

Loweporus roseoalbus가 생산하는 Carboxymethyl Cellulase의 정제 및 특성

장형수¹ · 김준호² · 유관희*

¹상지대학교 이공과대학 식품영양학과, ²화학과, 생명과학과

Purification and Characterization of Carboxymethyl Cellulase from *Loweporus roseoalbus*

Hyung-Soo Chang¹, Jun-Ho Kim² and Kwan-Hee Yoo*

¹Department of Food & Nutrition, ²Chemistry and *Biological Science, Sang-Ji University, Wonju 220-702, Korea

(Received April 11, 2005)

ABSTRACT: A carboxymethyl cellulase (CMCase) has been purified from *Loweporus roseoalbus*. The molecular weight of the purified CMCase was estimated to be 28.5 kDa by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. The maximum activity of the purified CMCase was observed at pH 4.0 and 30°C, and stable for pH 3 to 5 to maintain 60% activity. The CMCase activity was activated by SDS and inhibited by PMSF and 1,10-phenanthroline. The enzyme activity was also decreased by the addition of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), suggesting that the purified CMCase is metalloenzyme.

KEYWORDS: CMCase, *Loweporus roseoalbus*, SDS-PAGE

오늘날 섬유소는 1970년대 석유과동을 거치면서 석유나 석탄처럼 소모되는 지하자원과는 다르게 계속 축적된다는 특성을 살려 섬유소를 가수분해하여 SCP(single cell protein)나 에탄올의 생산 등에 이용하고 있으며, 환경친화적으로는 폐수처리 및 폐기물 처리에 이용되고 있다(Gilbert and Hazlewood, 1993; Tagagi, 1978; Wyman *et al.*, 1986). 섬유소분해효소 중 특히 CMCase(Endo- β -1, 4-glucanase)는 exo- β -1,4-glucanase, β -glucosidase와 함께 섬유소분해효소 계의 구성효소로서 특히 곡물사료를 섭취하는 초식동물의 장내에서 이용성을 증진시키기 위한 연구가 이루어지고 있다(정 등, 2003).

섬유소분해효소는 세균(Kim *et al.*, 1997, 2004; Ko *et al.*, 2000) 및 진균인 *Trichoderma reesei*으로부터 생산성을 증대시키기 위한 연구와 돌연변이주를 이용하는 연구가 많이 이루어졌으며(Lee *et al.*, 1983; Montenecourt *et al.*, 1977; Stembrong *et al.*, 1979; Teeri *et al.*, 1983; Yoo *et al.*, 2003), 담자균류로는 두염큰갯버섯, 아교좁미섯, 벗짚버섯, 큰눈물버섯, 양송이, 독청버섯이새미(유 등, 2002), 화경버섯(유, 2003; 유 등, 2004) 등에 대해서 연구되었다.

이 버섯은 균심균류(Hymenomycetidae), 민주름버섯목(Aphylllophorales), 구멍장이버섯과(Polyphoraceae)에 속하며 자실체는 부분적이거나 완전한 배착성이며, 불완전한 갯을

형성하고 죽은 참나무의 낙지에서 주로 발생한다. 표면은 담회갈색, 안자갈색, 회흑색이며 종종 홈구(sulcate)가 있거나 평활하며, 대는 없고 갯의 측면 일부가 기주에 직접 부착하며, 자실층은 관공형이고, 관공은 담분홍색을 띤다.

본 연구는 섬유소분해효소 생성균인 *Roseofomes subflexibilis*의 배양학적 특성에 대해 보고한 전보(장, 2003)에 이어 *Loweporus roseoalbus*로부터 분리 정제한 carboxymethyl cellulase(CMCase)의 효소학적 특성에 대하여 실험한 결과 소정의 결과를 얻었기에 보고하고자 한다. 본 연구에 사용한 *Loweporus roseoalbus*(Berk. et Curt. Aoshi)는 일본에서 기재된 담자균류 *Roseofomes subflexibilis*로 현재 국내에서는 2004년 청장미구멍버섯(*Loweporus roseoalbus*)으로 명명되었다(Lee *et al.*, 2004).

