

# 묁은黃酸 및 Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究\*1

鄭寅杓\*2 · 金洪殷\*2 · 閔斗植\*2

## Studies on the Hydrolysis of Wood with Dilute Sulphuric Acid Solution and *Trichoderma viride* Cellulase\*1

In-Pyo Chung\*2 · Hong-Eun Kim\*2 · Du-Sik Min\*2

1. The study was conducted on the optimum condition of the treated substrate with dilute sulphuric acid solution and cellulase for saccharification.

The wood (saw dust) of *Alnus hirsuta* Rupr. (10~15 years) was treated with 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%, 1.5%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution at 1.5kg/cm<sup>2</sup> for 15min., 30min., 45min., and 60min., followed by thermal treatment at 190°C for 30min., and screening with 60 mesh sieve, after which to 0.5 grams of each sample was added 0.5ml cellulase solution, and 50ml 0.1M acetic acid buffer solution (pH 5.0), after incubating at 40°C for 96hr.

2. The crude cellulase of *Trichoderma viride* Perx. ex. Fr. SANK 16374 was produced by the submerged culture process and produced in the culture fluid was salted out quantitatively by the use of ammonium sulfate.

3. Reducing sugar was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method.

4. The reducing sugar was increased with increase of the sulphuric acid concentration and saw dust was treated with 1.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution at 1.5kg/cm<sup>2</sup> for 45min. showed the best saccharification (16.0%). The reducing sugar formation did not show statistically significant in 5% levels by thermal treatment time 45min. and 60min.

5. The substrate for cellulase which was treated with 0.9% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution at 1.5kg/cm<sup>2</sup> for 60min. showed the best reducing sugar formation (23.6%). And did not show significant difference in 5% levels at 0.9%, 1.2%, and 1.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.

1. 本試驗은 糖化基質로 산오리나무材를 묁은黃酸으로 前處理한 後 *Trichoderma viride* 16374號菌에서 얻은 cellulase를 作用시켜 還元糖을 生成할 수 있는 最適條件을 調査한 것이다. 即 산오리나무(10~15年生)의 톱밥을 前處理할 때 黃酸濃度 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%, 1.5%로 區分하고 熱壓時間은 1.5kg/cm<sup>2</sup>에서 15分, 30分, 45分, 60分으로 各各 區分 處理하여 乾燥시킨것을 다시 190°C에서 30分間 熱處理後 60mesh로 粉碎한 것을 糖化基質로 使用하였다. 그리고 cellulase 反應 條件은 0.1M醋酸緩衝液(pH 5.0) 50ml, 基質量 0.5g, 鹽析酵素液 0.5ml를 100ml用 三角 flask에 넣고 잘 混合한 後 40°C에서 96時間 反應시켜 이때 生成된 還元糖量을 調査하였다.

2. 鹽析酵素液의 調製는 氣孔液體振盪培養法에 依하여 生成된 粗酵素液을 硫酸飽和度에 依한 鹽析 酵素液을 만들었다.

3. 還元糖定量은 DNS法에 依하였다.

4. 묁은黃酸으로 處理한 톱밥의 還元糖 生成量은 黃酸濃度 1.5%, 1.5kg/cm<sup>2</sup>에서 熱壓時間 45分으로 處理한것이 16.0%로 最大量을 나타냈으나 cellulase를 作用함으로써 生成된 還元糖量은 黃酸濃度 0.9%, 熱壓時間 60分 處理한것이 23.6%로(本試驗 範圍에서는 47.5% 增加) 나타났다.

\*1 Received for publication on February 5, 1979.

\*2 忠北大學校 農科大學 College of Agr. Chung-Buk University, Cheong ju, Korea

## 緒 論

光合成에 의하여 資源이 無盡藏으로 生産될 수 있는 植物에서 人類의 人口增加에서 오는 食糧難을 解決하고자 하는 꿈은 오래전부터 試圖되었다. 그중에서도 木材를 原料로한 糖化는 우리가 期待하는 가장 큰 食糧解決策의 하나인 것이다.

