 미치는 EDTA 농도에 대한 영향을 조사하기 위하여 효소반응액에 최종농도가 10^{-1} 에서 10^{-6} 이 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 처리한 후 상기와 같은 방법으로 조사하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

*S. rugosoannulata*의 CMCCase는 Table 1에서와 같이 4 단계를 거쳐 분리 정제하였다.

Ammonium sulfate(30~80%)로 분별 침전시킨 후 활성을 갖는 효소를 DEAE-Sephacryl CL-6B 컬럼에 흡착된 결과 활성을 갖는 CMCCase는 컬럼에 붙었으며, 0~0.5 M NaCl 농도기울기에 의해 활성효소가 용출되었다(Fig. 1).

CMCCase 활성이 있는 부분을 모아 다음 실험인 Sephacryl S-200을 이용한 분리과정에 이용하였다(data 없음). Sephacryl S-200의 결과 활성이 있는 부분을 농축 및 투석한 후 최종단계인 Mono Q 컬럼을 이용한 FPLC의 분리 결과 두 개의 피크가 나타나는 chromatogram을 보였으며, 처음 나타난 피크에서 CMCCase 활성을 확인하였다(Fig. 2).

분자량 측정

FPLC에 의해 정제된 CMCCase의 분자량을 측정하기 위하여 10% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동을 한 결과는 Fig. 3과 같이 단일 밴드를 보였으며, 본 효소의 분자량은 전기영동의 결과로부터 표준단백질과 상대 이동거리를 비교한 결과 54 kDa인 것으로 나타났다. *S. rugosoannulata*가 생산하는 CMCCase의 분자량은 *Bacillus stearothermophilus*(Kim et al., 1997)가 생산하는 92 kDa의 CMCCase

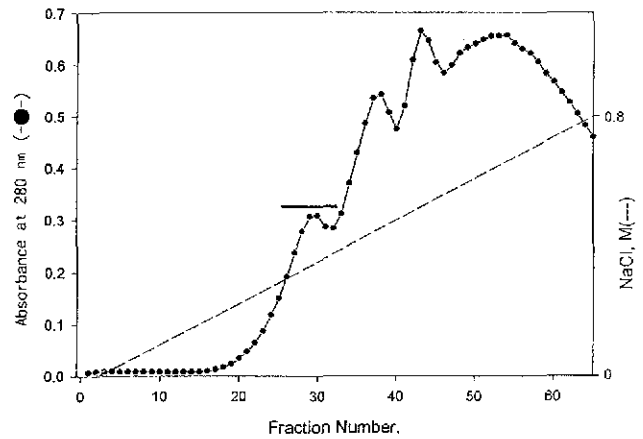


Fig. 1. Ion exchange chromatogram of the ammonium sulfate precipitate on DEAE-Sephacryl CL-6B. Fractions containing CMCCase activity, were pooled. Indicated as a bar in the chromatogram.

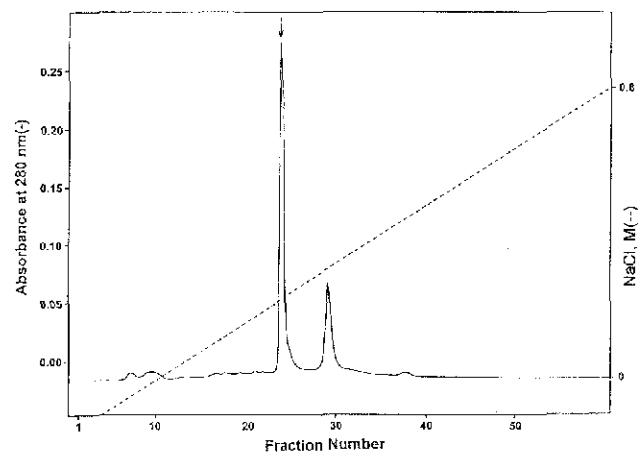


Fig. 2. FPLC profile of the fraction obtained from Sephacryl S-200 column chromatography. Mono-Q ion exchange column was used and the first peak showed a CMCCase activity.