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에서 보관중인 MKACC 01106 균주를 분양받아 공시균주로 사용하였다.

배지 및 배양방법

기본배지 1에 dextrose 12 g, yeast extract 17 g, (NH₄)₂HPO₄ 2 g, glutamine 2 g, Al₂(SO₄)₃·14H₂O 1.5 g을 첨가한 후 pH

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

4.0으로 조정된 최적배지 3 l를 250 ml 삼각플라스크 30개에 각각 100 ml씩 분주한 다음 121에서 15 psi로 20분간 고온가압살균하고 PDA 평판배지에서 자란 공시균주를 8 mm cork borer를 사용하여 균사체를 절단한 후 각각의 삼각플라스크에 접종하여 30°C에서 15일간 배양한 배양액을 실험재료로 사용하였다.

효소의 활성측정

CMCase 활성은 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 비색정량하였다(Kanda *et al.*, 1976). Glucose 표준품을 사용하여 같은 방법으로 standard curve를 작성하였으며, 효소활성도는 1분당 1 μ mol의 glucose를 생성하는 효소량을 1 unit로 하여 활성의 비교단위로 하였다.

단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법으로 측정하였으며, bovine serum albumin 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

효소의 정제

효소의 정제 과정은 4°C에서, 각 정제과정마다 CMCase 활성과 효소의 농도를 측정하며 수행하였다. 최적화배지에서 15일간 배양한 배양액을 4°C에서 4,500×g로 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 ammonium sulfate로 25%에서 75%까지 분별 침전시키고 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 50 mM phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 다음 같은 완충용액으로 24시간 투석하였다.

이후 ammonium sulfate 침전, Sephacryl S-200 컬럼 분리 및 FPLC 분리 과정은 이전의 보고(유관희 등, 2004)에 따라 수행하였다.

분자량 측정

단백질의 분자량 측정은 12% SDS-PAGE를 이용하였으며, 표준단백질로는 phosphorylase b(96 kDa), bovine serum albumin(69 kDa), ovalbumin(43 kDa), carbonic anhydrase(30 kDa), soybean trypsin inhibitor(20 kDa), α -lactalbumin(14.4 kDa)를 사용하였고, gel은 Coomassie blue R-250과 silver staining kit로 염색하였다.

열에 대한 안정성

CMCase의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 10°C에서 90°C까지 각각의 온도에서 효소를 30분간 열처리한 다음 40°C에서 30분간 기질과 반응시킨 후 잔류활성을 Somogyi 방법(1962)으로 조사하여 열에 대한 안정성을 조사하였다.

pH에 대한 안정성

CMCase의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.0에서 pH 11.0까지 각각의 pH로 조정하여 40°C에서 효소를 30분간 처리한 후 최적 pH 4.0으로 조정하여 기질을 첨가하고 40°C에서 30분 반응시킨 다음 잔류활성을 위와 동일한 방법으로 조사하여 pH에 대한 안정성을 조사하였다.

금속염에 대한 영향

CMCase의 활성에 미치는 금속염에 대한 영향을 조사하기 위하여 KCl, $Al_2(SO_4)_3$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $FeSO_4$, $AgNO_3$, $BaCl_2$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, Li_2SO_4 , $MnSO_4$, $ZnSO_4$, Na_2MoO_4 등 13종류의 금속염을 효소반응액에 최종농도가 각각 1 mM이 되도록 첨가한 다음 40°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 Somogyi(1962) 방법을 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 금속염에 대한 영향을 조사하였다.

저해제에 대한 영향

CMCase의 활성에 미치는 각종 저해제에 대한 영향을 조사하기 위하여 PMSF, SDS, EDTA, 1,10-phenanthroline, KCN, L-cysteine 등 6종류의 저해제를 효소반응액에 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 처리한 후 위와 동일한 방법으로 저해제에 대한 영향을 조사하였다.

EDTA 농도에 대한 영향

CMCase의 활성에 미치는 EDTA 농도에 대한 영향을 조사하기 위하여 효소반응액에 최종농도가 10^{-1} 에서 10^{-6} M이 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 처리한 후 위와 동일한 방법으로 조사하여 EDTA에 대한 영향을 조사하였다.

