

Xylanase, Cellulase의 생산성이 높은 *Bacillus* sp.의 분리 및 효소생산을 위한 배지조건의 최적화

정원형 · 양시용¹ · 송민동¹ · 하종규² · 김창원*

건국대학교 동물자원연구센터, ¹건국대학교 생명공학과, ²서울대학교 동물자원학과

Isolation of *Bacillus* sp. Producing Xylanase and Cellulase and Optimization of Medium Conditions for Its Production. Jeong, Won-Hyung, Si-Yong Yang¹, Min-Dong Song¹, Jong-Kyu Ha², and Chang-Won Kim*. *Animal Resources Research Center, Konkuk University, Hawyang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea, ¹Department of Biotechnology, Konkuk University, 322 Danwol-dong, Chungju 380-701, Korea. ²Department of Animal Biotechnology, San 56-1, Shillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea* – A bacterium producing the extracellular xylanase and CMCase was isolated from soil and has been identified as *Bacillus* sp. The isolate, named *Bacillus* sp. A-7, was shown to be very similar to *Bacillus licheniformis* on the basis of its biochemical and physiological properties. The maximum xylanase and CMCase production were obtained when 2.0% (w/v) glucose and 0.3% (w/v) yeast extract were used as carbon source and nitrogen source, respectively. The best mineral conditions for xylanase and CMCase production were 0.1%(w/v) CaCl₂. Among the various feedstuffs, 1.0%(w/v) soybean meal was selected for the best xylanase and CMCase production.

Key words: *Bacillus licheniformis*, xylanase, CMCase, soybean meal

Xylanase는 식물 세포벽에 존재하는 hemicellulose의 주요 구성성분인 xylan을 가수분해하여 xylose 또는 xylooligosaccharide로 전환시키는 효소로서 제지의 표백공정, 과일음료의 청징, 제빵의 고품질화, 농산 부산물 이용 증대 및 가축사료의 사료효율 개선을 위해 널리 이용되고 있다. 특히 사료산업에 있어 미생물 유래 xylanase가 사료첨가용 효소로 널리 사용되고 있으며 특히 닭, 돼지와 같은 단위동물의 장내 점도를 증가시키는 hemicellulose의 분해로 소화기 질병의 예방 및 사료효율 개선효과가 있는 것으로 알려져 있다[1, 2, 10, 14].

Cellulase 중 특히 CMCase(carboxymethyl cellulase, Endo- β -1,4-glucanase)는 exo- β -1,4-glucanase, β -glucosidase와 함께 cellulase계 구성효소로서 특히 곡물사료의 가축 장내에서의 이용성 증진을 위해 널리 이용되고 있다. Xylanase와 CMCase를 가축사료 첨가효소로 이용할 경우 식물세포벽 구성성분 중 대부분을 차지하고 있는 cellulose와 xylan을 동시에 분해할 수 있는 특성을 지니서 가축의 생산성 증대, 사료효율의 증대, 더 나아가서는 환경오염의 방지를 기대할 수 있다.

여러 종류의 xylanase, cellulase 생산 미생물의 분리 및

효소생산조건에 관해 보고되었다. 곰팡이 중에서는 주로 *Aspergillus* sp.와 *Trichoderma* sp.가 많이 보고되었고, 일반 세균에서는 *Bacillus* sp.와 *Clostridium* sp., *Thermomyces* sp. 등이 보고되었다[4-9, 12-14, 16-19]. 특히 *Bacillus* sp. AMX-4[18]의 경우 배지에 xylose 첨가에 의해 LB배지에 비해 xylanase 생산성(25 U/ml) 및 균 성장도가 높아졌다고 하였으며, *Bacillus pumilus* PJ19[6]의 경우 교반속도 증가에 의해 최고 115 U/ml까지 xylanase 생산성이 높아졌다고 하였다. Cellulase 및 xylanase 동시생산성을 보고한 *Trichoderma harzianum* FJ1[9]의 경우 종균 접종농도에 따라 5일 배양 후 cellulase 및 xylanase의 생산성이 각각 9.07 U/ml, 12.56 U/ml까지 생산되었다고 하였다. 특히 *Bacillus* sp.가 생산하는 효소들의 경우 내열성이 높은 경우가 많아 pelleting, extrusion과 같은 열처리 가공사료에 일정부분 적용이 가능하다.