와 *P. oryzae*(Kim and Kim, 1982)가 생산하는 80 kDa 보다는 작은 것으로 나타났으나, *Penicillium verruculosum*(Kim et al., 1993)이 생산하는 52 kDa의 CMCCase와는 유사한 것으로 나타났다.

Table 1. Purification of carboxymethyl cellulase from *Stropharia rugosoannulata*

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extract	22,993	7,200	3.3	100	1
Ammonium sulfate	19,551	141	138.7	81.5	41.6
DEAE-Sephacryl CL-6B	4,572	13.1	349	19.1	104.8
Sephacryl S-200	2,532	1.1	2,232.8	10.6	670.5
Mono Q (FPLC)	2,299	0.3	7,612.6	9.6	2,286.1

The enzyme assay for the CMCCase was carried out with 1% CMC in phosphate buffer (pH 6.5) at 40°C for 30 min. The reaction was stopped by 98°C for 10 min. The absorbance of the reaction mixture was measured at 280 nm. The enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme producing 1 μ mol of glucose per min. The protein concentration was determined according to the Lowry method.

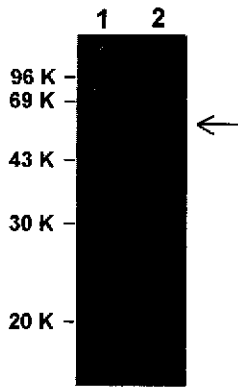


Fig. 3. SDS-PAGE of purified enzymes. Lane 1, protein marker; lane 2, CMCCase.

효소의 특성

효소의 열에 대한 안정성: *S. rugosoannulata*가 생산하는 CMCCase의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 10°C에서 90°C까지 온도를 달리하여 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 40°C에서 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 조사한 결과 Fig. 4에서와 같이 20°C부터 50°C사이에서는 비교적 안정하였으나 60°C 이상에서는 60%이상의 잔존활성을 유지하였다. *P. oryzae*(전, 1979)는 40°C까지는 안정하나 50°C 이상에서 불안정한 것으로 보고되었으며, *B. stearothermophilus*(Kim et al., 1997)는 본 균주가 생산하는 CMCCase와 유사한 특성을 나타냈다.

효소의 pH에 대한 안정성: *S. rugosoannulata*가 생산하는 CMCCase의 pH에 대한 안정성을 알아보기 위하여 pH 3.0에서 11.0까지 각각의 pH를 조정하여 40°C에서 30분 처리한 후 최적 pH인 5.0으로 조정하여 다음 CMCCase의 잔존활성을 측정하여 Fig. 5에서와 같이 pH 4.0에서 강한 효소활성이 나타났으며 pH 3~11.0 범위에서 40% 이상의 활성을 유지하였다.

금속염의 영향

분리 정제한 CMCCase의 활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 최종농도가 1 mM과 5 mM이 되도록

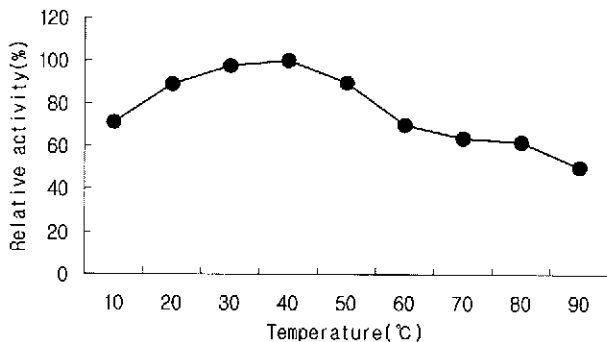


Fig. 4. Thermal stability on carboxymethyl cellulase activity.