1819年 Bracconnat에 의하여 木材의 酸加水分解에 依한 glucose 生成이 밝혀졌으며 그後 木材化學의 發達에 따라 木材糖化의 研究도 進展되어 最初의 工業化가 1923年 Scholler에 의하여 稀黃酸에 依한 木材 加水分解法이 出現되었고 다시 1933年 Bergius에 의하여 濃鹽酸에 依한 木材糖化法이 發見되어 經濟적으로도 重要視되었다. 이러한 木材糖化에 依한 glucose製造는 木材 cellulose가 酸에 依하여 切斷되어져서 glucose가 되는 것이다. 이때 分解는 한번에 glucose가 되는 것이 아니고 木材中の cellulose가  $\gamma$ -cellulose로 分解된後 다시 寡糖類(重合度 3~10)로 되고 이 寡糖類가 2糖類인 cellobiose로 되어 이것이 單糖類인 glucose로 變하는 것인데 最後에는 glucose가 大部分이나 一部가 未反應의 糖이나 分解糖等이 混在된 狀態로 있게 된다. 이와 같이 酸糖化法은 cellulose의 강한 結合力과 堅固한 結晶構造를 破壞하는데 効果의 이지만 高溫과 強酸을 使用하는 過激한 條件으로 말미암아 糖分의 分解와 새로운 不純物이 生成되기 때문에 經濟적으로 不利하다. 그러기 때문에 酸糖化法은 食糧事情이 極히 나쁜 戰時에 찾아볼 수 있다. 한편 이와같은 酸糖化法의 缺點을 解決한 方法으로 酵素糖化法이 擡頭되었는데 이 方法은 Karrer(1925~1929)<sup>(9,10,11,12,13)</sup>가 달팽이의 cellulase를 纖維素에 作用시켜 glucose를 生成하는 것을 發見함으로써 始作 되었다. 그後 1950年代에 이르러 이들 酵素의 利用이 擡頭됨으로서 cellulose 分解酵素에 關한 研究가 活潑하게 되었다.

Cellulose는 澱粉과 같이 glucose로 되어 있지만 構造의 差異 때문에 amylase의 作用은 不可能하고 다만 cellulase( $\beta$ -D-1,4 glucan 4 glucanahydrolase)에 依하여 糖化될 수 있다는 事實들이 報告되어 있어서 cellulose의 醱酵 基質化는 크게 期待되는 바이다. Cellulase가 cellulose에 作用하는 경우에 처음은 非結晶性 領域이 分解되어 長鎖가 군데군데 切斷되어 重合度가 낮게 된다. 그리고 結晶性 領域은 非結晶性 領域보다 cellulase의 接近이 어렵고 그의 殘存率도 높기 때문에 吸濕性도 작다. 이것은 NaOH 溶液에 溶解하기 어려운 部分即 結晶性 領域이 많은 것과 關聯된다. 다음에 結晶性

領域의 周圍에 느슨한 構造를 形成하고 계속해서 殘存 基質의 重合度는 低下해서 溶解가 일어 난다.

많은 微生物이 cellulose를 部分的으로 溶解하거나 또는 變形纖維素(regenerated cellulose)를 分解하여 glucose를 生成하는 微生物이 發見되었는데 cellulose 溶解 酵素는 native cellulose를 分解하는데 必要한 swelling factor ( $C_1$ )를 갖고 있으나 變形된 cellulose만을 分解하는 酵素는 swelling factor( $C_1$ )가 缺如된 cellulase이다.

微生物中 곰팡이의 어떤것은 Media周圍에 extra cellular enzyme을 放出하는데 다른 微生物 특히 bacteria는 cellulose에 bacteria 細胞가 接近된때만 cellulose를 分解하는 것으로 알려져 있다.

現在 多量の 酵素源을 얻지 못하고 있으나 cellulase 生産菌과 그들의 作用條件을 改善하여 좁으므로서 括目 할만한 結果들이 紹介되고 있다. 특히 美國의 Natick 研究所에서는 酵素源으로서 *Trichoderma viride*에서 生成되는 cellulase를 利用하여 cellulose에서 glucose 生産에 經濟的 可能性을 크게 示唆하고 있다.<sup>(20,25)</sup> 그리고 Padilla and Haskins (1968)는 톱밥을 黃酸으로 處理한 後 cellulase製劑를 併用한 木材糖化의 經濟的 效果를 報告하였다.