결 과

효소의 정제 및 분자량 추정

*Loweporus roseoalbus*부터 분리된 CMCase는 Table 1에서와 같이 정제되었다. 암모늄염 침전 후 DEAE-Sephacryl CL-6B 컬럼에 의한 효소의 용출은 0~0.5 M NaCl 농도기울기에서 이루어졌다(Fig. 1).

Ion exchange 후 얻어진 분획을 Sephacryl S-200 컬럼에 적용한 결과 2개의 주요 피크를 분리하였다(Fig. 2). 분리된 피크중 활성이 있는 부분을 농축 및 투석하여 Mono Q 컬럼을 이용한 FPLC를 수행한 결과 세 개의 피크가 나타나는 chromatogram을 보였으며, 세번째 나타난 피크에서 CMCase 활성을 확인하였다(Fig. 3). 활성이 확인된 정제된 효소를 12% SDS-PAGE 분석한 결과 분자량이 28.5 kDa에 이르는 단일밴드를 보였었다(Fig. 4). 이는 효소가 순수하게 정제 되었음을 보여주는 동시에 그 크기가 30 kDa보다 작음을 나타낸다.

효소의 특성

열에 대한 안정성: *L. roseoalbus*가 생산하는 CMCase의

Table 1. Purification of carboxymethyl cellulase from *Loweporus roseoalbus*

Purification step	Total activity (u)	Total protein (mg)	Specific activity (u/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extract	225,508	10,116	22.3	100	1
Ammonium sulfate (25~75%)	80,909	1,000.5	80.9	35.9	3.6
DEAE-Sepharose Cl.-6B	38,134	47.3	806.2	16.9	36.1
Sephacryl S-200	16,775	3.1	5,428.8	7.4	243.4
MonoQ (FPLC)	8,377	0.9	9,307.8	3.7	417.4

The enzyme assay for the CMCase was carried out with 1% CMC in phosphate buffer (pH 6.5) at 40°C for 30 min. The reaction was stopped at 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 mole of glucose per min. The protein concentration was determined according to the Lowry's method.

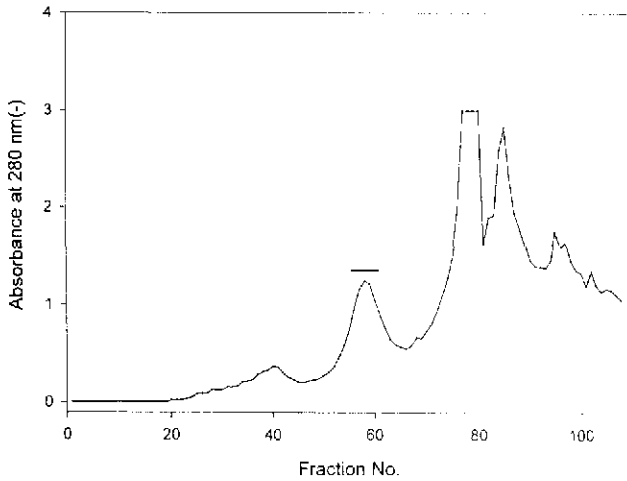


Fig. 1. Elution profile of cellulase with DEAE Sepharose column. Fractions containing CMCase activity were indicated as a bar in the chromatogram.

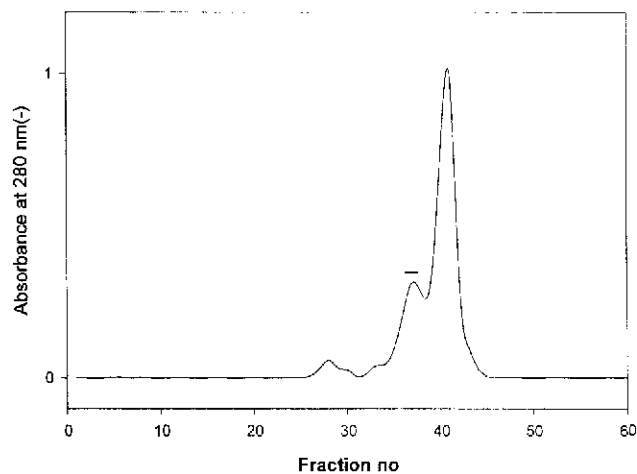


Fig. 2. Elution profile of cellulase with Sephacryl S-200 column. Fractions containing CMCase activity were pooled and indicated as a bar in the chromatogram.

