

결정성이 다른 셀룰로오스에 대한 *Trichoderma viride*속 Cellulase로부터 분리한 Endo I 및 Exo II의 흡착특성

† 김 동 원 · 홍 영 관 · 장 영 훈 · 이 재 국
충북대학교 자연과학대학 화학과
(접수 : 1997. 10. 22., 게재승인 : 1998. 1. 21.)

Adsorption Characteristics of Endo I and Exo II Purified from Cellulase by *Trichoderma viride* on Celluloses with Different Crystallinity

Dong Won Kim, † Young Kwan Hong, Young Hun Jang, and Jae Kuk Lee

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

(Received : 1997. 10. 22., Accepted : 1998. 1. 21.)

The adsorption behaviors of two major cellulase components, endo I and exo II, from *Trichoderma viride* were investigated using α -celluloses with different correlation crystallinity index(C_c) as substrates. The adsorption of cellulase enzyme components was significantly affected by the reaction condition and the physicochemical properties of the cellulose. The α -cellulose was hydrolyzed in the presence of cellulase for various periods. The correlation crystallinity index of α -cellulose increased with increasing the hydrolysis time. The adsorption was apparently found to obey the first-order kinetics, and the adsorption activation energy(E_a) was calculated from the adsorption rate constant(k_a). The value of adsorption rate constant for endo I was larger than that of exo II. This means that endo I are adsorbed more rapidly than exo II. With the increase in correlation crystallinity index, the values of the adsorption rate constants for endo I and exo II decreased, respectively. The activation energy for the adsorption of exo II on the cellulose also was larger than that of endo I. Also the adsorption activation energy of endo I and exo II increased with an increase in the crystallinity of sample cellulose.

Key words : correlation crystallinity index, cellulose, cellulase, adsorption rate constant, adsorption activation energy

서 론

전세계적으로 널리 존재하는 섬유소는 미래 자원으로 크게 주목받고 있다. 섬유소는 포도당이 β -1, 4 결합으로 이루어진 중합체로써, 섬유소 사슬이 나란히 배열하여 결정상을 이루고 있다. 자연계에 존재하는 섬유소는 녹말, 펙틴, 목질류 등과 결합된 형태로 존재하므로 자연 상태에서의 분해속도는 대단히 느리다. 섬유소를 분해시켜 저분자 물질로 만드는 방법으로 효소나 산을 이용하거나 열 분해시키는 방법 등이 있다(1-2). 그 중에서도 효소반응을 이용한 섬유소의 가수분해 방법이 가장 활발하게 연구되고 있다. 셀룰로오스-cellulase 반응계는 불균일계로서 속도론적 해석을 위한 일반화된 속도식이 만들어져 있지 않은

실정이다. 특히 효소-기질 반응이 불균일계인 경우, 즉 불용성 고체인 셀룰로오스와 수용성인 cellulase의 반응에서의 흡착현상은 필수적인 과정으로, 보다 정확하게 연구되어야 할 부분이다. 섬유소의 효소적 가수분해에 대한 메커니즘을 밝히기 위하여 많은 연구가 진행되고 있음에도 불구하고, 아직 명확한 가수분해 메커니즘이 밝혀져 있지 못한 실정이다. 이와 같은 연구의 어려움은 주로 섬유소질의 복잡성과 복합효소체로서 cellulase의 다양성 때문인 것으로 알려져 있다(3-4). Cellulase는 복합효소로서 기질에 따른 가수분해 특성에 따라 3 종류의 성분으로 분류한다. 즉 carboxymethylcellulose(CM-cellulose)의 가수분해능이 우수한 endoglucanase(EG), Avicel의 분해능이 우수한 exoglucanase(CBH), 그리고 β -glucosidase로 구성되어 있다. 섬유소 분해에는 이들 3 종류의 효소가 관여한다고 믿어지고 있다. Endoglucanase는 셀룰로오스를 무작위(random)로 공격하여 비환원성 말단기(non reducing end)를 만들며, 저분자량의 수용성 섬유소, 인산 가수분해된 섬유소 등은 쉽게 분해하나, 결정성 섬유소를 단독으로 분해하지는 못한다. Exoglucanase는 섬유소 사슬의 비환원성 말단기를 공격하여 cellobiose를 생성시키며,