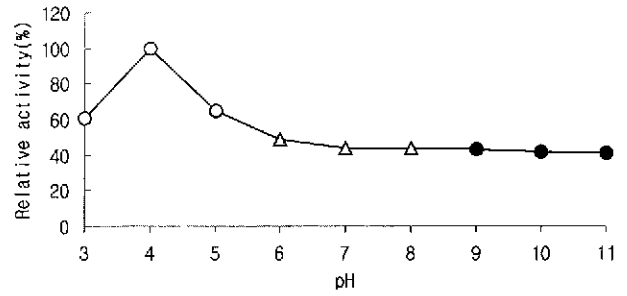


Fig. 5. pH stability on carboxymethyl cellulase activity. Enzyme reaction was carried out at 40°C for 30 min. -○- : acetate buffer, -△- : phosphate buffer, -●- : Tris buffer.

11종류의 금속염을 첨가하여 40°C에서 30분간 효소를 처리시킨 후 효소의 활성을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 그 결과 본 효소는 염의 농도가 증가하여도 활성에 큰 변화가 없지만 AgNO₃의 경우 염의 농도가 증가함에 따라 효소 활성이 크게 증가되었으며, MgSO₄, KCl 등에 의해서는 효소활성이 증가되었으나, ZnSO₄, BaCl₂, CaCl₂ 등에 의해서는 효소활성이 저해되었다.

EDTA 농도에 따른 영향

효소반응액에 EDTA 용액의 최종농도가 10⁻¹M에서 10⁻⁶M이 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 효소를 작용시킨 결과는 Fig. 6과 같았다. CMCCase는 EDTA 농도가 증가함에 따라 활성은 상대적으로 감소하였으며, 10⁻³M을 첨가하였을 때부터 활성이 급격히 감소하였다.

이와 같은 결과는 효소 구성성분에 금속이온을 갖고 있는 metalloenzyme으로 추정되며, apoenzyme과는 약하게 결합되었을 것으로 추정된다.

Table 2. Effects of inorganic salts on carboxymethyl cellulase activity

Inorganic salts	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
KCl	104	108
Al ₂ O ₃	105	104
CaCl ₂ · 2H ₂ O	104	102
FeCl ₃	107	105
AgNO ₃	88	103
BaCl ₂ · 2H ₂ O	105	102
MgSO ₄ · 7H ₂ O	99	104
CuSO ₄ · 7H ₂ O	103	103
HgCl ₂	103	105
MnSO ₄ · 7H ₂ O	102	103
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	108	102

The enzyme was preincubated with various metal ions in 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0) for 30 min at 40°C. After incubation, the mixture was subjected to the CMCCase assay. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.

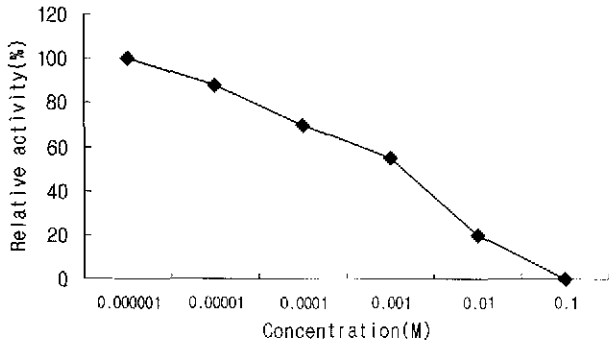


Fig. 6. Effect of EDTA on carboxymethyl cellulase activity from *Stropharia rugosoannulata*.

Table 3. Effects of inhibitors on carboxymethyl cellulase activity

Inhibitors	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
PMSF	100	100
SDS	90	88
EDTA	88	84
EGTA	100	98
1,10-Phenanthroline	100	75
KCN	99	84
L-Cysteine	100	86

The enzyme was preincubated with various inhibitors in sodium acetate buffer (pH 5.0) for 30 min at 40°C. After incubation, the mixture was subjected to the enzyme assay. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none. EDTA; ethylenediamine tetraacetic acid, EGTA; ethyleneglycol tetraacetic acid, PMSF; phenylmethylsulfonyl-fluoride, SDS; sodium dodecylsulfate.