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. 5에서와 같이 20°C부터 40°C 사이에서는 비교적 안정하였으나,

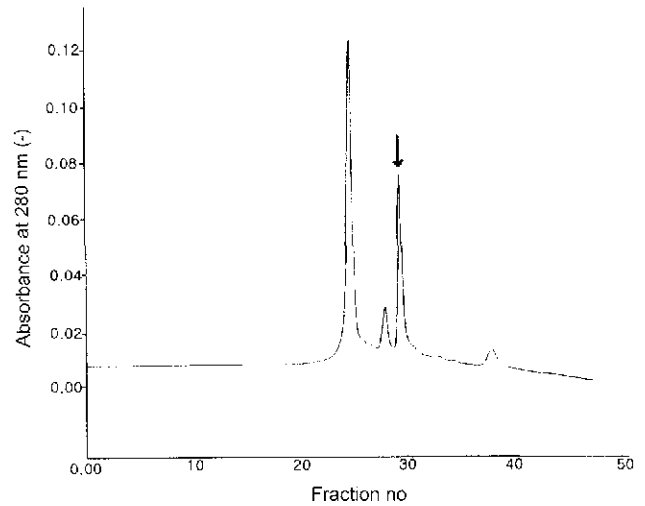


Fig. 3. FPLC profile of the fractions obtained from Sephacryl S-200 column chromatography. Mono Q ion exchange column was used and the indicated peak by an arrow showed a CMCase activity.

50°C 이상에서는 불안정한 것으로 나타나 이효소는 중온성 효소인 것으로 판단된다.

pH에 대한 안정성: *R. subflexibilis*가 생산하는 CMCase의 pH에 대한 안정성을 알아보기 위하여 pH 3.0에서 11.0까지 각각의 pH를 조정하여 40°C에서 30분간 처리한 후 최적 pH 4.0으로 조정하여 CMCase의 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 6에서의 같이 pH 4.0에서 최적 효소활성을 나타냈으며, pH 3, 4, 5에서 60% 이상의 안정성을 나타냈다.

금속염, EDTA 농도, 저해제에 의한 영향

분리 정제한 CMCase의 활성에 미치는 금속염의 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같이 $Al_2(SO_4)_3$ 에서 가장 활성이 높았으며, $FeSO_4$ 첨가시에도 비교적 활성이 좋았으나, $CaCl_2$ 와 Na_2MoO_4 첨가시에 활성이 가장 낮았다.

효소반응액에 EDTA 용액의 최종농도가 10^{-1} M에서 10^{-6} M이 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 효소를 작용시킨 결과는 Fig. 7과 같았다. CMCase는 EDTA 농도가 증가함에 따라 활성은 상대적으로 감소하였으며, 10^{-3} M을 첨가 하였을 때부터 활성이 급격히 감소하였다.

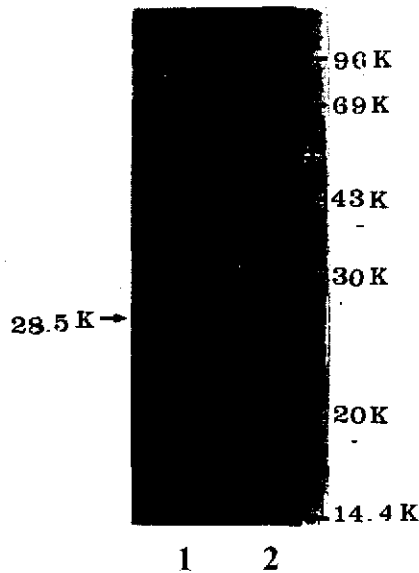


Fig. 4. SDS-PAGE of the purified CMCase. Lane 1. protein marker; lane 2. CMCase indicated by an arrow.