본 연구는 가축사료 첨가용 효소 생산 및 생균제(direct-fed microbials) 균주개발을 목적으로 xylanase 및 cellulase 생산성이 동시에 높은 균주를 분리하여 효소생산을 위한 배지조건과 특히 가축사료 원료로 이용되는 대두박, 당밀 등의 저렴한 배지성분을 이용한 대량배양조건을 확립하기 위하여 실시하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3693, Fax: 82-2-450-3666

E-mail: changwonkim@hotmail.com

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

경기지방에서 수집한 토양시료들을 멸균된 0.85% NaCl 용액에 현탁시켜 적정희석 후 *Bacillus* sp.를 포함하는 세균 분리를 위해 nutrient agar에 도말하여 균주들을 분리하였다. 1차적으로 screening 배지로서 xylanase는 기질로서 1%(w/v) oat spelt를, CMCCase는 기질로서 1%(w/v) carboxymethyl cellulose(medium viscosity)를 함유한 nutrient agar를 사용하여 30°C에서 8시간 배양 후 clear zone 형성유무와 크기를 비교하여 선발하였다. 이때 CMCCase의 측정용액은 0.2%(w/v) congo red 용액으로 염색 후 1 M NaCl로 세척하여 clear zone을 측정하였다. 효소생산량 및 균의 성장도 조사를 위한 기본배지로는 nutrient broth를 이용하여 37°C, 120 rpm의 조건에서 8시간 배양시킨 후 측정하였다. 선발균주의 동정은 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사함으로써 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[3]에 따라서 실시하였다. 생화학적 특성조사는 API 50 CHB kit(bioMerieux Vitek, Inc.)를 이용하여 37°C에서 48시간 배양 후 실시하였다.

효소역가 측정

Xylanase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법 [11]을 사용하여 oat spelt xylan으로부터 유리된 xylose 함량을 측정하여 분석하였다[8]. 증류수에 녹인 1.0%(w/v) xylan 500 µl, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 250 µl와 효소 용액 250 µl을 넣고 50°C에서 15분 반응시킨 후, DNS 시약 3 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 5분 동안 끓인 다음, 찬물에서 냉각 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였고 D-xylose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소의 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 xylan으로부터 1 µmol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. CMCCase의 활성도 측정방법은 xylanase 역가 측정방법 중 기질로 xylan 대신에 CMC를 사용하는 것과 표준시료로 glucose를 사용하는 이외에는 동일한 방법을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Xylanase, CMCCase 생산균의 분리, 동정 및 특성

분리 균주들 중에서 xylanase와 CMCCase를 모두 나타내는 11 균주를 1차 screening 하였으며(Table 1), 이중 strain A-7이 가장 우수한 활력을 나타내었다. 선발 균주는 그람염색과 morphology 관찰결과 그람양성 간균으로 밝혀졌다. API 20균 동정 kit를 이용한 특성 조사결과, Table 2와 같이 *Bacillus* 속 균주로 판별되었으며, 이를 *Bacillus* sp. A-7이라 명명하였다. API 50 CHB 균 동정 kit을 사용하여

Table 1. Enzyme activities of 1st selected microorganisms

Strain	Growth ^{1,2} at 37°C	Enzyme activity ³	
		Xylanase	CMCase
A-7	+++	+++	+++
C-10	+++	+	+
C-12	+++	++	+
C-5	+++	+	++
D-6	+++	+	++
D-27	+++	+	+
E-7	+++	+++	+
E-5	+++	++	+
E-11	+++	+	+
F-15	+++	+	+
G-6	+++	+++	++

¹The rate of growth was evaluated after 8 hr on nutrient broth.

²+++ represents excellent growth.

³+++ represents excellent clear zone formation on screening medium; ++good; +fair.

Table 2. Morphological and biochemical properties of *Bacillus* sp. A-7

Characteristics	<i>Bacillus</i> sp.A-7
Gram staining	+
Motility	+
Cell form	Rod
Spore formation	+
Catalase	+
Voges-Proskauer	+
Acid from glucose	+
β-Galactosidase	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
Urease	-
Tryptophan deaminase	-
Indole production	-
Nitrate reduction	+
Gelatin hydrolysis	+

50가지의 당에 대한 생화학적 특성 조사결과 *Bacillus licheniformis*에 속하는 것으로 나타났다(Table 3).