저해제에 대한 영향

효소활성에 미치는 각종 저해제의 영향을 조사하기 위하여 저해제의 최종농도를 1 mM 및 5 mM이 되도록 첨가하여 50°C에서 30분간 효소를 작용시킨 후 잔존활성을 측정 한 결과는 Table 3과 같이 1,10-phenanthroline과 KCN 및 L-cysteine에 의해 효소활성이 크게 감소하는 것으로 나타났으며, SDS와 EDTA 및 EGTA에서는 활성이 약간 감소하는 것으로 나타났다.

적 요

*S. rugosoannulata*의 배양액으로부터 4단계를 거쳐 분자량이 54 kDa인 CMCCase를 분리 정제하였다. 이 효소는 pH 4.0에서 최대의 활성을 보여주는 acidic CMCCase로 40°C에서 최대활성을 나타냈다.

EDTA에 의해 활성이 저해되는 것으로 보아 metalloenzyme으로 추정되며 1,10-phenanthroline과 KCN 및 L-cystein 등의 저해제에 효소활성이 크게 감소하였으며, AgNO₃, MgSO₄, KCl 등의 금속염에서는 효소활성이 증가되었으나, ZnSO₄, BaCl₂, CaCl₂ 등에서는 효소활성이

저해되었다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 많은 도움을 주신 농촌 진흥청의 김양섭 박사와 석순자 연구원 및 상지대 화학과 김준호 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 본 연구는 2000년도 상지대학교 교내연구비의 지원으로 이루어 졌음을 밝히며 감사드립니다.

참고문헌

김명숙, 홍재식, 김명곤, 유숙, 최윤희. 1997. *Trametes trogii*에 의한 섬유소분해효소의 생산에 있어서 탄소원과 질소원의 영향. *Kor. J. Mycology* **25**: 68-76.

김옥한. 1988. 고온 열기성 섬유소 직접발효균주의 cellulase 특성 및 원형질체융합. 경북대학교 대학원 박사학위 논문.

성낙계. 1968. 섬유소분해효소에 관한 연구(제 1보): *Rhizopus* sp.가 생산하는 cellulase의 성질에 대하여. *한국미생물학회지* **6**: 87-91.

유관희, 장형수. 1999. 합성배지에서 *Stropharia rugosoannulata*가 생산하는 섬유소분해효소에 관한 연구. *한국균학회지* **27**: 94-99.

전상운. 1979. *Pyricularia oryzae*로부터 추출한 cellulase의 몇가지 성질에 대한 연구. *한국미생물학회지* **17**: 58-64.

정희진, 한성희, 안희균, 민경희. 1987. 섬유질 문화제로부터 분리된 *Aspergillus clavatus*의 섬유소분해효소에 관한 연구. *한국균학회지* **15**: 29-37.

홍재식, 김동한, 김명곤, 이극로, 김영수, 김명숙. 1988. *Lyophyllum decastes*를 이용한 벚꽃의 발효사료에 관한 연구. *한국균학회지* **16**: 128-134.

_____, 이지열, 김동한, 유근석. 1984. *Pleurotus sajor-caju*가 생산하는 섬유소분해효소의 성질에 관한 연구. *한국균학회지* **12**: 133-140.

_____, 최윤희, 윤세익. 1986. 합성배지에서 볼로초가 생산하는 섬유소분해효소에 관한 연구. *한국균학회지* **14**: 121-130.

Andreotti, R. E., Medeiros, J. E., Roche, C. and Mendels, M. 1981. Effects of strain and substrate on production of cellulase by *Trichoderma reesei* mutants. pp. 373-388, In: Ghose, T. K. Ed. *Bioconversion and Biochemical Engineering*. Vol. 1. New Delhi, India.

Beguin, P. and Albert, J. P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbil. Rev.* **13**: 25-28.

Berghem, L. E. R., Pettsson, L. G. and Axiofredriksson, U. B. 1976. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. *Eur. J. Biochem.* **61**: 621-630.

Chey, D. C., Kim, D. S., Yu, J. H. and Oh, D. H. 1990. Purification of cellulase produced from *Cellulomonas* sp. YE-5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 376-382.

