

미생물유래의 섬유소 분해효소의 연구

(I) *Alternaria* sp.로 부터 추출한 Cellulase의 몇가지 성질에 대하여

김 은 수 · 이 순 진  
(연세대학교 이공대학 생물학과)

Investigation of Cellulase of Microbial origin

(I) Studies on some Properties of Cellulase isolated from *Alternaria* sp.

KIM, W. S. and LEE, S. J.

(Department of Biology, Yonsei University)

ABSTRACT

*Alternaria* sp. was isolated from soil and crude cellulases were prepared from wheat bran culture of the fungus. The activities of the crude enzyme were studied on five different substrates and some physical properties were also examined. Crude enzymes were purified by column chromatography on DEAE Sephadex and Sephadex. Isozymes were separated some of which were active specifically on DEAE-cellulose and some were primarily active on cellulose and CM-cellulose. The optimal points of pH and temperature for the crude enzyme were varied depending on the substrates; On cellulose they were at pH 6.0 and 40°C, on CM-cellulose at pH's 4.0 and 6.0 and 60°C, and on DEAE-cellulose at pH 5.0 and 50°C. Two active fractions, F-I and F-II on Na-CMC were separated from DEAE Sephadex column chromatography. When Na-CMC was used as substrate the Km values of crude enzyme, F-I and F-II were calculated to be  $4 \times 10^{-5}$ ,  $1.1 \times 10^{-4}$ , and  $1.25 \times 10^{-4}$  mM respectively. The Ki value of  $\text{Cu}^{++}$  for crude enzyme was  $4 \times 10^{-1}$  mM, while that of  $\text{Mn}^{++}$  was  $1 \times 10^{-2}$  mM. Both  $\text{Cu}^{++}$  and  $\text{Mn}^{++}$  greatly influenced on the activities of crude enzyme, F-I and F-II. The activity of crude enzyme was inhibited by 77% in 3mM  $\text{Cu}^{++}$  while in the same concentration of  $\text{Mn}^{++}$  it reached to 91%. Some 57% activity of F-I was inhibited in 2 mM  $\text{Cu}^{++}$ , whereas it was inhibited as much as 81% in the same concentration of  $\text{Mn}^{++}$ . F-II enzyme was inhibited by 19% in 0.3 mM  $\text{Cu}^{++}$  but was activated above the concentration of 0.3 mM with its activity reaching up to 137% in 2 mM. On the other hand the F-II was inhibited by the presence of  $\text{Mn}^{++}$  and some 67% activity was inhibited at 2mM.

서 론

섬유질 분해효소는 사료공업, 의약품, 식품, 섬유가공 등에서 널리 이용되고 있는

효소로 미생물, 특히 대다수의 곰팡이가 이 효소를 보유하고 있다는 사실이 발견되어 많은 미생물 학자들의 관심을 끌고 있다.

Reese (1954) 등은 *Myrothecium verrucaria* 로 부터 두 cellulase 를 순화, C<sub>1</sub>, C<sub>x</sub> factor 를 주장했고 Selby 와 Maitland (19

脚註: 本論文은 産學協同財團의 研究補助費에 依하여 수행되었음.

67)는 *Trichoderma viride*에서 C<sub>1</sub>, C<sub>x</sub>, cellobiase 등 3가지를 순화하여 상호작용을 보고했다. 이 후 *Aspergillus niger* (Ikeda 1967) *Trichoderma koningii* (Wood, 1968), *Fusarium solani* (Wood, 1971) *penicillium natatum* (Pettersson, 1968) *Stachybotrys atra* (金 1976) *Aspergillus oryzae* (Jermyn, 1952) 등에서 cellulase가 순화되어 cellulase가 단일효소가 아님을 증명했다. 이와 병행하여 순화된 cellulase 활성에 미치는 pH (Ikeda, 1967, 1973, Iwasaki, 1965, Kim 1976, Okada 1975, Sison 1958, Wood 1967, Wood 1971) 및 온도 (Ikeda, 1967, 1973, Iwasaki, 1965, Kim 1976, Okada 1975, Sison 1958, Wood 1967, Wood 1971) 금속이온의 영향 (Ikeda 1967, Kim 1975, Okada 1975, Sison 1958) 및 효소역학 (Cketkarov, 1969)에 대한 연구가 진행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

균주는 토양에서 분리한 *Alternaria sp.*를 사용하고 기질로는 Na-CMC (일본 花城 산업, 분자량 약 115,000) cellulose, DEAE-cellulose, CM-cellulose (독일 E. Merck)와 Sucrose (일본 昭和化學), soluble Starch (일본 島久산업)을 사용했으며 DEAE Sephadex A-25-120 (SIGMA)와 Sephadex G-75-120 (SIGMA)을 효소의 순화를 위한 Colum Chromatography에 사용했다.

### 2. 방 법

#### 1) 토양에서의 *Alternaria sp.*의 분리

두개의 시험관을 준비하여 한 시험관에는 증류수와 여과지를 넣고 또 한 시험관에는 1.5% cellulose 용액을 넣어 멸균한 다음, 여기에 1,000배 희석한 토양을 넣어 실온에 방치했다. 11일 후 시험관내에서 자라는 곰팡이 균사와 같이 보이는 흰 사상균체를 다시 nutrient agar plate로 옮겨 배양하여 이중 가장 cellulase 활성이 높은 *Alternaria*

*sp.*를 분리해 냈다.