효소활성에 미치는 6종의 저해제에 대한 영향을 측정된 결과는 Table 3과 같이 PMSF와 EDTA 및 1, 10-phenanthroline 첨가시 효소 활성이 크게 감소하는 것으로 나타났다.

고찰

Cellulose는 포도당이 β -1,4 결합으로 중합되어 있는 고분자물질로 이 물질을 이용하기 위해서는 cellulose 분해력이 좋은 cellulase가 필요하다. 일반적으로 cellulase는 endo- β -1,4-glucanase(CMCase), exo- β -1,4-glucanase, β -glucosidase 등, 3가지 component로 구성된 복합효소 체계(multi-enzyme complex)를 갖고 있는 효소로, CMCase가 무작위로 작용하여 비환원 말단을 가진 저분자의 cellulose chain을 생성하면, exo- β -1,4-glucanase가 작용하여 cellobiose와 glucose 단위로 분해하고, 최종적으로 β -1,4-glucosidase가 glucose 단위로 전환시킨다(Bisaria

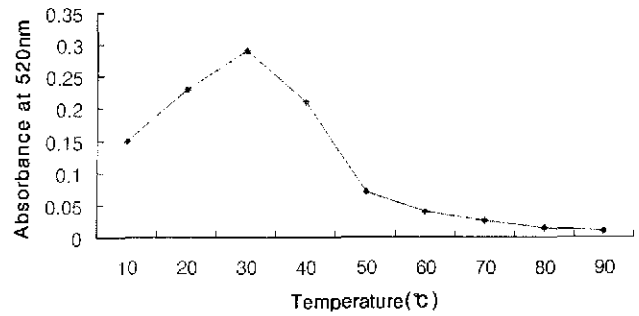


Fig. 5. Thermal stability of the purified *L. roseoalbus* carboxymethyl cellulase activity.

and Ghose, 1981).

Cellulose의 분해산물인 glucose와 xylose, oligosaccharide는 산업적인 중요성과 그 작용 형식의 특이성 때문에 학문적으로 매우 중요한 의미를 갖고 있으며, cellulase 중에서는 CMCase가 효소제제로서의 효용가치가 매우 높은 효소로 밝혀지고 있다(Kawai *et al.*, 1988).

본 논문에서는 *L. roseoalbus* 균주가 생산하는 CMCase를 분리 정제 하였으며, 이 효소의 특성을 조사하였다. *L. roseoalbus*가 생산하는 CMCase는 CMC에 대하여 9,307.8 u/mg의 높은 비활성을 나타냈으며(Table 1), 이러한 활성은 주요한 섬유소분해효소 생산균들인 독청버섯아재비(유 등, 2002)와 화경버섯(유 등, 2004) 등이 생산하는 CMCase의 활성보다 훨씬 강한 활성을 나타냈고, *Penicillium funiculosum*(Mishra *et al.*, 1988)과 *Trichoderma* sp. C-4에서 분리한 CMCase(설 등, 2005)의 비활성 보다 훨씬 높았다. 한편 본 균주에서 생산된 CMCase를 FPLC로 정제한 후 12% SDS-PAGE로 전기영동한 결과 단일밴드를 나타냈으며(Fig. 4), 본 효소의 분자량을 측정된 결과 28.5 kDa 이었다.

독청버섯아재비(유 등, 2002)와 화경버섯(유 등, 2004)이 생산하는 52 kDa, 54 kDa, 체균에서 생산되는 92 kDa와 80 kDa(Kim *et al.*, 1997, 1982) 및 진균에서 생산되는 52 kDa와 54 kDa(Kim *et al.*, 1993; 설 등, 2005) 보다