† Corresponding Author : Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
Tel : 0431-61-2281, Fax : 0431-67-4232
e-mail : chem131@trut.chungbuk.ac.kr

특히 기질이 결정상으로 존재할 때 이 효소의 존재는 커다란 의미를 갖는다. 최종적으로 β -glucosidase는 저분자량의 수용성 섬유소를 분해하여 glucose를 생성한다(5). 셀룰로오스의 구조는 크게 결정성 부분과 비결정성 부분으로 나누는 'two-phase concept'로 다루어지고 있으며, 불용성 물질로서 가수분해 반응에서 효소의 흡착과정이 선행되어야 하는데, 전체 가수분해 반응에 이러한 흡착특성이 어떤 영향을 주는가에 대한 연구는 아직 초보적인 단계에 머물러 있다. 이에 관한 연구로서 주로 순수한 셀룰로오스에 대한 cellulase의 흡착이 연구되고 있는데, 이러한 흡착은 셀룰로오스의 물리화학적 특성, 즉 결정도, 표면적, 중합도 등에 따라 차이가 있고, 성분효소에 따라 서로 다른 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다(6-8). 셀룰로오스는 처리방법 및 전처리 정도에 따라 화학적 성질이 달라지며, 특히 효소적 가수분해 반응에서 흡착에 큰 영향을 주게 될 것이다. 이상과 같은 결과로 볼 때, 성분효소들의 흡착은 셀룰로오스성 물질의 효소적 가수분해 반응에서 많은 정보를 얻을 것으로 기대되고 있다. 본 연구에서는 효소적 가수분해에 의해 전처리된 셀룰로오스의 결정성의 변화를 알아보고, 각 성분효소들의 전처리된 셀룰로오스에 대한 흡착 형태를 반응속도식에 적용하여, 흡착속도 상수(k_a)와 흡착 활성화에너지(E_a)를 통하여 비교하였다. 그리고 셀룰로오스의 결정성과 성분효소의 흡착특성의 관계를 알아보았다.

재료 및 방법

시 약

효소는 *Trichoderma viride*로부터 분리된 cellulase(Type V)로, Sigma Chemical사 제품이었다. 효소의 활성도는 4.4 units/mg solid였다. 기질로 사용한 셀룰로오스는 Avicel PH 101(FMC Co., USA), α -cellulose 및 Sigmacell 100(Sigma Chem. CO., USA)이었다.

효소 가수분해에 의한 셀룰로오스의 전처리

α -셀룰로오스 10 g을 150 mL의 0.1 M sodium acetate 완충용액(pH 4.8)에 섞은 다음, 70 mg의 cellulase를 첨가하여 50 °C에서 각각 6, 12, 24 및 48 시간씩 가수분해시킨 후, 남은 셀룰로오스를 원심분리하여 회수하였다. 그리고 셀룰로오스에 흡착되어 있는 cellulase를 제거하기 위하여 0.1 M의 NaCl로 여러 번 세척한 뒤 다시 증류수로 충분히 세척하여 동결건조하였다(6).

상관결정성 지수(C_c , correlation crystallinity index)

동결건조한 시료를 압착하여 시험편을 만든 후, X-Ray Diffraction Analyzer(Rikakikai Co., Japan)를 사용하여 35 kV, 20 mA에서 X-ray diffractogram을 얻었다. 이때 diffraction scan은 nickel filter의 Cu-K α radiation과 Geiger Counter를 사용하여 얻었다. 회절범위 2θ 가 10°에서 30°될 때까지 주사하여 X-ray diffractogram을 얻었으며, 상관결정성 지수는 다음 식으로 계산하였다(9).

$$C_c = [I_s(\theta) - I_d(\theta)] / [I_{cr}(\theta) - I_d(\theta)] \quad (1)$$

여기서 $I_s(\theta)$, $I_d(\theta)$ 및 $I_{cr}(\theta)$ 는 각각 시험편 셀룰로오스, 비

결정성 및 표준 결정성 셀룰로오스에 대한 각 θ 에서의 X-ray diffraction intensity이다. 이때 사용한 표준 결정성 셀룰로오스는 Avicel PH-101 이었고, 비결정성 셀룰로오스는, Sigmacell 100을 실온에서 진한 인산으로 용해한 후 증류수에서 침전시켜 회수하여 시료로 만든 것이다.