_____, _____, _____ and _____. 1992. Properties of cellulase produced from *Cellulomonas* sp. YE-5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 164-168.

Coughlan, M. 1990. In "Microbial Enzymes and Biotechnology" (W. M. Fogarty and C. T. Kelly, eds), pp. 1-36. Elsevier Applied Science, London.

Drauz, K. and Waldmann, H. 1995. pp 325. In: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. VCH. New York.

Eriksson, K. E. and Pettersson, B. 1975. Extracellular enzyme

- system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the break down of cellulose. *Eur. J. Biochem.* **51**: 193-206.
- Fagerstam, L. G. and Pettersson, L. G. 1979. The cellulolytic complex of *Trichoderma reesei* QM 9414. *FEBS Letters* **98**: 363-367.
- Fumiyasu, F., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1985. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139. *J. GEM. Microbiol.* **131**: 3339-3345.
- Gilvert, H. J. and Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.
- Hakansson, U., Fagerstam, L. G., Pettersson, L. G. and Anderson, L. 1978. Purification and characterization of a low molecular weight 1, 4- β -glucanhydrolase from the cellulolytic fungus *Trichoderma viridae* QM 9414. *Biochem. Biophys. Acta.* **524**: 358-392.
- Hong, S. W., Min, K. H. and Rhee, Y. H. 1976. Partial purification and some properties of cellulase components from *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **14**: 84-94.
- Kanda, T., Wakabayashi, K. and Nishizawa, K. 1976. Purification and properties of an endocellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tuliferge*). *J. Biochem.* **79**: 977-988.
- Kim, J. H., Lee, J. C., Lee, Y. K., Kim, K. H., Chun, S. B. and Chung, K. C. 1993. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase IV from *Penicillium verruculosum*. *J. Mycology* **21**: 28-37.
- Kim, S. H., Cho, S. G. and Choi, Y. J. 1997. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 305-309.
- _____ and Kim, W. S. 1982. Studies on the isolation, purification and characterization of a Cx enzyme produced by *Pyricularia oryzae* C-7. *J. Mycology* **10**: 67-73.
- Lee, K. J. 1976. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Kor. J. Pharmacogn.* **7**: 85.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- Mandels, M. and Reese, E. T. 1964. *Industrial Microbiology* **5**: 5.
- Nisizawa, K., Tomita, Y., Kanda, T., Suzuki, H. and Wakabayashi, K. 1972. Substrate specificity of C₁ and Cx cellulase component from *Trichoderma viridae* and some of its properties. *J. Ferment. Technol.* **44**: 682-690.
- Reese, E. T., Sin, G. H. and Levinson, H. S. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives. *J. Bacteriol.* **59**: 485.
- Robson, L. M. and Chambliss, G. H. 1989. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme. Microb. Technol.* **11**: 626-644.
- Ryu, D. D. Y. and Mandels, M. 1980. Cellulase biosynthesis and applications. *Enzyme Microbiol. Technol.* **2**: 91-102.
- Saddler, J. N. 1993. *Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*. C. A. B. International, Oxford.
- Somogyi, M. 1962. Notes on sugar determination. *J. Biochem.* **195**: 19-23.
- Son, Y. J., Sul, O. J., Chung, D. K., Han, I. S., Choi, Y. J. and Jeong, C. S. 1997. Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C₄ producing cellulases. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 346-353.
- Tagagi, M. 1987. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogenperoxide in the presence of manganese compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 165-170.
- Wood, T. M. 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. *J. Biochem.* **61**: 621-630.
- _____ and McCrae, S. I. 1972. The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma koningii* cellulase. *J. Biochem.* **128**: 1183-1192.
- Wyman, C. E., Spindler, D. D., Grohman, K. and Lastick, S. M. 1986. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with the yeast *Brethanomyces clausenii*. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 221-228.
- Yoon, K. H., Jung, H. H. and Park, S. H. 1997. Isolation and enzyme production of a cellulase producing *Bacillus* sp. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 546-551.