#### 2) 효소 제조

밀기울 3 gram 을 100ml 삼각 플라스크에 넣고 증류수 5ml 을 골고루 뿌린 후 멸균하여 *Alternaria sp.*를 접종, 30°C에서 8일간 배양하여 반 고체화된 배지를 막자사발로 마쇄하여 0.1M acetate buffer를 30ml 가 하고 4°C에서 4시간 동안 방치 후 원심분리 (3,500 rpm/30min)하여 상등액을 crude cellulase 로 사용했다.

#### 3) 각 기질에 대한 효소 활성의 측정

1% cellulose, 1% CM-cellulose, 1% DEAE-cellulose 1% starch, 1% sucrose, 0.6% Na-CMC 각 1.0ml 에 0.1M acetate buffer (pH 5.0) 0.6ml 및 효소액을 섞어 40°C에서 1시간동안 반응 시킨 후 생성되는 환원당의 양을 Somogyi-Nelson의 변법으로 Beckman Spectrophotometer DB-G로써 540nm에서의 흡광도를 측정함으로써 효소의 활성을 결정했다.

#### 4) 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

효소의 활성 측정법 중 온도 조건을 다양하게 하여 생성되는 환원당의 양을 측정, 각 온도에서의 활성을 비교했다.

#### 5) 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

효소의 활성 측정법 중 buffer의 pH를 다양하게 하여 생성되는 환원당의 양을 측정, 각 pH에서의 활성을 비교했다.

#### 6) 효소의 순화

가. DEAE Sephadex Column Chromatography.

Crude cellulase 5ml 을 0.05M acetate buffer (pH 4.0)에 의해 평형 상태를 이룬 DEAE-Sephadex A-25 Column (2.0×35 cm, 1.1×35cm)에 올려 0.05M acetate buffer (pH 4.0) 및 1M NaCl 용액의 차례로 12 drops/min의 흐름속도(flow rate)로 1 tube에 3ml 및 5ml씩 받았다.

나. Sephadex Column Chromatography

DEAE sephadex A-25 column chromatography에 의해 나타난 4개의 peak 중 단백질 O.D.당 제일 높은 효소 단위를 나타

내고 있는 peak 를 선정하여 이것을 0.05M acetate buffer 로 평형상태를 이룬 Sephadex G-75 (1.1×35cm)에서 동일한 buffer 로 12 drops/min 의 흐름속도로 1 tube에 3ml 씩 받았다.

7) 효소 역학(Enzyme kinetics)

가. Michaelis 상수(K<sub>m</sub>)

여러 농도의 Na-CMC 를 사용, cellulase 의 활성 측정법과 동일한 방법에 의해 생성되는 환원당의 양을 측정, Lineweaver-Burk plot 에 의해 K<sub>m</sub> 값을 결정했다.

나. 저해 상수(K<sub>i</sub>)의 결정

서로 다른 두 농도의 Na-CMC 용액과 효소의 활성을 저해하는 금속이온이 여러 농도로 포함된 0.1M acetate buffer(pH 5.0) 를 사용, cellulase 의 활성 측정법과 동일한 방법에 의해 생성되는 환원당의 양을 측정하여 Dixon 의 방법에 의해 각 금속이온의 효소에 대한 K<sub>i</sub> 값을 결정했다.

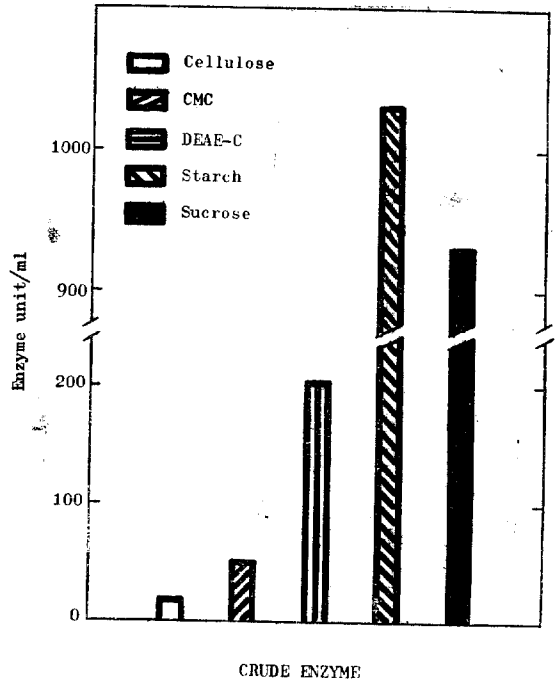


Fig.1. Enzyme Activity of Crude Enzyme on 5 Different Substrates. The enzyme activity was determined at pH 5.0 by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and 5 each substrates for 1 hour.