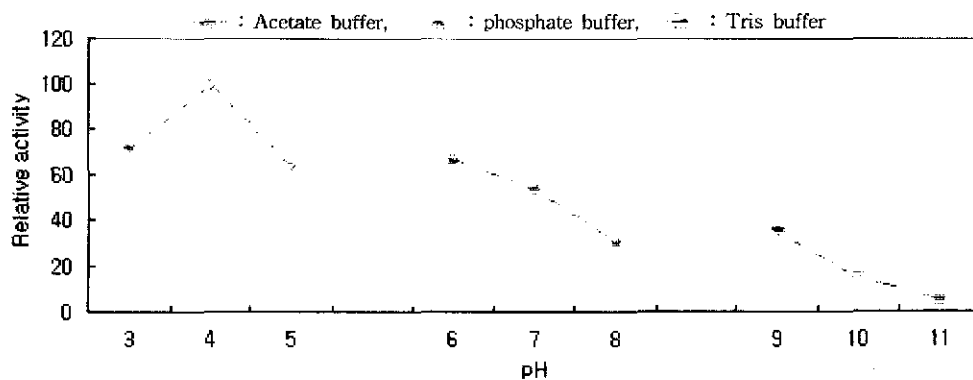
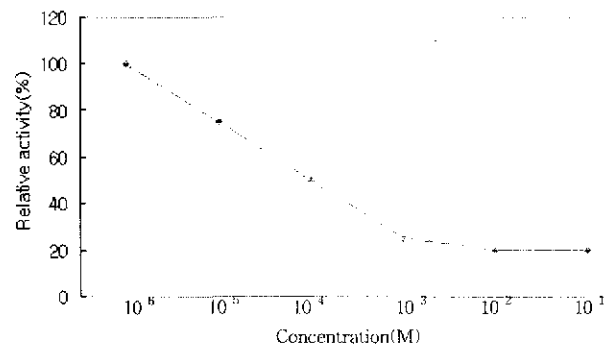


Fig. 6. pH stability of the purified *L. roseoalbus* carboxymethyl cellulase activity. Enzyme reaction was carried out at 40°C for 30 min.

Table 2. Effect of inorganic salts on carboxymethyl cellulase activity

Inorganic salts (1 mM)	Relative activity	Final pH
None	100	4.28
KCl	104	4.40
BaCl ₂	112	4.27
CaCl ₂	2	4.27
CoCl ₂	101	4.40
CuSO ₄	46	4.17
Li ₂ SO ₄	103	4.17
MnSO ₄	77	4.05
ZnSO ₄	63	4.08
FeSO ₄	134	3.10
MgSO ₄	23	3.93
AgNO ₃	31	4.15
Al ₂ (SO ₄) ₃	183	3.01
Na ₂ MoO ₄	5	4.42

The enzyme was preincubated with various metal ions in 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4.0) for 30 min at 40°C. After incubation, the mixture was subjected to the CMCase assay. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.

**Fig. 7.** Effect of ethylene diamine tetraacetic acid on carboxymethyl cellulase activity from *Loweporus roseoalbus*.

작은 것으로 나타났다.

이 실험 결과 버섯(담자균류)에서 생산되는 CMCCase는 세균과 진균에서 생산되는 CMCCase 보다는 분자량이 작은 것으로 나타났지만, CMC에 대한 활성은 훨씬 강한 것으로 나타났다(유 등, 2002, 2004; Kim *et al.*, 1997, 2004).

또한 13 종류의 금속염에 대한 영향을 조사한 결과 Al₂(SO₄)₃에서 활성이 가장 높았으며, FeSO₄ 첨가시에도 비교적 활성이 좋았으나 CaCl₂와 Na₂MoO₄ 첨가시에는 활성이 가장 낮게 나타났다(Table 2). 이 결과는 유 등 (2004)이 독청버섯아재비에서 CoCl₂ 첨가시 효소활성이 좋았다는 보고와 Kim *et al.*(2004)이 *Bacillus* sp. HSH 810 균주가 CaCl₂와 CoCl₂ 첨가시 활성이 좋았다는 보고와는 상이하게 나타났으나, 화경버섯(유 등, 2004)에서 Al₂(SO₄)₃ 첨가시 효소활성이 좋았다는 결과와는 동일한 결과를 나타냈다.