本試驗은 우리나라의 瘠薄한 林地나 砂防地에 肥料木으로 植栽되는 潤葉樹中 經濟的 利用價値가 낮은 산오리나무의 合理的인 利用開發을 目的으로 cellulase에 依한 糖化基質로 使用할때 산오리나무材를 脫 lignin하는 代身 棼은黃酸으로 前處理한後 *Trichoderma viride*에서 얻은 cellulase를 作用시켜 還元糖을 生成할 수 있는 最適條件을 究明한 것이다.

## 材料 및 方法

### 1. 菌 株

*Trichoderma viride*가 cellulose에 活性이 強力한 cellulase(分解酵素)를 生産하는 것으로 研究 報告<sup>(3,4,5,6,7,8,20,22,23,25,28,29)</sup>되어 있어 *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. SANK 16274號, 16374號, 16474號를 入手하여 試驗用 菌株로 使用하였다.

### 2. 培養法 및 粗酵素液의 生産<sup>(1,15,20,25)</sup>

培養法은 밀기울 液體振盪培養法으로 培養液은 pulp 粉末(Toyo filter paper, 60mesh) 10g,  $KH_2PO_4$  10g,  $(NH_4)_2SO_4$  3g,  $NaNO_3$  3g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g/l에 밀기울 抽出液 1l를 加하여 混合 하였다. 그리고 500ml/用

振盪 flask에 50ml의 培養液을 넣고 autoclave (1.5kg/cm<sup>2</sup>)로 30分間 滅菌 시킨後 上記 菌株을 移植하여 30°C에서 5日間 振盪培養後 10分間 遠心分離(6,000 rpm)하여 上澄液을 試驗用 酵素液으로 使用하였다.

### 3. 糖化力이 강한 菌株의 選拔

上記 各菌株에서 얻은 cellulase를 산오리나무材 cellulose에 作用시켜 生成된 還元糖量을 一元配置法에 依하여 有意差檢定을 하니 *T.v.* 16274號에서 얻은 cellulase에 依한 還元糖量은 18.2%, 16474號의 것은 19.3%이었으며 16374號의 것은 22.1%로서 이들중 糖生成量이 가장 높았다. 그리고 *T.v.* 16274號와 16474號間에는 有意差가 認定되지 않았으나 16374號와의 사이에는 有意差가 認定되었다. 그러므로 本試驗에서는 *T.v.* 16374號의 菌株에서 얻은 cellulase가 糖化力이 가장 強力한 것으로보고 이 菌株을 供試用 菌株로 選拔 하였다.

### 4. 還元糖 定量法<sup>(26,27)</sup>

25ml의 標識이 있는 試驗管에 3.5 dinitrosalicylic acid(DNS)를 3.0ml넣고 이곳에 糖化 反應液인 各 sample 1ml를 加하여 잘 混合한 後 正確히 100°C에서 5分間 加熱하여 發色시킨 다음 冷却 하였다. 여기에 蒸溜水를 加하여 正確히 25ml로 稀釋 하였다. Blank test는 DNS試藥 3.0ml에 蒸溜水 1ml를 加하여 上法과 같이 處理 하였다. 糖標準液의 調製는 D-(+)-glucose를 使用하여 蒸溜水로 250 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml, 1,000 $\mu$ g/ml의 3種으로 調製하여 使用하였다. 以上の 測定試料와 標準糖液을 波長500m $\mu$ 에서 (ATAGO 36形) 測定하여 試料 1g에서 生成된 還元糖量을 計算 하였다.

### 5. 鹽析 酵素液의 調製<sup>(1,15,17,18,19)</sup>

選拔된 菌株 *Trichoderma viride* SANK 16374號를 2와 같은 培養液에 接種하여 振盪培養後 上澄液을 取하였다. 이 上澄液에 硫安飽和度 0.2(20%)로 處理하여 이때생긴 沈澱物을 10分間 遠心分離하여 除去하고 上澄液을 取하였다. 다시 이 上澄液에 硫安飽和度 0.8(80%)로 處理하여 10分間 遠心分離한後 沈澱物을 取하여 半透性膜에 넣고 0.1M 醋酸緩衝液(pH 5.0)內에서 30時間(0~4°C) 硫安을 析出し킨것을 試驗用 鹽析 酵素液으로 使用하였다.