결 과

1. 5가지 서로 다른 기질에 대한 crude enzyme 과 부분 순환된 enzyme 의 작용

1) 각 기질에 대한 crude enzyme 의 작용

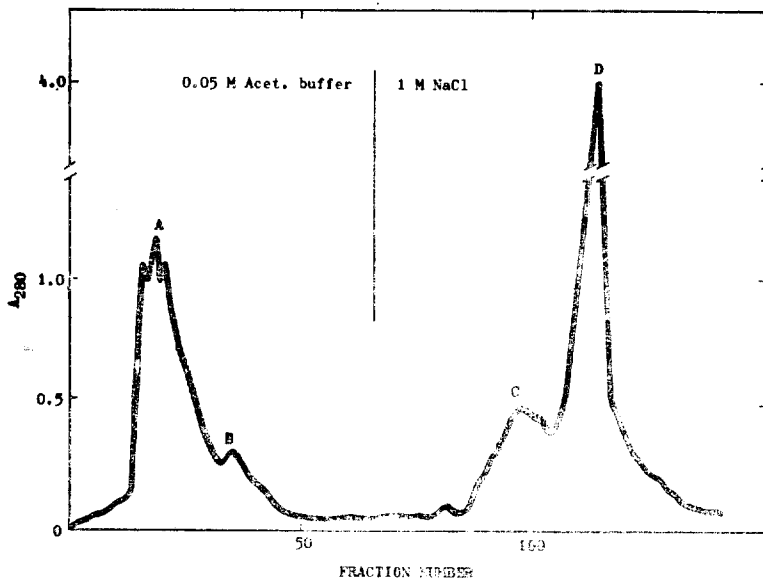


Fig. 2. Chromatogram of Crude Enzyme on DEAE Sephadex A-25 Column. Sample; 5 ml Crude Enzyme. Column size; 2.0×35cm, Flow rate; 12 drops/min 1 tube vol.; 3 ml

crude enzyme 을 cellulose 와 이의 유도체인 CM-cellulose, DEAE-cellulose 및 Sucrose, Starch 에서의 활성도를 비교해 본 결과 모두 활성을 보이고 있어 여러종류의 효소가 함유되어 있음을 암시하고 있다. (Fig. 1)

2) crude enzyme 의 DEAE-Sephadex Column Chromatography

여기에서는 peak A,B,C,D 가 0.05M acetate buffer(pH 4.0) 와 1M NaCl 에서 얻어졌다. <Fig. 2>

3) 각 기질에 대한 peak A,B,C,D 의 작용 peak A,C,D 에서는 5가지의 기질에 모두 활성을 보였으며 B 에서는 DEAE-cellulose 에만 약한 활성을 보였다. <Fig. 3>

4) Peak C 의 Sephadex Column Chromatography

(Fig. 2) 의 peak A,B,C,D 중에서 protein O.D. 당 제일 높은 효소 단위를 나타내고 있는 C peak 를 선정하여 rechromatography 한 결과 peak C-I, C-II, C-III, C-IV, C-V 를 얻었다. <Fig. 4>

5) 각 기질에 대한 peak C-I ~C-V 의 작용

각 peak 들의 활성을 측정한 결과 C-I 은 starch, sucrose 에서 활성을 보였으며

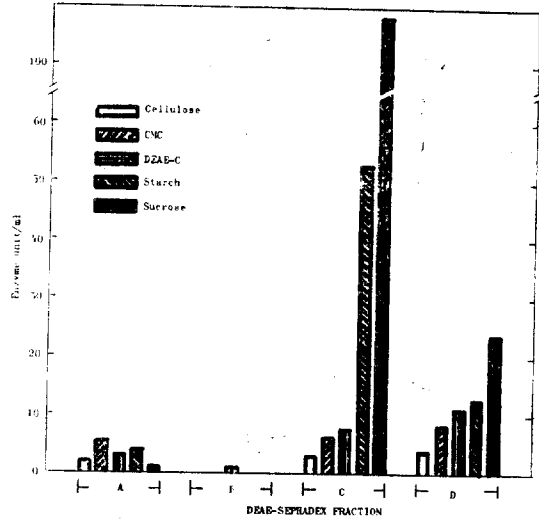


Fig. 3. Enzyme Activity of Peak A-D on 5 Different Substrates. A 0.5 ml of each peak was analyzed for the enzyme activity using standard method.

C-II 는 starch 에서 C-III 는 DEAE-C 와 sucrose 에서 그리고 C-IV 는 sucrose 에서 C-V 는 CMC, cellulose 에서 각각 활성을 보였다. <Fig. 5>

2. 3가지 서로 다른 기질에 대한 crude enzyme 의 성질

1) 각 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

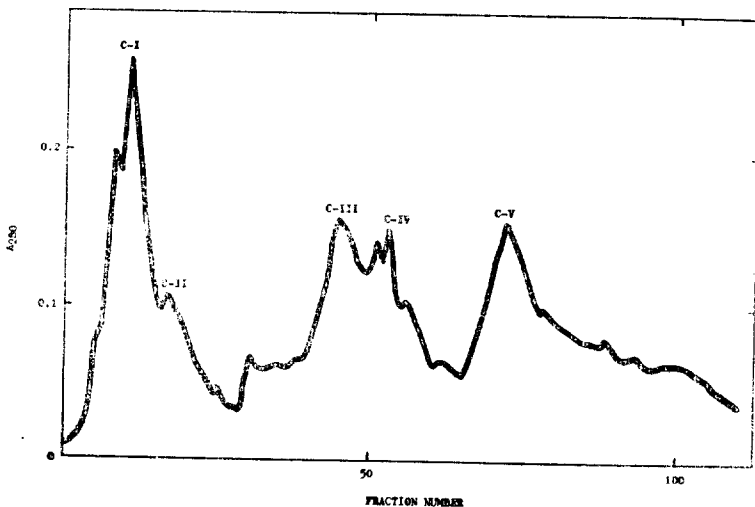


Fig. 4. Chromatogram of Peak C on Sephadex G-75 Column Sample; 3 ml peak C Column size; 1.1x35 cm Flow rate; 12 drops/min 1 tube vol.; 3 ml