아울러 본 균주가 생산하는 CMCCase의 EDTA 농도에 따른 영향을 조사한 결과 EDTA 농도가 증가함에 따라

Table 3. Effect of various enzyme inhibitors on carboxymethyl cellulase activity

Inhibitors	Relative activity (%)
	1 mM
None	100
PMSF	20
SDS	140
EDTA	20
1,10-Phenanthroline	20
Cysteine	80
KCN	60

The enzyme was preincubated with various inhibitors in sodium acetate buffer (pH 4.0) 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, PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride, SDS; sodium dodecyl sulfate.

CMCCase의 활성은 상대적으로 감소하였으며, 10⁻³ M을 첨가하였을 때부터 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 7). 이 결과로 *L. roseoalbus*가 생산하는 CMCCase는 효소 구성성분에 금속이온을 갖고 있는 metalloenzyme으로 추정되며, apoenzyme과는 약하게 결합되어 있는 효소로 추정된다. 그리고 6종의 저해제에 대한 영향을 조사한 결과 PMSF, EDTA 및 1,10-phenanthroline 첨가시 효소활성이 크게 감소하는 것으로 나타났다(Table 3). 이 실험결과에서 EDTA와 1,10-phenanthroline 첨가시 CMCCase 효소활성이 크게 감소하는 것으로 보아 효소 구성성분에 cofactor로 금속이온이 존재할 것으로 추정되며, apoenzyme과는 약하게 결합되어 있을 것으로 판단된다. 또한 PMSF에 저해받는 것으로 보아, 이 효소에는 serine 잔기가 존재할 것으로 추정된다. 화경버섯(유 등, 2004)은 SDS 첨가시에, 독청버섯아재비(유 등, 2002)는 KCN과 cystein 첨가시 효소활성이 저해된다는 보고와는 상이하게 나타났다.

*L. roseoalbus*가 생산하는 CMCCase의 최적온도와 열에 대한 안정성을 조사한 결과 30°C에서 최적활성을 나타냈으며, 50°C 이상에서는 불안정한 것으로 나타났다(Fig. 5). 본 균주가 생산하는 CMCCase가 20°C부터 40°C 사이에서 효소활성이 안정한 것으로 나타난 것으로 보아 이 효소는 중온성 효소인 것으로 판단되며, 최적 pH와 pH에 대한 안정성을 조사한 결과 pH 4.0에서 최적 효소활성을 나타냈으며, pH 3, 4, 5에서 50% 이상의 효소안정성을 나타낸 것으로 보아(Fig. 6) 이 효소는 산성 섬유소분해효소로 판단된다.

본 논문에서는 섬유산업, 제지산업, 세제산업, 식품산업, 사료산업 등에 널리 이용되는 섬유소분해효소 중 가장 중요한 효소의 하나인 CMCCase를 생산하는 *L. roseoalbus* 균주로부터 CMCCase를 순수 분리·정제 하였으며, 이 효소의 특성을 조사하였다.

따라서 오늘날 산업적으로 많이 이용되고 있는 섬유소

분해효소 생산 균주의 개발, 효소의 생산성 향상 및 효율적인 이용을 위한 연구가 앞으로 지속적으로 연구되어야 할 과제라고 생각되며, 본 연구는 상기 목적에 기초적인 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

섬유소분해능이 우수한 *L. roseoalbus*로부터 분리·정제한 CMCase의 활용에 대한 기초적인 자료를 제공하고자 실험하여 *L. roseoalbus*의 배양액으로부터 4단계를 거쳐 분자량이 28.5 kDa인 CMCase를 분리 정제하였다. 이효소는 pH 4.0에서 최적의 활성을 보여주는 acidic CMCase로 30°C에서 최대 활성을 나타냈다. EDTA에 의해 활성이 저해되는 것으로 보아 metalloenzyme으로 추정되며, PMSF에 의해 저해되는 것으로 보아 serine 잔기를 갖고 있는 효소로 판단된다. $Al_2(SO_4)_3$ 와 $FeSO_4$ 에서는 효소 활성이 높았으나 $CaCl_2$ 와 Na_2MoO_4 에서는 효소 활성이 낮았다.