탄소원에 따른 효소생산성에 미치는 영향

37°C, 150 rpm, 12시간 배양 조건에서 yeast extract 0.2%(w/v)를 기본 질소원으로 2%(w/v) 농도로 여러 가지 탄소원에 의한 효소생산성을 파악한 결과 Table 4와 같이 glucose 첨가에 의해 *Bacillus licheniformis* A-7 균주의 경우 xylanase 및 CMCCase 생산성이 가장 높은 것으로 나타났다. Glucose의 경우 Fig. 1에 나타난 바와 같이 2%까지는

Table 3. Biochemical characteristics (carbohydrates) of *Bacillus* sp. A-7

Characteristics	<i>Bacillus</i> sp. A-7	Characteristics	<i>Bacillus</i> sp. A-7
Glycerol	+	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogene	+
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	-Gentiobiose	-
Rhamnose	+	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	+
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	+ ^w	D-Arabitol	-
β-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N Acetyl glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2 aceto-gluconate	-
Arbutine	+	5 aceto-gluconate	-
Esculine	+		

+, positive; +^w, weakly positive; -, negative

Table 4. Effects of carbon sources on xylanase and CMCCase production¹

Carbon sources (2%)	Xylanase production (unit/ml, means±std)	Relative productivity(%)	CMCase production (unit/ml, means±std)	Relative productivity (%)
Glucose	66.2±4.9	100	94.1±10.7	100
Oat spelt xylan	11.1±1.8	17	10.3± 5.6	11
Xylose	55.7±2.6	85	67.9± 7.8	72
Wheat bran	41.3±3.0	62	20.4± 3.9	21
Soluble starch	29.3±0.8	44	33.3± 2.8	35
CMC ²	50.8±2.7	77	21.4± 2.1	22
Maltose	38.2±3.1	58	50.1± 2.8	53

¹Basal nitrogen source: 0.2%(w/v) yeast extract

²Carboxymethyl cellulose (medium viscosity)

농도 증가에 따라 xylanase 및 CMCCase 생산성이 높아졌으나 5% 첨가시 오히려 감소하는 것으로 나타났다.

질소원에 따른 효소생산성에 미치는 영향

Glucose 2.0%(w/v)를 기본 탄소원으로 하여 0.3%(w/v) 농도로 여러 가지 질소원 첨가하여 37°C, 150 rpm으로 배양 후 효소생산성을 측정 비교하였다. Table 5에 나타난 바와 같이 yeast extract 첨가에 의해 xylanase 및 CMCCase 생산성이 가장 높은 것으로 나타났다.

Mineral 첨가에 따른 효소생산성에 미치는 영향

액상배양 조건에서 가장 높은 효소생산성을 glucose 2.0% (w/v)와 yeast extract 0.3%(w/v)를 기본배지로 각각 0.1% (w/v) 수준으로 mineral 첨가에 의한 효소생산성에 미치는 영향을 파악하였다. Table 6에 나타난 바와 같이 CaCl₂와 NaCl 첨가에 의해 xylanase 및 CMCCase 생산성이 높아지는 것으로 나타났다. 일반적으로 *Bacillus* sp. 유래 효소의 경우 calcium 첨가에 의해 효소의 안정성과 역가가 높아진다고 알려져 있으며, 본 선발균주의 경우 배지내 calcium 첨가에 의

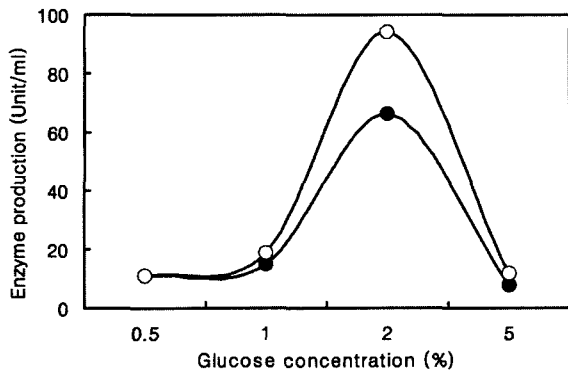


Fig. 1. Effects of glucose concentration on the enzyme production. Basal nitrogen source was 0.2%(w/v) yeast extract. ●: xylanase, ○: CMCCase.