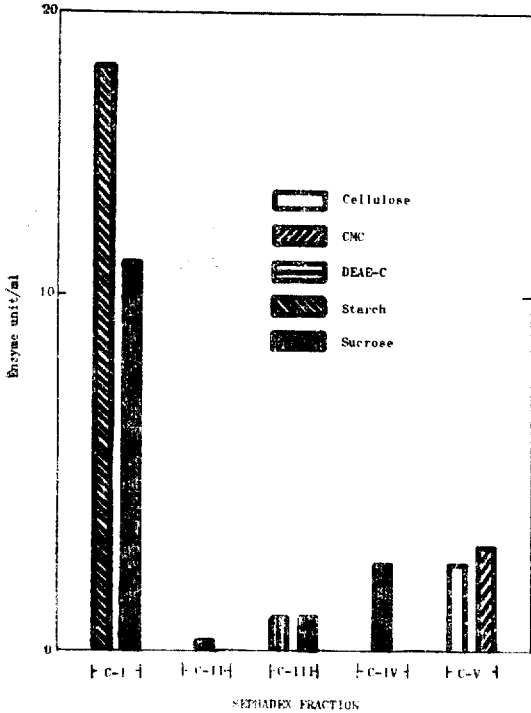


Fig. 5. Enzyme Activity of Peaks. C-I~C-V on 5 Different Substrates. A 0.5 ml of each peak was analyzed for the enzyme activity using standard method.

cellulase 는 40°C 에서 가장 강한 활성을 나타내고 CM-cellulase는 60°C 에서 가장 강한 활성을 보였으며 DEAE cellulase는 50°C 에서 가장 강한 활성을 나타냈다. <Fig. 6>

2) 각 효소의 활성에 미치는 pH의 영향 cellulase 는 pH 6.0에서 가장 강한 활성을 나타내고 CM-cellulase 는 pH 4.0 및 6.0에서 가장 강한 활성을 나타냈으며 DEAE-Cellulase 는 pH 5.0에서 가장 강한 활성을 보였다. <Fig. 7>

3. Na-CMC 에 대한 crude enzyme 과 부분 순화된 enzyme 의 성질

1) crude enzyme 의 Michaelis 상수(Km) pH 5.0에서 Na-CMC 를 기질로 한 경우 crude enzyme 의 Km 값은  $4 \times 10^{-5}$  mM 이었다. <Fig. 8>

2) crude enzyme 의 저해 상수(Ki) pH 5.0에서  $3.13 \times 10^{-5}$  mM 및  $5.22 \times 10^{-5}$  mM 의 Na-CMC 를 기질로 할 경우  $Cu^{++}$  의 Ki 값은  $4 \times 10^{-1}$  mM 이었고 (Fig 9)  $Mn^{++}$  의 Ki 값은  $1 \times 10^{-2}$  mM 이었다. (Fig. 10) 여기에서는 두 금속이온이 모두 비경쟁적 저해작용을 하고 있음을 보여준다.

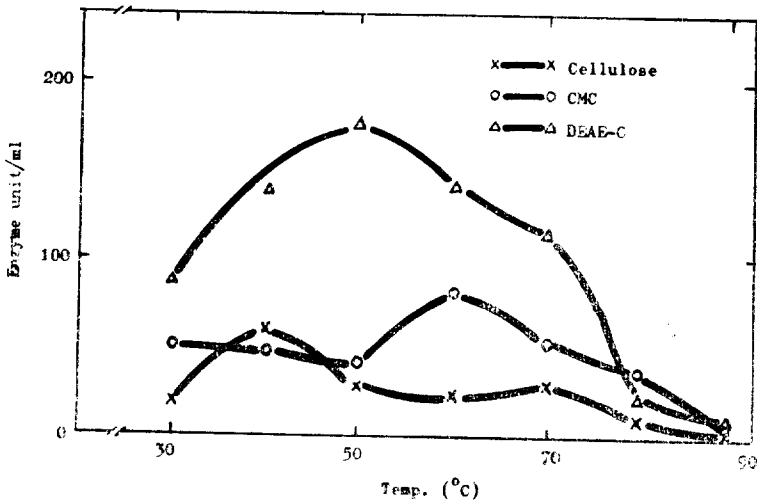


Fig. 6. Effect of Temperature on the Activities of Crude Enzyme acting on cellulose and its Derivatives.

The crude enzyme activity was determined at pH 5.0 by measuring the reducing power of glucose after incubation the mixture of enzyme and 3 each substrates for 1 hour at various temperatures.

3) crude enzyme의 DEAE-Sephadex Colume Chromatography와 각 분획의 Na-CMC에 대한 성활.