감사의 글

본 연구를 수행하는 데 균주를 제공하는 등 많은 도움을 주신 농촌진흥청의 김양섭 박사과 석순자 연구원님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 본 연구는 2003년도 상지대학교내 연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

설옥주, 정대균, 한인섭, 정춘수. 2005. 새로운 섬유소분해 균주 *Trichoderma* sp. C-4에서 분리한 Endoglucanase(F-I-III)에 대한 연구. 한국미생물학회지 **41**(1): 81-86.

유관희. 2003. 회경버섯의 배양조건에 따른 균사생장 및 섬유질 분해효소 활성에 관한 연구. 한국균학회지 **31**(1): 12-21.

_____, 장형수. 2002. 독청버섯이재비가 생산하는 Carboxymethyl cellulase의 정제 및 효소학적 특성. 한국균학회지 **30**(2): 113-118.

_____, _____, 김준호. 2004. *Lampteromyces japonicus*가 생산하는 Carboxy methyl cellulase의 정제 및 특성. 한국균학회지 **32**(2): 125-129.

장형수. 2003. *Loweporus roseoalbus*로부터 cellulase 생산을 위한 배양학적 성질. 한국균학회지 **31**(2): 77-83.

정원형, 양시용, 송민동, 하종규, 김창원. 2003. Xylanase, cellulase의 생산성이 높은 *Bacillus* sp.의 분리 및 효소생산을 위한 배양조건 최적화. 한국미생물·생명공학학회지 **31**(4): 383-388.

Bisaria, V. S. and T. K. Ghose. 1981. Biodegradation of cellulosic material : substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 90-104.

Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulase and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.

Kanda, T., Wakabayashi, K. and Nishizawa, K. 1976. Purifica-

tion and properties of an endocellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tuliferge*). *J. Biochem.* **79**: 977-988.

Kawai, S., Okoshi, H., Ozaki, K., Shikata, S., Ara, K. and Ito, S. 1988. Neutrophilic *Bacillus* strain, KSM-522, that produces an alkaline carboxymethyl cellulase. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1425-1431.

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*. *Kor. J. Mycology* **21**: 28-37.

Kim, J. Y., Hur, S. H. and Hong, J. H. 2004. Isolation and characterization of an alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Kor. J. Microbiol.* **40**(2): 139-146.

Kim, S. J. and Kim, W. W. 1982. Studies on the isolation, purification and characterization of Cx enzyme produced by *Pyricularia oryzae* C-7. *Kor. J. Mycology*. **10**(2): 67-73.

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.

Ko, J. Y., Shin, K. S., Yoon, B. D. and Choi, W. Y. 2000. Isolation and identification of *Acetobacter xylium* GS 11 producing cellulose. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 139-146.

Lee, J. S., Kim, C. M., Park, J. Y., Ryoo, K. W., Kim, K. M., Yoon, Y. G. and Jung, H. S. 2004. Unrecorded higher fungi of the Songinisan National Park. *Mycobiology* **32**(2): 68-73.

Lee, J. Y., Kim, J. H. and Ryu, D. Y. 1983. Cellulase production by immobilized mycelia of *Trichoderma reesei* : QM 9414. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 105-110.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein measurement with the floin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.

Mishra, C. and Rao, M. 1988. Mode of action and synergism of cellulase from *Penicillium funiculosum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **19**: 139-150.

Montenecourt, B. S. and Eveleigh, D. E. 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 777-782.

Somogyi, M. 1962. Note on sugar determination. *J. Biochem.* **195**: 19-23.

Stembromg, D. and Mandels, G. R. 1979. Induction of cellulolytic enzyme in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* **139** : 761-769.

Tagagi, M. 1987. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogen peroxide in the presence of manganese compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 165-170.

Tecri, T., Salivuori, I. and Knowles, J. 1983. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/technology*. **1**: 696-699.

Yoo, S. S., Kim, K. C. and Kim, S. J. 2003. Production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma hazianum* FJI in solid state fermentation. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**(3): 257-263.

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.