### 6. 供試樹種

忠北大學校 構內에서 生育한 樹齡 10~15年인 산오

리나무(*Alnus hirsuta* (Spach) Rupr.)를 20株를 擇하여 0.4~0.5cm 간격으로 環鋸로 切斷하여 톱밥을 만들어 이것을 試料로 하였다.

오리나무類의 全國 造林地 및 蓄積을 調査한 結果 1945年(解放後) 以來 砂防地 總面積은 670,619ha에 達하며 이중 오리나무類 植栽面積은 100,593ha로 全砂防地 面積의 約 15%에 該當되며 그 材積은 約 1,971,622 m<sup>3</sup>에 達하는 것으로 推定된다.

### 7. 基質用 試料의 붉은황산 處理

黃酸의 濃度와 熱處理時間이 木材糖化에 미치는 最適條件을 調査하기 위하여 黃酸濃度를 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%, 1.5%의 5水準으로 區分하고 이들을 各 濃度別로 1.5kg/cm<sup>2</sup>에서 熱壓時間을 15分, 30分, 45分, 60分의 4水準으로 區別한後 3反覆하여 處理 하였다. 이와같이 하여 生成된 還元糖量은 DNS法에 依하여 定量하고 그 結果를 二元配置法에 依하여 分散分析 하였다.

### 8. Cellulase에 依한 糖化反應條件

7과 같은 方法으로 處理한 試料를 190°C에서 30分間 加熱한後 60mesh로 粉碎한것을 基質로하고 이것을 100ml用 三角 flask에 0.5g씩넣고 0.1M 醋酸緩衝液(pH 5.0)을 50ml 加한 後, 鹽析酵素液 0.5ml를 加하여 잘 混合 하였다. 다음에 40°C에서 96時間 反應시킨後에 5分間 끓여서 酵素反應을 中止시킨 다음 遠心分離하여 上澄液을 取하여 DNS法에 依한 還元糖定量用 試料로 使用 하였다. 그 結果를 二元配置法에 依하여 分散分析 하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 黃酸濃度와 熱壓時間이 木材糖化에 미치는 效果

Simonsen<sup>(20,25)</sup>은 15氣壓에서 1時間동안 處理한 黃酸의 濃度別 還元糖 生成量은 酸濃度 0.3%가 18.4%이었으며 1.0%에서는 糖收量이 19.6%에 이르렀으나 1.5%의 黃酸濃度에서는 5.0%로 14.6%나 減少 되었다. 그리고 0.5% 黃酸에서 熱壓時間 15分에서는 糖收量이 22.5%이었으며, 30分에서는 20.8%, 60分에서는 19.6%, 120分에서는 16.1%로 熱壓時間이 길수록 糖收量은 漸減 하었다고 報告 하였다.

表 1과 表 2에서 보는바와 같이 熱壓時間과 還元糖 生成量에는 15分과 30分, 45分, 60分, 그리고 30分과

**Table 1.** The hydrolysis (rate of reducing sugar) of the wood of *Alnus hirsute* Rupr. was treated with dilute sulphuric acid solution.

(Average of sample I, II and III)

Treated time at 1.5kg/cm <sup>2</sup>	Sulphuric acid concentration					Total
	0.3%	0.6%	0.9%	1.2%	1.5%	
15 min	3.7	4.6	6.1	8.0	9.5	95.4
30 min	6.0	7.9	10.9	12.7	14.5	155.8
45 min	7.3	9.8	12.2	14.8	16.0	180.0
60 min	7.7	9.4	11.9	14.0	14.9	173.5
Total	74.0	95.1	122.9	148.1	164.6	

**Table 2.** Analysis variance for the Table 1.

Factor	SS	df.	MS.	F	P
Treated time (B)	297.43	3	99.14	38.88**	P>0.01
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concent. ( $\bar{V}$ )	359.90	4	89.98	35.29**	P>0.01
B× $\bar{V}$	13.64	12	1.14	.045	P<0.05
Error	102.01	40	2.55		

45分 間에 高度의 有意差가 認定되고, 15분이 가장 낮은 糖化量을 나타내며 45분이 最高의 糖收量을 나타내고 있다. 그러나 45분과 60分 間에는 有意差가 認定되지 않았다.