여기에서는 Na-CMC에 활성을 보이고 있는 peak F-I, F-II를 얻었으며 이것들이 다른 종류의 단백질 peak와 분리되었음을 보여주고 있다. <Fig. 11>

4) peak F-I과 F-II의 Michaelis 상

수(Km)

F-I은 Km 값이  $1.0 \times 10^{-4}$  mM 이었고 F-II는 Km 값이  $1.25 \times 10^{-4}$  mM 이었다.

<Fig. 12>, <Fig. 13>

5) peak F-I과 F-II의 금속이온에 대한 영향

peak F-I은  $\text{Cu}^{++}$ 에서는 2mM에서 57%가 억제되고  $\text{Mn}^{++}$ 에서는 같은 농도에서

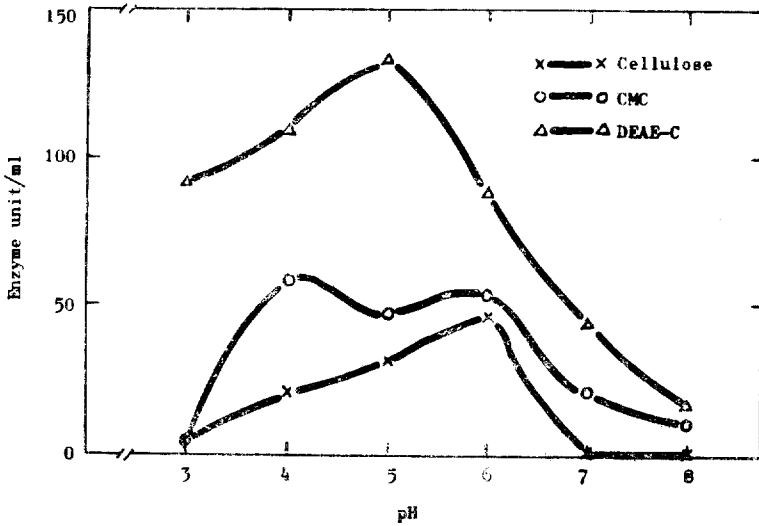


Fig. 7. Effect of pH on the Activities of Crude Enzyme acting on cellulose and its Derivatives. The crude enzyme activity was determined at pH 5.0 by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and 3 each substrates for 1 hour at various pH's.

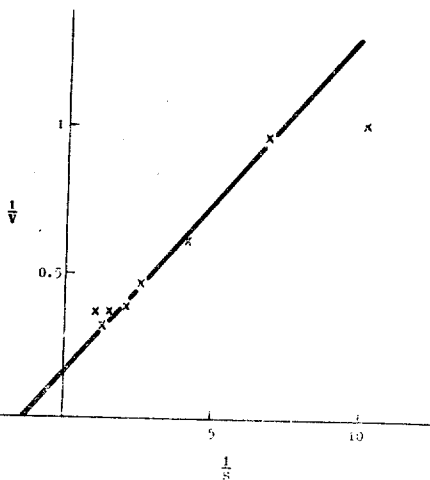


Fig. 8. Lineweaver-Burk Plot of Crude Enzyme

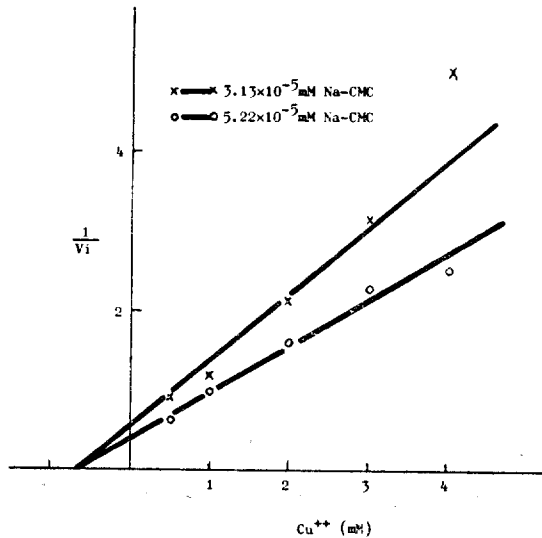


Fig. 9. Plot for the Inhibition Constant of  $\text{Cu}^{++}$  on the Activities of Crude Enzyme.

81%가 억제되고 있다. <Fig. 14>  
 peak F-II는  $\text{Cu}^{++}$ 에서는 0.3mM에서  
 19%가 억제되고 있으나 0.3mM 이상에서

는 활성이 증가되어 2mM에서는 137%의  
 활성을 보이고 있고  $\text{Mn}^{++}$ 에서는 2mM에서  
 67%가 억제되고 있다. <Fig. 15>

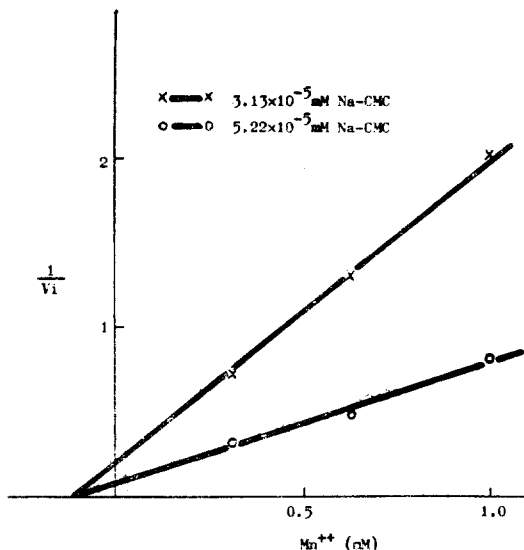


Fig. 10. Plot for the Inhibition Constant of  $\text{Mn}^{++}$  on the activities of Crude Enzyme.