단백질의 정량

용액 속에 녹아 있는 효소의 양을 알기 위하여, Lowry 방법(10)으로 단백질을 정량하였고, 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

혼합효소의 분리 및 정제

*Trichoderma viride*로부터 분리된 cellulase를 사용하였으며, endoglucanases (endo I, II, III 및 IV)와 exoglucanase(exo II)와 같은 cellulase의 성분들을, Bio-Gel P10, Bio-Gel P100, DEAE-Sephadex A-50, SP-Sephadex C 50 및 Avicel PH 101을 이용한 다양한 chromatography 과정을 통하여 분리했다(11). Endoglucanase로서는, CMC(carboxymethylcellulose)에 가장 높은 활성을 나타내는 전형적인 endo type인 endo I과, exoglucanase로서는 Avicel에 높은 활성을 나타내는 exo II를 흡착실험에 사용했으며, 분자량은 각각 52,000과 62,000이었다.

Cellulase 성분효소의 흡착

성분효소를 결정도가 서로 다른 셀룰로오스에 흡착시키기 위해, 셀룰로오스 400 mg을 0.1 M sodium acetate(pH 4.8) 완충용액 9 mL에 넣고 30 분간 각각의 온도에서 preincubation한 다음 1 mg/mL의 성분효소를 첨가하였다. 각 온도별로 혼합물을 reciprocal shaker에서 시간에 따라 교반한 후, 원심분리기(3000 r.p.m.)에서 5분 동안 원심분리하고, 상등액의 흡착되지 않고 남아있는 효소의 양을 정량하였다.

결과 및 고찰

가수분해를 통한 셀룰로오스의 구조 변화

셀룰로오스의 효소 가수분해에 의해 전처리된 셀룰로오스의 결정성을 측정하기 위하여, 각 셀룰로오스에 대한 X-ray diffractogram을 얻어, Figure 1에 나타냈다. $I_s(\theta) - I_d(\theta)$ 에 대한 $I_{cr}(\theta) - I_d(\theta)$ 의 비를 Figure 2에 나타냈으며, 그 기울기로부터 상관결정성 지수를 결정하였다. 결정성을 나타내는 파라미터는 요오드 흡착량(ISV), 상관결정성 지수(C_c) 및 퍼센트결정 지수(CrI)로 나누어지는데, 그 측정 방법에 따라 값이 서로 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다(12). 이들 방법 중 효소 전처리에 의한 시료의 결정성은 상관결정성 지수와 가장 밀접한 관계가 있음이 보고되었다(13). Figure 1의 diffractogram의 값들을 (1)식에 대입하여 좋은 직선관계(Figure 2) 얻었으며, 기울기는 0.65였다. Figure 3은 cellulase에 의해 처리된 셀룰로오스의 X-ray diffractogram을 나타낸 것이다. 이 X-ray diffractogram으로부터 상관결정성 지수값을 계산하였고, 가수분해가 진행되는 동안의 셀룰로오스의 상관결정성 지수값과 환원당 양을 Table 1에 나타내었다. 전처리하지 않은 α -셀룰로오스의 상관결정성 지수는 0.65였고, 가수분해가 진행되는 처음 6 시간 동안 처리된 셀룰로오스는 결정성의 변화는 많았지만, 그 이후 시

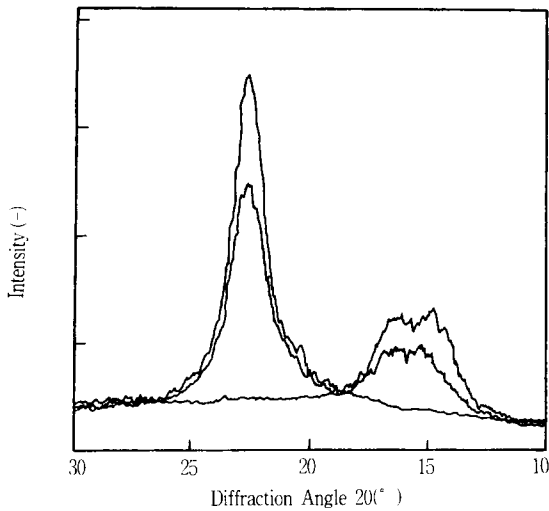


Figure 1. X-ray diffractograms of crystalline and amorphous standards. a; Crystalline cellulose (Sigmacell 100), b; Sample cellulose(α -celluloses), c; Amorphous cellulose(phosphoric acid-regenerated cellulose).