黃酸濃도와 還元糖 生成量에는 酸濃度 0.3%와 0.9%, 1.2%, 1.5% 그리고 0.6%와 0.9%, 1.2%, 1.5% 間에, 0.9%와 1.2%, 1.5% 間에 高度의 有意差가 認定되었으나 0.3%와 0.6%, 그리고 1.2%와 1.5% 間에는 有意差가 認定되지 않았다. 또한 酸濃度 0.3%가 가장 낮은 糖化量을 보여주고 濃도가 높을수록 糖收量도 많았다. 그러므로 本試驗의 範圍에서는 酸濃度 1.5%로 熱壓時間(1.5kg/cm<sup>2</sup>)이 45分인 것이 最大의 還元糖 生成量을 나타내고 있다. 그리고 熱壓時間이 길어질수록 糖化量도 增加하여 45分에서 最大量을 나타내다가 60分에가서 減小되는 現象을 나타내는데 이것은 1.5kg/cm<sup>2</sup>에서 熱壓時間이 60分 以上 되던 糖의 分解와 새로운 不純物의 生成량이 糖生成量보다 많아지는 現象을 意味하는 것으로 본다.

## 2. 基質 前處理條件이 木材糖化에 미치는 效果

Padilla and Hoskins<sup>(20,25,30,31)</sup>는 黃酸과 cellulase製劑를 併用하는 木材톱밥의 糖化에 關하여 發表하였다. 即 最適條件은 25% 黃酸으로 50°C에서 3時間 處理한 後, 1.25%酵素 溶液으로 3時間 反應시키는 것으로 톱

밥 100g에서 糖分 10.8g (glucose 4.1g/100g, Xylose 6.7g/100g)을 얻었다고 하였다. 이것은 cellulase 만으로 木材自體는 加水分解되지 않으므로 酸으로 木材를 前處理하여 어느程度의 加水分解를 助長시키며 한편 이 때 生成된 分解糖과 새로 생긴 不純物 및 逆合成 寡糖類(重合度 3~10)와 未反應의 部分이 cellulase에 의하여 가일층 加水分解되어 還元糖 生成量을 增加시키는 것으로 본다.

〈Fig. 1〉에서 보는바와 같이 基質의 前處理條件은 熱壓時間이 15分과 30分, 45分, 60分 그리고 30分과 45分, 60分 間에 高度의 有意差가 認定되었으며 15분이 가장 낮은 糖生成量을 나타내고 60분이 最高의 糖生成量을 나타내고 있다. 그러나 45분과 60分 間에는 有意差가 認定되지 않았다.

黃酸濃도가 基質前處理 條件에 미치는 效果는 〈Fig. 2〉에서 보는바와같이 酸濃度 0.3%와 0.6%, 0.9%, 1.2%, 1.5% 그리고 0.6%와 0.9%, 1.2%, 1.5% 間에 高度의 有意差가 認定되었으나 0.9%, 1.2%, 1.5% 間에는 有意差가 認定되지 않았다. 그리고 0.9% 黃酸으로 處理한 것이 糖生成量 23.6%로 最大值를 나타내고 있다. 또한 黃酸濃도가 1.2% 및 1.5%에서는 糖生成량이 漸減되고 있는데 이러한 現象은 酸을 中和할 때 생기는 鹽(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)이 cellulase活性에 沮害作用을 하는 結果에서 오는 것으로 思料된다.

本試驗의 範圍에서는 基質 前處理條件이 酸濃度 0.9

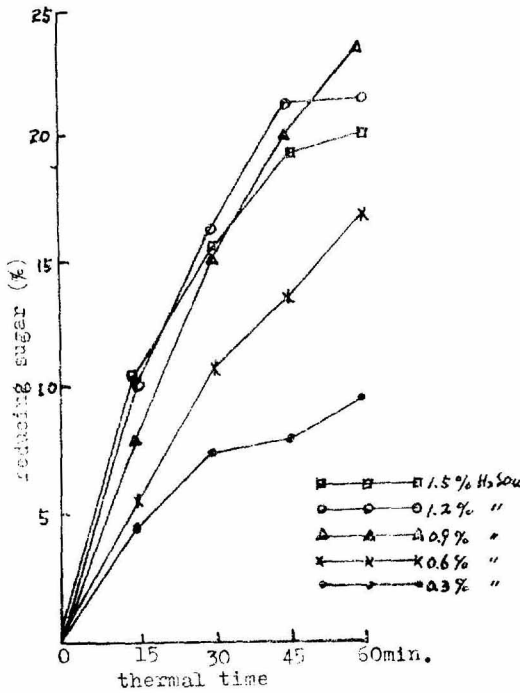


Fig. 1. Relationship between thermal time at 1.5kg/cm<sup>2</sup> and saccharifying activity with cellulase.