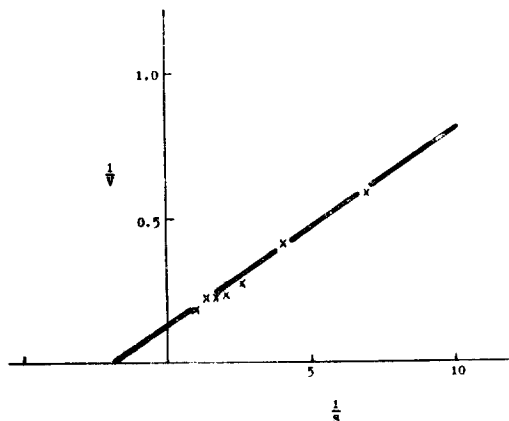


Fig. 12. Lineweaver-Burk Plot of F-I

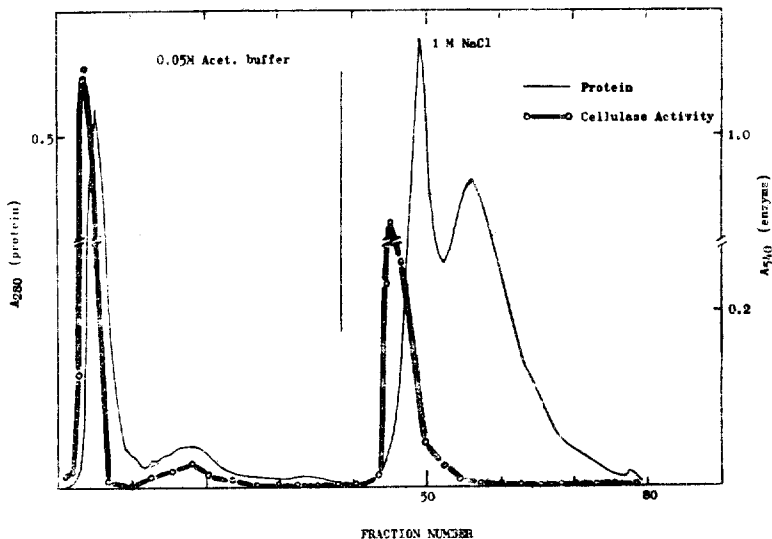


Fig. 11. Chromatogram of Crude Enzyme on DEAE Sephadex A-25 Column and Enzyme Activity on Na-CMC.

Sample; 5 ml crude enzyme Column size; 1.1×35cm Flow rate; 12 drops/min 1 tube vol.; 5 ml A 0.5 ml of each fraction was analyzed for the enzyme activity using standard method.

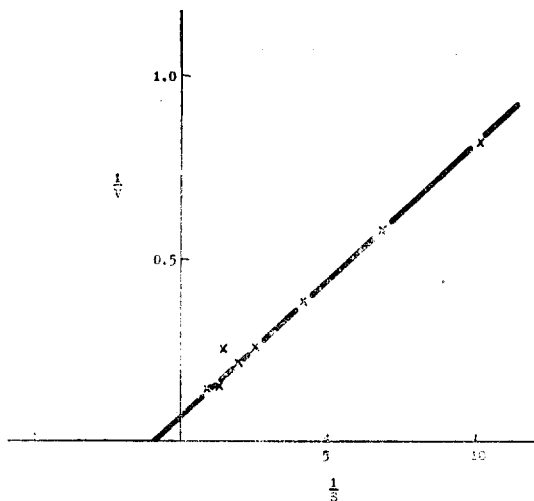


Fig. 13. Lineweaver-Burk Plot of F-II

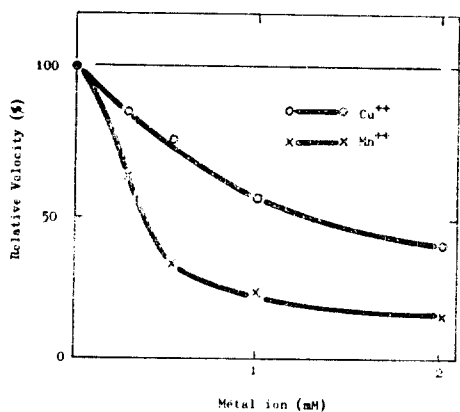


Fig. 14. Effect of  $Cu^{++}$  and  $Mn^{++}$  Ions on the activities of F-I

The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0.