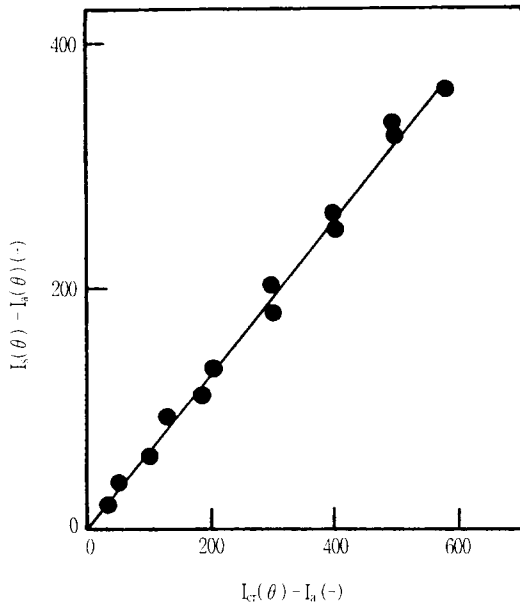


Figure 2. Plot of $[I_c(\theta) - I_a(\theta)]$ vs. $[I_c(\theta) - I_a(\theta)]$.

Table 1. Correlation crystallinity index(C_c) and reducing sugar of hydrolysis reaction on α -celluloses.

Hydrolysis Reaction Time (hr)	$C_c(-)$	Reducing Sugar (mg/mL)
0	0.65	0.00
6	0.77	20.8
24	0.86	29.3
48	0.93	36.1

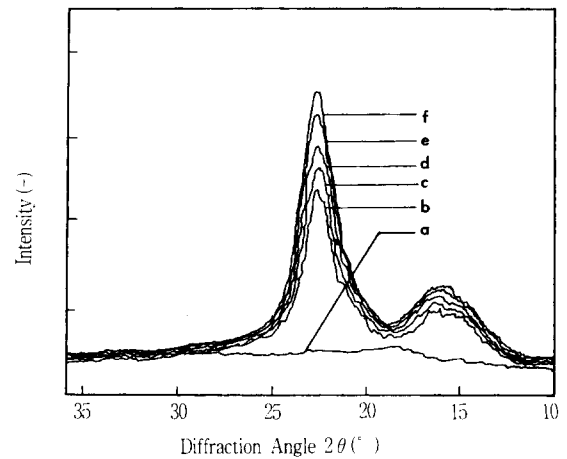


Figure 3. X-ray diffractograms of α -celluloses during hydrolysis reaction. (a) Amorphous cellulose. Enzymatic hydrolysis times; (b) 0 hr; (c) 6 hr; (d) 12 hr; (e) 24 hr; (f) 48 hr.

간에서는 변화량이 작아지는 경향을 나타내었다. 또한 이때 생성된 환원당의 양도 상관결정성 지수와 비슷한 경향으로 증가하였다. 위의 결과로부터 가수분해가 진행될수록 셀룰로오스의 구성성분 중 비결정성 부분이 빠르게 가수분해되어 상관결정성 지수가 증가함을 알 수 있었다. 물론 효소적 가수분해에 의한 셀룰로오스의 전처리, 화학적 전처리에 비해 셀룰로오스의 표면을 가수분해하기 때문에 셀룰로오스 입자의 내부의 구조보다 표면에서 더 큰 구조변화를 가져올 것이다.