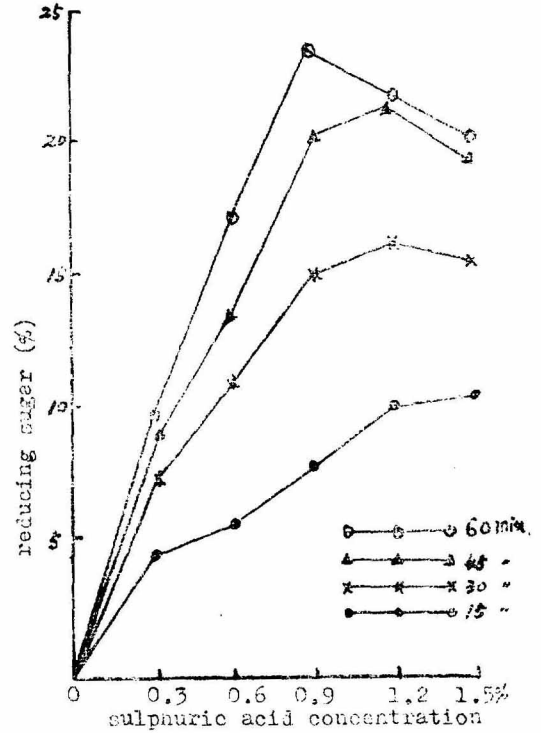


Fig. 2. Relationship between sulphuric acid concentration and saccharifying activity with cellulase.

으로 熱壓處理時間 60分으로 한것이 還元糖을 最大로 生成할 수 있는 基質 前處理條件으로 볼 수 있다. 그리고 이것은 묽은 황산으로만 木材를 加水分解 하는 것 보다 먼저 묽은 酸으로 熱壓處理한 後 中和하여 cellulase를 作用시켜 加水分解 시킴으로서 還元糖 生成량을 增收(本實驗의 範圍에서는 47.5%) 할 수 있다고 본다.

### 結 論

1. 本試驗은 산오리나무材를 묽은 황산으로 前處理한 것을 糖化基質로 使用하고 여기에 *Trichoderma viride* SANK 16374號에서 얻은 cellulase를 作用시켜 最大還元糖을 生成할 수 있는 最適條件을 究明한 것이다.
2. 酸을 作用하여 木材加水分解를 實施한것은 황산 濃度 1.5%로 熱壓時間 45分間 處理 한것이 最大還元糖量 (16.0%)을 나타내고 있다.
3. Cellulase를 作用시켜 最大還元糖을 生成할 수 있는 基質의 前處理 條件은 황산 濃度 0.9%로 熱壓時間 60分으로 하면 最適條件이 될 수 있으며 이때 糖生成량은 23.6%를 나타내고 있다.
4. 묽은 황산으로 木材를 加水分解시킨後 cellulase

를 作用함으로써 還元糖 生成에 顯著한 量을 增收(本實驗의 範圍에서는 47.5% 增加)할 수 있다.

### 引 用 文 獻

1. 赤堀 四郎, 1966. 酵素研究法 第1卷:131-136. 朝倉書店.
2. Coutts, A.D., R.E. Smith. 1976. Factors Influencing the Production of Cellulases by *Sporotrichum thermophile*, *Applied and Environmental Microbiology*. 31:819-825.
3. 張文雄, 宇佐美昭次, 武富昇, 1965. 셀룰라제에 關する 研究(第1報), 醱酵協會誌 23:375-377.
4. 張文雄, 1965. 셀룰라제에 關する 研究(第2報), 醱酵誌 23:378-380.
5. 張文雄, 1976. 셀룰라제에 關する 研究(第5報), 醱酵誌 25:349-352.
6. 張文雄, 1968. 셀룰라제에 關する 研究(第7報), 醱酵誌, 26:73-76.
7. 張文雄, 1968. 셀룰라제에 關する 研究(第8報), 醱酵誌, 26:155-159.
8. 張文雄, 1969. *Trichoderma Cellulase*의 液內培養