고찰

Crude enzyme 이 5가지의 서로 다른 기질에서 모두 활성을 나타내고 있으며 이것을 Column chromatography 를 통해 부분 순화하여 cellulose 와 CMC 를 분해하는 효소와 DEAE-cellulose 를 분해하는 효소로 분리한 것은 cellulose 를 분해하는 효소가

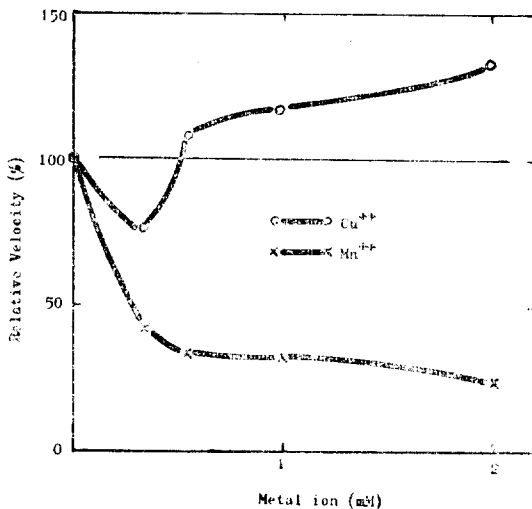


Fig. 15. Effect of  $Cu^{++}$  and  $Mn^{++}$  ions on the activities of F-II

The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0.

분리될 수 있는 복합 효소임을 증명하는 것으로 여기에서는 분리되지 않고 있는 cellulose 와 CMC 를 분해하는 효소도 개량된 순화방법에 의해 분리될지도 모른다는 것을 암시하고 있다.

또한 crude enzyme 이 cellulose, CMC, DEAE-C 기질에서의 효소 작용특성이 전부 다르게 나타나고 있다는 것은 이 3가지 기질을 분해하는 효소가 각각 다른 효소일지도 모른다는 가정을 뒷받침 해 주고 있다.

Na-CMC 를 기질로 했을 때의 crude enzyme 과 F-I, F-II 의  $K_m$  값이 각각  $4 \times 10^{-5}$ ,  $1.1 \times 10^{-4}$ ,  $1.25 \times 10^{-4}$  mM 로 전부 다르게 나타나고 있으며  $Cu^{++}$  와  $Mn^{++}$  에 의한 억제작용도  $Cu^{++}$  인 경우, 같은 2mM 에서 crude enzyme 이 71%, F-I 이 57% 효소 활성이 억제된 반면 F-II 는 37% 활성이 증가된 것을 나타내고 있어 F-I 이나 crude enzyme 과는 달리, 효소활성이 촉진되었음을 보여주었고  $Mn^{++}$  에서는 같은 2mM 에서 crude enzyme 이 85%, F-I 이 81%가 억제되었고 F-II 는 67%가 억제되어 모두 다



를 억제도를 보여 이들이 서로 다른 효소일 것임을 지지하고 있다.

Crude enzyme 과 F—I 은 다같이  $\text{Cu}^{++}$  보다  $\text{Mn}^{++}$ 에 의해서 활성이 더 억제되고 있고 F—II에서는 0.3mM 이상에서 활성이 증가되고 있어 *S. atra*(Kim 1976) 및 *T. viride*(Okada 1975) *T. koningi*(Iwasaki 1965) 등에서  $\text{Cu}^{++}$ 가 저해제로 작용하며 *A. niger*(Ikeda 1973)에서는 1mM에서 활성에 영향을 미치지 않고 10mM  $\text{Cu}^{++}$ 에서 77%의 활성이 남아 있으며 *M. verrucaria*에서 10mM  $\text{Cu}^{++}$  때 24%의 활성이 나타난다고 한 논문들에서 보는 바와 같이 일반적으로 cellulase의 저해제로 알려져 있는  $\text{Cu}^{++}$ 가 F—II에서는 촉진작용을 하고 있음을 보여주고 있다.

Crude enzyme의 기질과의 반응시 최적 온도가 cellulose에서는 40°C로서 *A. niger*(Ikeda 1967)와 같은 결과를 보이고 있으며 CMC에서는 60°C로서 *A. luchuensis* 및 *Poria vaillantii*(Chetkarov 1969)의 60°C와 같게 나타났고 DEAE-cellulose에서는 50°C로서 *T. viride*(Okada 1975)와 같았다. 또 최적 pH는 cellulose가 pH 6.0으로 *S. atra*(Kim 1976)에서 순화된 F—IV와 같은 결과를 보였고 CMC에서는 pH 4.0 및

6.0으로 *A. niger*(Ikeda 1967)의 *T. viride*(Okada 1975) *T. koningi*(Iwasaki 1965)의 pH 4.5—5.0, *A. luchuensis*의 pH 5.0 *F. solani*(Wood 1671)의 pH 5.0—5.5와 비슷한 경향을 보였다.

여기에서 나타난 crude enzyme 과 F—I, F—II의 Km 값에서 crude enzyme 이 F—I 이나 F—II보다 Na-CMC와 친화력이 크게 나타난 것은 이것이 단일 효소가 아닌 여러 효소가 상호(synergism) 작용을 하고 있다고 해석할 수 있으며 다른 균주에서 분리한 효소의 Km 값과 비교할때  $5 \times 10^{-4}$ mM 인 *S. atra*(Kim 1976) 보다 약 10배 정도 친화력이 강하며  $3.6 \times 10^{-2}$ M인 *A. oryzae*(Chetkarov 1969) 보다는 약 1,000배 정도 친화력이 크다는 것을 보여주고 있다.