해 xylanase 및 CMCCase 생산성이 무첨가에 비해 xylanase는 1.9배, CMCCase는 3.4배 높아지는 것으로 나타났다. NaCl

의 경우 xylanase 생산성에는 별다른 영향을 미치지 않았으나 CMCCase 생산성은 무첨가에 비해 3.2배 높아지는 것으로 나타났다. 무첨가에 비해 xylanase 및 CMCCase 생산성이 모두 높아진 CaCl₂와 NaCl을 모두 첨가하여 배양한 결과 xylanase는 192 unit/ml, CMCCase는 438 unit/ml로 CaCl₂ 단독첨가와 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 xylanase 및 CMCCase 생산을 위한 선발 균주 *B. licheniformis* A-7의 효소생산을 위한 최적 액상 배지조건은 탄소원으로 glucose 2.0%(w/v), 질소원으로 yeast extract 0.3%(w/v), 미네랄은 CaCl₂ 0.1%(w/v)인 것으로 나타났다.

사료원료(feedstuffs)를 이용한 효소생산

Yeast extract 0.3%(w/v)를 기본배지로 하여 가축사료로 이용되는 옥공이(corn cob), 대두박(soybean meal), 당밀(molasses), 오차드그라스(orchard grass)를 농도별로 첨가하

Table 5. Effects of nitrogen sources on xylanase and CMCCase production¹

Nitrogen sources (0.3%)	Xylanase production (Unit/ml, means±std)	Relative productivity (%)	CMCase production (unit/ml, means±std)	Relative productivity (%)
Yeast extract	110.1 ± 14.8	100	138.1 ± 4.8	100
Skim milk	87.4 ± 1.8	79	106.3 ± 5.5	77
Tryptone	55.0 ± 5.1	50	61.4 ± 8.0	44
Peptone	50.5 ± 2.5	46	112.2 ± 2.7	81
Soytone	98.1 ± 3.3	89	48.3 ± 4.0	35
Beef extract	75.2 ± 9.1	68	60.0 ± 3.1	43
Yeast, dried	52.2 ± 2.9	47	70.4 ± 2.1	51
Casein	95.4 ± 3.1	86	27.7 ± 2.8	20
Ammonium sulfate	92.2 ± 2.0	84	80.0 ± 3.3	58
Ammonium citrate	71.3 ± 3.7	65	21.1 ± 3.0	15
Ammonium chloride	78.2 ± 3.1	71	91.4 ± 1.1	66
Ammonium nitrate	55.3 ± 12.5	50	113.3 ± 5.7	82
Malt extract	70.4 ± 7.0	64	22.1 ± 2.8	16
Urea	86.3 ± 0.8	78	21.4 ± 1.6	15
Casamino acid	90.0 ± 2.8	82	105.3 ± 6.6	76
Yeast extract + skim milk	102.2 ± 7.9	93	121.1 ± 4.8	88
Yeast extract + casamino acid	72.0 ± 3.3	66	115.4 ± 5.5	84

¹Basal carbon source: 2.0%(w/v) glucose

Table 6. Effects of additional various minerals on the xylanase and CMCCase production¹

Mineral (0.1%)	Xylanase production (Unit/ml, means±std)	Relative productivity (fold)	CMCase production (Unit/ml, means±std)	Relative productivity (fold)
None	110.1 ± 14.6	1	138.3 ± 5.1	1
CaCl ₂	205.3 ± 4.5	1.9	474.8 ± 12.0	3.4
NaCl	121.0 ± 11.1	1.1	440.0 ± 4.6	3.2
KCl	141.2 ± 3.2	1.3	98.4 ± 10.0	0.7
FeSO ₄	120.4 ± 1.1	1.1	51.3 ± 8.5	0.4
MgSO ₄	82.0 ± 3.1	0.7	71.3 ± 1.1	0.5
MnCl ₂	151.4 ± 5.0	1.4	82.4 ± 4.0	0.6
CaCl ₂ +NaCl	220.1 ± 3.1	2.0	382.3 ± 15.1	2.8