구조가 다른 셀룰로오스에 대한 성분효소의 흡착

이미 언급한 바와 같이 셀룰로오스의 효소 가수분해 과정은 cellulase의 흡착 과정을 거쳐서 진행된다. 따라서 흡착현상의 이해는 가수분해 반응의 메커니즘을 이해하는데 필수적으로 알아야 할 분야이다. 특히 가수분해의 속도에 크게 영향을 미치는 셀룰로오스의 결정성은 효소의 흡착과 관련지어 이해되어야 할 것이다. 셀룰로오스에 대한 각 성분효소의 흡착 실험은 주어진 온도에서 일정한 농도의 기질 용액에서 시행하였다. 먼저 각 성분효소의 시간에 따른 흡착량을 알아보기 위해, 우선 세척에 의해 효소가 완전히 제거되는지를 알아보았다. 그러기 위해 세척 후 새로운 효소를 첨가하지 않고 48 시간 동안 가수분해하였다. 이때 전혀 환원당을 생성하지 않는 것으로 보아 세척에 의해 효소들이 완전히 제거됨을 알 수 있었다. Figure 4 와 Figure 5 는, 5°C에서 endo I 과 exo II 가, 서로 다른 상관결정성 지수를 갖는 셀룰로오스에 대한 시간에 따른 흡착량을 나타낸 것이다. Cellulase 성분효소는 셀룰로오스의 결정성에 따라 흡착이 달라진다(14,15). 온도 5°C에서는 15 분 이내에 모든 흡착이 끝났으며, 분리된 endo I 성분 효소가 exo II 성분 효소보다 더 빨리 흡착되고, 또한 더 많은 양이 흡착되었다. Endo I 과 exo II 의 흡착량은 셀룰로오스의 상관결정성 지수가 증가함에 따라 감소함을 보여주었다. 효소-기질간의 흡착반응은 기질의 한 흡착자리에 한 효소가 흡착하여 평형에 도달된다는 것을 가정하여 가능하다(14). 시간에 따른 흡착량의 변화는 다음과 같은 1차 흡착 반응속도식으로 표현된다(15).

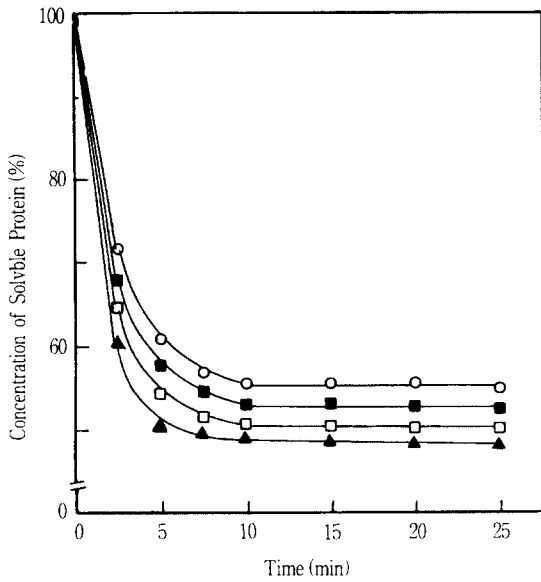


Figure 4. Adsorption of endo I component on α -celluloses with different crystallinity at 5°C. The value of correlation crystallinity index; (▲) 0.65; (□) 0.77; (■) 0.86; (○) 0.93.

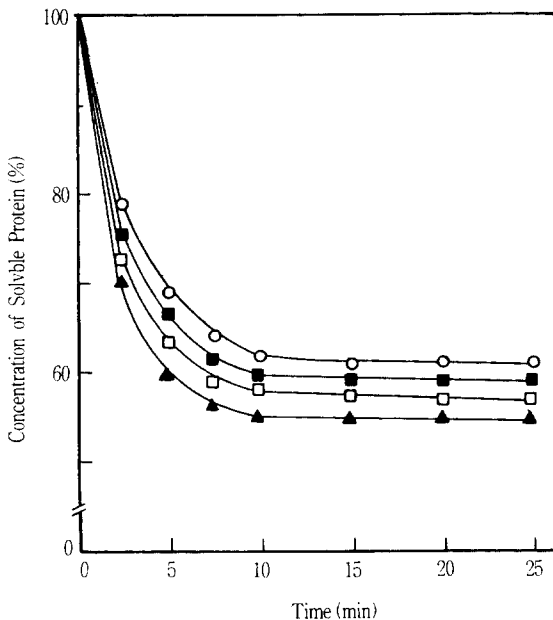


Figure 5. Adsorption of exo II component on α -cellulose with different crystallinity at 5°C. The value of correlation crystallinity index; (▲) 0.65; (□) 0.77; (■) 0.86; (○) 0.93.