Crude enzyme의  $\text{Cu}^{++}$ 와  $\text{Mn}^{++}$ 의 저해 상수(Ki)를 다른 균주에서의 Ki 값과 비교할 때  $\text{Cu}^{++}$ 에서  $2 \times 10^{-1}$ mM 이고  $\text{Mn}^{++}$ 에서  $8 \times 10^{-2}$ mM 인 *S. atra*(Kim 1976) 보다  $\text{Cu}^{++}$ 에서는 덜 민감했고  $\text{Mn}^{++}$ 에서는 더 민감한 저해작용을 보였다. 또 이들 이온은 둘 다 비경쟁적 저해 작용을 하고 있어 *S. atra*(Kim 1976)가 경쟁적 저해작용을 하고 있는 것과 아주 대조적인 결과를 보이고 있다.

## 적 요

*Alternaria sp.*를 재료로 하여 cellulase를 분리 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DEAE Sephadex와 Sephadex Column Chromatography를 통해 DEAE-cellulose를 분해하는 효소와 CM-cellulose와 cellulose를 분해하는 효소를 분리했다.
2. Crude enzyme의 cellulose와 이의 유도체인 CM-cellulose, DEAE-cellulose 기질에서의 효소 작용 특성은 최적온도가 cellulose에서는 40°C CMC에서는 60°C, DEAE-C에서는 50°C로 나타났고 최적 pH는 cellulose가 6.0, CMC가 4.0 및 6.0, DEAE-C가 5.0으로 나타났다.
3. Na-CMC를 기질로 했을 때 crude enzyme 과 F—I, F—II의 Km 값은 각각  $4 \times 10^{-4}$ mM,  $1.1 \times 10^{-4}$  mM,  $1.25 \times 10^{-4}$ mM 이었다.
4. Crude enzyme은  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ 에 대한 Ki 값이 각각  $4 \times 10^{-1}$ mM,  $1 \times 10^{-2}$ mM 이었으며 두 금속이온이 모두 비경쟁적 저해작용을 하고 있다.
5. Crude enzyme의 활성은 3mM  $\text{Cu}^{++}$ 에서 77%가 억제되었고 같은 농도의  $\text{Mn}^{++}$ 에서는 91%가 억제되었다. F—I의 활성은 2mM  $\text{Cu}^{++}$ 에서 57%가 억제되고  $\text{Mn}^{++}$ 에서는 같은 농도에서 81%가 억제되었으며 F—II는  $\text{Cu}^{++}$ 에서는 0.3mM에서는 19%가 억제되었으나 0.3mM 이상에서는 활성이 증가되어 2mM에서는 137%의 활성을 보였고  $\text{Mn}^{++}$ 에서는 2mM에서 67%가 억제되었다.

## 인 용 문 헌

1. Chetkarov, M, and D. Kolev, 1969. Viscometric determination of the Michaelis-Menten constant Of B-1, 4-glucan-4-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.4.) (Cx-Cellulase Enzyme). *Monatsh. Chem.*, **100** (3), 986.
2. Ikeda, R., T. Yamamodo, and M. Funatsu, 1967. Purification and some properties of cellulases from *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.*, **31** (10), 1201.
3. Ikeda, R., T. Yamamodo, and M. Funatsu, 1973. Chemical and enzymatic properties of acid-cellulase produced by *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.*, **37** (5), 1169.
4. Iwasaki, T., R. Ikeda, K. Hayashi, and M. Funatsu, 1965. Biochemical studies on cellulase. II. Properties of two types of cellulase from *Trichoderma koningii*. *J. Biochem.*, **57**, (4), 478.
5. Jermyn, M.A., 1952. Fungal cellulases. II. The complexity of enzymes from *Aspergillus oryzae* that split B-glucosidic linkages, and their partial separation. *Aust. J. Biol. Sci.*, **5** (4), 433.
6. Kim, Y.M., 1976. Studies on some properties of cellulase isolated from *Stachybotys atra*. Master's thesis, Yonsei Univ.
7. Okada, G. 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. Purification and properties of two cellulases. *J. Biochem.*, **77**, 33.
8. Petterson, G, 1968. Studies on cellulolytic enzymes III. Isolation of a cellulase from *Penicillium notatum* Arch. *Biochem. Biophys.*, **123**.
9. Reese, E.T, R.G.H. Sui, and H.S. Levinson, 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.*, **59**, 483.
10. Selby, K. and C.C. Maitland, 1967. The cellulase of *Trichoderma viride*. Separation of the components involved in the solubilization of cotton. *Biochem. J.*, **104**, 716.
11. Sison. B.C., Jr., W.J. Schubert, and F.F. nord, 1958. On the mechanism of enzyme action LXV. A cellulolytic enzyme from the mold *Poria vaillantii*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 260.
12. Wood. T.M, 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. *Biochem. J.*, **109**, 217.
13. Wood. T.M. 1969. The cellulase of *Fusarium solani* Resolution of the enzyme complex. *Biochem. J.*, **115**, 457.
14. Wood. T.M, 1971. The cellulase of *Fusarium solani*, Purification and specificity of the B-(1-4)-glucanase and the B-D- glucosidase components. *Biochem. J.*, **121**, 353.