¹Basal medium: 2.0%(w/v) glucose + 0.3%(w/v) yeast extract

여 xylanase 및 CMCase의 생산성에 미치는 영향을 파악한 결과 대두박(SBM) 1.0%(w/v)을 첨가한 경우 xylanase 및 CMCase 생산성이 가장 높았다(Table 7). 특히 xylanase의 역가는 213 unit/ml로서 최적 효소 생산조건인 glucose 2.0%(w/v), yeast extract 0.3%(w/v), CaCl₂ 0.1%(w/v)와 유사한 생산성을 나타내었다. 대두박의 경우 1.0%(w/v) 첨가수준까지는 효소 생산성이 증가하였으나 2.0%(w/v) 첨가한 경우 0.1%(w/v) 첨가한 경우와 유사할 정도로 효소생산성이 오히려 저하되는 것으로 나타났다. 이는 다량의 환원당 생산에 의한 효소생합성 저해에 따른 것으로 파악된다. 당밀의 경우 0.1%(w/v), 0.5%(w/v) 첨가시 유사한 효소생산성을 나타낸 반면 1.0%(w/v) 첨가수준의 경우 오히려 효소생산성이 저하되었는데 이는 당밀에 함유된 과량의 유리 당에 의해 오히려 효소생합성이 저하되었기 때문으로 파악된다. 당밀 0.5%(w/v)와 대두박 0.5%(w/v) 첨가 및 당밀 0.5%(w/v)와 대두박을 끓인 후 걸러서 얻은 대두박 용액 0.5%(v/v)의 경우에도 대두박 1% 첨가보다는 낮은 효소생산성을 나타내었다.

상대적으로 효소생산성이 높은 대두박 1%(w/v)와 당밀 0.5%(w/v)를 기본배지로 하여 다양한 질소원에 따른 효소생산성에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 8에 나타난 바와 같이 대두박 1%(w/v)의 경우 ammonium nitrate 0.3%(w/v) 첨가에 의해 yeast extract 0.3%(w/v) 첨가에 비해 xylanase는 4.0배, CMCase는 2.1배 효소생산성이 높았다. 최적 액상배지조건에서 도출된 CaCl₂ 첨가효과 검토를 위해 대두박 1%, ammonium nitrate 0.3%를 기본배지로 하여 CaCl₂ 0.1%를 첨가한 결과 기본배지에 비해 xylanase는 1.1배,

Table 7. Effects of various feedstuffs on the xylanase and CMCase production¹

Feedstuffs	Relative productivity(%)	
	Xylanase	CMCase
0.5% Corn cob	5	15
0.1% SBM ²	39	21
0.5% SBM	78	70
1.0% SBM	100 ³	100 ⁴
2.0% SBM	41	21
0.1% molasses	90	30
0.5% molasses	91	60
1.0% molasses	3	5
0.1% orchard grass	39	30
0.5% orchard grass	48	45
1.0% orchard grass	41	20
0.5% molasses + 0.5% SBM	63	92
0.5% molasses + 0.5% filtered SBM	53	40

¹Basal medium: 0.3%(w/v) yeast extract

²Soybean meal

³Xylanase activity: 213 Unit/ml

⁴CMCase activity: 12 Unit/ml

Table 8. Effects of additional nitrogen sources on relative xylanase and CMCase productivities (fold)

Nitrogen sources (0.3%)	1.0% SBM		0.5% molasses	
	Xylanase	CMCase	Xylanase	CMCase
Yeast extract	1.0	1.0	1.0	1.0
Skim milk	0.2	0.4	0.1	0.3
Tryptone	1.2	1.3	0.4	0.7
Peptone	1.2	0.9	0.3	0.8
Soytone	1.2	1.1	1.2	0.8
Beef extract	3.0	1.1	1.5	1.1
Yeast, dried	1.5	1.1	0.5	0.6
Casein	0	0.6	0.1	0.3
Ammonium sulfate	0.8	0.3	0.2	0.6
Ammonium citrate	0.6	0.4	0.1	0.4
Ammonium chloride	1.8	0.1	0.3	0.8
Ammonium nitrate	4.0	2.1	0.1	0.8
Malt extract	0.2	0.5	0.1	0.4
Urea	0.1	0.3	0.2	1.7
Casamino acid	1.9	0.7	1.8	2.1

CMCase는 2.1배 효소생산성이 높은 것으로 나타났다. 당밀 0.5%(w/v)의 경우 casamino acid 0.3%(w/v) 첨가에 의해 yeast extract 0.3%(w/v) 첨가에 비해 xylanase는 1.8배, CMCase는 2.1배 효소생산성이 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과를 토대로 사료원료를 이용한 *B. licheniformis* A-7 균주의 xylanase 및 CMCase 생산은 대두박 1.0%(w/v)를 기본으로 하여 ammonium nitrate 0.3% 및 CaCl₂ 0.1%를 첨가하는 것이 바람직한 배지조성으로 나타났다.