$$dC_a/dt = k_a (C_s - C_a) \tag{2}$$

여기서 C_a 는 일정 시간에서의 흡착된 성분효소의 농도(mg/g), C_s 는 성분효소의 포화농도로써 15 분 후에 흡착된 성분효소의 농도(mg/g substrate), k_a 는 흡착 속도상수이다. 흡착 속도상수를 얻기 위하여 (2)식을 적분하여 다음 식과 같이 쓸 수 있다.

$$k_a = (1/t) \ln [C_s / (C_s - C_a)] \tag{3}$$

(3)식에서 흡착 속도상수는 t 와 $\ln C_s / (C_s - C_a)$ 을 plot하여 기울기로부터 구할 수 있다. 각 성분효소의 흡착에 대한 값을 (3)식에 대입하여 흡착 속도상수를 구하였다. 본 실험에서 얻어진 각 효소에 대한 흡착 실험값으로부터 두 성분효소의 흡착은 유사 1차반응 형태에 따라 진행됨을 알 수 있었다. 각 셀룰로오스에 대한 성분효소의 흡착실험은 5°C - 45°C 사이에서 실시하여 각각의 흡착 속도상수를 구하였다. Table 2에는 5°C에서의 전처리 셀룰로오스에 대한 각 성분효소의 흡착 실험을 통하여 구한 흡착 속도상수를 수록하였다. 흡착 파라미터에서 k_a 는 흡착친화력을 의미하는 것으로, 이것은 여러 연구에서 셀룰로오스의 특성, 특히 결정성과 같은 성질에 관계되어 있음이 보고된 바 있다(14). 흡착 속도상수는 상관결정성 지수에 의존하였으며, 두 성분효소 모두는 한결같이 결정성이 증가할수록 흡착 속도상수는 감소하였다. 상관결정성 지수가 같은 셀룰로오스에 대한 흡착 속도상수값은 endo I이 exo II보다 더 컸다. 이러한 결과는 endo I이 exo II보다 흡착 친화력이 크고, exo-glucanases의 흡착은 endoglucanases에 의한 말단부분(chain end)에 의존하는 것을 의미한다. Beldman 등(16)도 이와 유사한 결과를 얻은 바 있다. 또한 결정성이 증가할수록 흡착 속도상수값의 감소 폭이 endo I보다 exo II가 작게 나타나는데, 이것은 exo II가 결정성이 큰 셀룰로오스에 대하여 친화력이 크기 때문일 것이다. 서로 다른 온도에서 각 성분효소들의 셀룰로오스에 대한 흡착 속도상수 값($\ln k_a$)와 $1/T$ 를 plot한 결과 직선관계를 얻었다(Figure 6, 7). 이때 상관결정성 지수의 값은 반응초기의 값이며, 두 효소 모두 온도가 증가할수록 흡착 속도상수도 증가한다. 흡착 속도상수가 온도에 의존하기 때문에 Arrhenius 식에 의해 흡착 활성화에너지(E_a)를 다음 식으로 쓸 수 있다.

$$\ln k_a = \ln A - E_a / RT \tag{4}$$

여기서 A 는 pre-exponential factor, T 는 절대온도, R 은 gas constant를 나타내며, $\ln k_a$ 와 $1/T$ 의 plot으로부터 E_a 값을 구하였고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 흡착 활성화에너지는 전처리되지 않은 α -셀룰로오스의 경우, endo I 성분효소가 3350 J/g mol, exo II 성분효소가 4450 J/g mol로 비교적 작은 값을 나타내었다. 상관결정성 지수가 같은 셀룰로오스에 대한 흡착 활성화에너지값은 endo I이 exo II보다 작다. 이것은 endo I이 exo II보다 셀룰로오스 표면에 더 흡착하기 쉽고, exo II가 endo I보다 셀룰로오스의 표면에 보다 더 강하게 결

Table 2. Adsorption rate constant(k_a) of cellulase components on celluloses with different correlation crystallinity index at 5°C

Enzyme	C_c	$k_a \times 10^{-3}$ (sec ⁻¹)	Enzyme	C_c	$k_a \times 10^{-3}$ (sec ⁻¹)
endo I	0.65	9.28	exo II	0.65	7.30
	0.77	8.23		0.77	6.34
	0.86	7.52		0.85	5.68
	0.93	6.87		0.93	5.09

Table 3. Activation energies for the adsorption of cellulase components on α -cellulose with different correlation crystallinity index.