- による生産と利用. 醱酵工學 47:447-455.
9. Karrer, P., Schubert, P., Wehrli, W. 1925. Über Enzymatischen Abbau von Kunstseide und Nativer Cellulose, Helvetica Chim. Acta (Basel). 8:797-810.
  10. Karrer, P., Schubert, P., Wehrli, W. 1926. Weitere Beiträge zum Enzymatischen Abbau der Kunstseide und Nativer Cellulose, Helvetica Chim. Acta (Basel). 9:893-904.
  11. Karrer, P., Schubert, P., Wehrli, W. 1927. Über den Enzymatischen Abbau von Viscoseseiden, Helvetica Chim. Acta (Basel). 10:430-440.
  12. Karrer, P., Schubert, P., Wehrli, W. 1928. Über das Verhalten Verschiedener Cellulosen gegen Schnecken-Cellulase, Helvetica Chim. Acta (Basel). 11:229-230.
  13. Karrer, P., M.P. Orsi. 1929. Über das Verhalten der Sog. Lilienfeld-Seide gegen Cellulase, Helvetica Chim. Acta (Basel). 12:989-990.
  14. 小崎吉久, 山田雄次郎, 江澤和美, 五井仁. 1964. *Trichoderma*-Cellulase に関する研究(第1報). 醱酵工學, 42:115-123.
  15. 小巻利章. 1962. 酵素の工業的精製, 醱協誌, 20:325-330.
  16. Levinson, H.S., G.R. Mandels, E.T. Reese. 1951. Products of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Its Derivatives, Arch. Biochem. Biophys. 31:351-355.
  17. 閔斗植, 鄭大成. 1978. Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究. 1. 基質處理의 効果, 韓國林學會誌 38:13-18.
  18. 閔斗植. 1978. Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究 II. 反應條件의 効果. 韓國林學會誌 39:57-63.
  19. 閔斗植, 金法會, 李澤遠. 1978. 豆科栽培 廢材의 飼料化에 관한 研究. 韓國木材工業 8:8-14.
  20. 西澤一俊. 1974. セルラーゼ 277pp. 南江堂.
  21. 小川喜八郎, 外山信男. 1964. *Trichoderma viride* Cellulolytic Complex について(第1報) 醱酵工學. 42:199-206.
  22. 小川喜八郎, 外山信男. 1965. *Trichoderma viride* の Cellulolytic Complex について(第4報) 醱酵工學 43:661-668.
  23. 小川喜八郎, 外山信男. 1967. *Trichoderma viride* の Cellulolytic Complex について(第6報) 醱酵工學 45:671-680.
  24. 岡田巖太郎, 西澤一俊, 鈴木恕. 1968. Cellulose Components from *Trichoderma viride*, J. Biochem. (Tokyo), 63:591-607.
  25. Reese, E.T. 1968. Cellulases and Their Applications, 470pp. American Chem. Society Pub.
  26. Sumner, J.B. 1921. Dinitrosalicylic acid; a Reagent for the Estimation of Sugar in Normal and Diabetic Urine, J. Biol. Chem. 47:5-6.
  27. Sumner, J.B. 1925. A more Specific Reagent for the Determination of Sugar in Urine, J. Biol. Chem. 65:393-395.
  28. 戸田智子, 鈴木恕, 西澤一俊. 1968. The Mode of Action of *Trichoderma* Cellulases toward Normal and Reduces Cello-origo Saccharide. 醱酵工學 46:711-718.
  29. 戸田智子, 鈴木恕, 西澤一俊. 1971. Some Enzyme Properties and the Substrate Specificities of *Trichoderma* Cellulases with Special Reference to their Activity toward Xylan. 醱酵工學 49:499-521.
  30. 外山信男. 1969. 世界におけるセルラーゼ應用, 化學と生物, 7:630-635.
  31. 外山信男. 1977. ウッドケミカルの現状および將來石油に代わる資源としての期待一. 化學と生物 Vol. 15, No. 6:366-367.