요 약

가축 사료첨가용 효소생산을 목적으로 xylanase 및 CMCase를 동시에 분비하는 미생물을 분리한 후 가장 생산성이 높은 균주를 선발하였다. 선발된 미생물을 동정한 결과 *Bacillus* sp.에 속하는 균주로 *Bacillus* sp. A-7로 명명하였으며, *B. licheniformis*로 동정되었다. 효소생산을 위한 최적 액상배양조건은 탄소원으로 glucose 2.0%(w/v), 질소원으로 yeast extract 0.3%(w/v), 미네랄은 CaCl₂ 0.1%(w/v)인 것으로 나타났다. 저렴한 효소생산을 위한 배지조성을 얻기 위해 가축사료로 이용되는 저가의 원료사료를 이용하여 효소생산성을 파악한 결과 대두박 1.0%(w/v)와 당밀 0.5%(w/v)가 특히 xylanase 생산성이 높은 것으로 나타났다. 특히, 대두박 1.0%(w/v)를 기본배지로 하여 ammonium nitrate 0.3%(w/v) 및 CaCl₂ 0.1% 첨가가 적합한 배지조성으로 나타났다.

REFERENCES

1. Campbell, G. L. and M. R. Bedford. 1992. Enzyme applica-

- tions for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* **72**: 449-453.
2. Castañón, J. I. R., M. P. Flores, and D. Pettersson. 1997. Mode of degradation of non-starch polysaccharides by feed enzyme preparations. *Anim. Feed Sci. Technol.* **68**: 361-365.
 3. Claus, D. and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus*, pp 1105-1139. In Sneath, P. H. A. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
 4. Gilbert, H. J. and G. P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.
 5. Halliwell, G. and J. Lovelady. 1981. Utilization of carboxymethylcellulose and enzyme synthesis by *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.* **126**: 211-217.
 6. Hamzah, A. and N. Abdulrashid. 1999. Characterization of xylanase produced by *Bacillus pumilus* strain PJ19. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 157-162.
 7. Kang, S. W., J. S. Lee, and S. W. Kim. 2002. Production of cellulase from lignocellulosic waste. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 98-102.
 8. Khasin, A., I. Alchanati, and Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1725-1730.
 9. Kim, K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh., and S. J. Kim. 2003. Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulase and xylanase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 1-8.
 10. Krause, M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr, and P. Nøgaard. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in highgrain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* **76**: 2912-2920.
 11. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 12. Mustafa, A., I. Gomes, G. Mohiuddin, and M. M. Hoq. 1994. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 298-302.
 13. Park, Y. S., M. Y. Kang, H. G. Chang, G. G. Park, J. B. Kang, J. K. Lee, and T. K. Oh. 1999. Isolation of xylanase-producing thermo-tolerant *Bacillus* sp. and its enzyme production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 370-377.
 14. Rajaram, S. and A. Varma. 1990. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 141-144.
 15. Senior, D. J., P. R. Mayers, and J. N. Saddler. 1991. The interaction of xylanases with commercial pulps. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 274-279.
 16. Suna, A. and G. Antrankian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 39-67.
 17. Yang, S. Y., M. D. Song, O. H. Kim, and C. W. Kim. 2001. Isolation of *Bacillus* sp. producing multi-enzyme and optimization of medium conditions for its production using feed-stuffs for probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 110-114.
 18. Yoon, K. H., K. H. Jung, and S. H. Park. 1997. Isolation and enzyme production of a cellulase-producing *Bacillus* sp. 79-23. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 546-551.
 19. Yoon, K. H., S. J. Seol, H. C. Cho, M. S. Lee, J. H. Choi, and K. H. Cho. 2002. Isolation and enzyme production of a xylanase-producing *Bacillus* sp. AMX-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 123-128.

(Received July 7, 2003/Accepted Oct. 29, 2003)