C_c	Activation Energy (kJ/g mole)	
	endo I	exo II
0.65	3.35	4.45
0.77	3.78	4.85
0.86	4.35	5.15
0.93	4.95	5.41

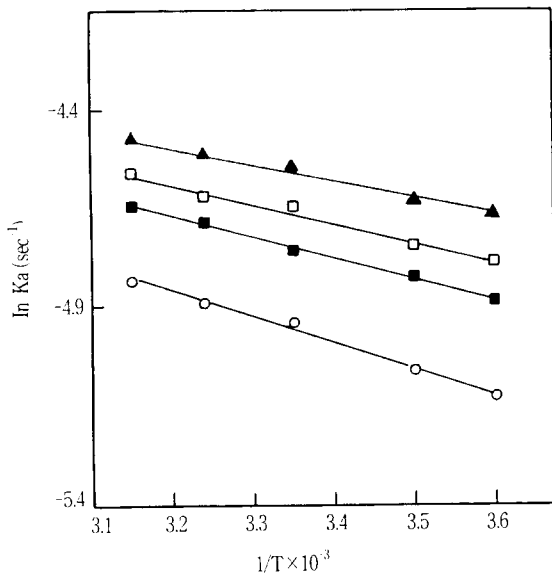


Figure 6. Arrhenius plots for the adsorption of endo I component on α -cellulose different correlation crystallinity index. The value of correlation crystallinity index: (▲) 0.65; (□) 0.77; (■) 0.86; (○) 0.93.

합하기 때문이다. 효소적 가수분해에 의해 전처리된 셀룰로오스에 대한 흡착 활성화에너지는 결정성이 증가할수록 두 효소 모두 증가하였다. 이것은 셀룰로오스의 가수분해시 비결정성 부분이 먼저 가수분해되어 결정성이 증가했듯이, 흡착에서도 비결정성 부분을 많이 포함한 셀룰로오스의 흡착 활성화에너지가 작은 값을 갖는다는 것을 알 수 있다. 셀룰로오스의 결정성이 증가할수록 흡착 활성화에너지는 증가한다. 결정성의 증가에 따른 흡착 활성화에너지의 증가율이 exo II보다 endo I이 더 큼을 알 수 있다. 이 사실이 Table 3에 나타나 있다. 이러한 결과는 endo형 효소가 exo형 효소보다 셀룰로오스의 비결정성 부분에 흡착이 보다 용이함을 나타낸다. 본 실험에서 사용한 셀룰로오스는, 효소에 의해 전처리되었기 때문에 구조적 특성이 다른 셀룰로오스성 물질에 비하여 보다 유사한 물리화학적 특성을 갖는 한계성이 있다. 셀룰로오스의 효소적 가수분해 메커니즘을 설명하기 위해서는, 가수분해에 대한 연구와 좀더 다양한 흡착특성에 관한 연구가 병행되어야 할 것이다.

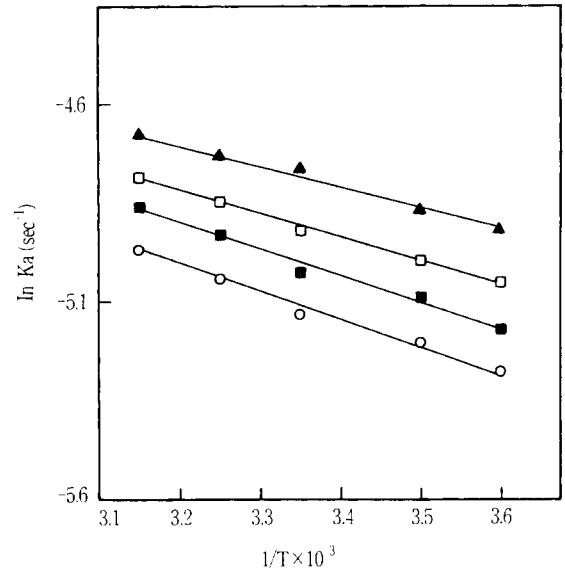


Figure 7. Arrhenius plots for the adsorption of exo II component on α -cellulose different crystallinity index. The value of correlation crystallinity index: (▲) 0.65; (□) 0.77; (■) 0.86; (○) 0.93.

요 약

상관결정성 지수가 서로 다른 α -셀룰로오스를 이용하여 *Trichoderma viride*속 cellulase로부터 분리한 endo I 과 exo II의 흡착 특성을 조사하였다. 성분효소의 흡착은 셀룰로오스의 물리화학적 성질과 반응조건에 많은 영향을 받는다. α -셀룰로오스는 효소를 이용한 전처리를 통하여 일정 시간 처리한 후 회수하여 사용하였으며, 이때 상관결정성 지수는 가수분해가 진행될수록 증가하였다. 5 °C에서는, 15분 이내에 모든 흡착이 끝나며, 분리된 endo I 성분효소가 exo II 성분효소보다 더 빨리 흡착되었고, 더 많은 양이 흡착되었다. 또한 성분효소의 흡착을 유사 1차반응속도식에 적용시켜 흡착 파라미터, 즉 흡착 속도상수와 흡착 활성화에너지를 구하였다. 흡착 속도상수값은 endo I이 exo II보다 더 컸으며, 이러한 결과는 endo I이 exo II보다 셀룰로오스 표면에 더 빠르게 흡착된다는 것을 의미한다. 전처리된 셀룰로오스의 상관결정성 지수가 증가할수록 두 효소 모두 흡착 속도상수값은 감소하였다. 흡착 활성화에너지는 두 효소 모두 비교적 작은 값을 나타내었다. 상관결정성 지수가 같은 셀룰로오스에 대한 흡착 활성화에너지는 exo II가 endo I보다 더 컸다. 이것은 exo II가 endo I보다 셀룰로오스의 표면에 보다 더 강하게 결합하기 때문이다. 또한 셀룰로오스의 결정성이 증가할수록 두 효소 모두 흡착 활성화에너지는 증가하였다.

참 고 문 헌

1. Okada, G. and K. Nisizawa (1975), Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*, *J. Biochem.*, 78, 297-306.
2. Lee, Y. H. and L. T. Fan (1982), Kinetic studies

- of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose : analysis of the initial rates. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2183-2406.
3. Nidetzky, B., M. Hayn, R. Macarron, and W. Steiner (1993), Synergism of *Trichoderma reesei* cellulase while degrading different cellulose, *Biotechnol. Lett.*, 15, 71-76.
 4. Hoshino, E., T. Kanda, Y. Sasaki, and K. Nisizawa (1992), Adsorption mode of exo-cellulase and endo-cellulase from *Irpex lacteus*(*Polyporus tulipiferae*) on cellulose with different crystallinity, *J. Biochem.*, 111, 600-605.
 5. Beldman, G., M. F. Searle-van Leeuwen, F. M. Rombouts, and A. G. J. Voragen (1985), The cellulase of *Trichoderma viride* : Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, *Eur. J. Biochem.*, 146, 301-308.
 6. Steiner, W., W. Sattler, and H. Esterbauer (1988), Adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase on cellulose, *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 853-865.
 7. Lee, S. B. and I. H. Kim (1983), Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 33-51.
 8. Klyosov, A. A. (1990), Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation, *Biochemistry*, 29, 10577-10585.
 9. Chang, M. and G. T. Tsao (1981), The effect of structure on hydrolysis of cellulose, *Cellulose Chem. Technol.*, 15, 383-395.
 10. Lowry, O. H., N. J. Roschrouhy, A. E. Farr, and R. T. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-273.
 11. Kim, D. W., Y. K. Jeong, Y. H. Jang, and J. K. Lee (1994), Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*, *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 363-369.
 12. Kim, D. W., K. M. Kim, C. H. Chung, and T. S. Kim (1992), Effects of the crystallinity of cellulose on the properties of cellulase adsorption, *Polmer(Korea)*, 16, 152.
 13. Iyer, P. B., S. Sreenivasan, P. K. Chidambareswaran, and N. B. Patil (1984), Crystallization of amorphous cellulose, *Textile Res. J.*, 54, 732-735.
 14. Ooshima, H., M. Sakata, and Y. Haranno (1983), Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 3103-3114.
 15. Ghose, T. K. and V. S. Bisaria (1979), Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances, *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 131-149.
 16. Beldman, G., A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, and W. Pilnik (1988), Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*, *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 173-178.