

Cellulase 및 Xylanase를 분비하는 *Bacillus licheniformis* DK42의 분리 및 효소 특성

김민정 · 임수진 · 강대경

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

Isolation of a *Bacillus licheniformis* DK42 Producing Cellulase and Xylanase, and Properties of the Enzymes

Min Jeong Kim, Soo Jin Lim and Dae-Kyung Kang

Dept. of Animal Resources Science, School of Bio-Resources Science, Dankook University,
Cheonan 330-714, Korea

ABSTRACT

A bacterium producing cold-active cellulase and xylanase was isolated from pig feces. The isolate, DK42 strain, was found to be the Gram-positive, non-motile, catalase-positive, and spore-forming stain. Under an electron microscope, the cells were observed to be rod-shaped. The isolate was identified as *Bacillus licheniformis* DK42 on the basis of morphological and biochemical properties as well as 16S rRNA gene sequences. The characterization of crude cellulase and xylanase from *B. licheniformis* DK42 was investigated. Cellulase exhibited an optimum temperature and pH at 45°C and 6.0, whereas xylanase exhibited an optimum temperature and pH at 55°C and 6.0. Especially cellulase maintained approx. 50% of its maximum activity even at 10°C, indicating that it is cold-active. Both cellulase and xylanase were stable after 2hr at 35°C, whereas they lost their activities after 30min at 65°C.

(Key words : Cellulase, Xylanase, *Bacillus licheniformis*)

I. 서 론

일반적으로 사료 곡물에는 난소화성 탄수화물, 즉 cellulose, hemicellulose와 lignin이 다수 함유되어 있다. 이들 중에서 β-1,4-glycosidic 결합으로 구성되어 있는 cellulose를 가수분해할 수 있는 cellulase는 곡물 사료의 가축의 장내에서의 이용성을 높힘으로써 사료효율을 향상시킬 뿐만 아니라 (Beguin과 Aubert, 1994), 축산분뇨의 퇴비화 촉진에도 기여하는 것으로 알려져 있다(김 등, 1999). 한편, hemicellulose의 주요

구성성분으로 알려진 xylan은 기본 골격이 β-1,4 결합을 하고 있는 D-xylose로 구성되어 있다. Xylan의 기본골격을 분해하는 xylanase는 가축사료의 사료효율 개선, 제지의 표백공정, 과일음료의 청징, 농산 부산물 이용성 증대 등을 위해 이용되고 있는데 (Lee와 Choi, 2006), 닭, 돼지 등의 단위동물의 장내 점도를 증가시키는 hemicellulose를 분해함으로써 소화기 질병의 예방 및 사료효율 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Campbell과 Bedford, 1992; Castanon 등, 1997). 특히 xylanase는 수용성 xylan 뿐만

Corresponding author : Dae-Kyung Kang, Dept. of Animal Resources Science, Dankook University, Anseo-dong 29, Cheonan, Chungnam-do 330-714, Korea.
Tel : 041-550-3655, Fax : 041-564-3655, E-mail: dkkang@dankook.ac.kr

아니라 cellulose에 결합된 불용성 xylan도 분해할 수 있으므로, 곡물에 잔존하는 xylan과 이와 결합된 lignin을 제거하는데 이용될 수 있다(김 등, 1995). Chiang 등(2005)은 산란계용 사료에 xylanase를 첨가할 경우에는 옥수수를 밀로 대체하여 급여하여도 산란계의 성장률이나 영양적 가치에 영향을 미치지 않았다고 하였으며, 김 등(2003)은 cellulase 및 amylase를 사료에 첨가하였을 경우에 비옥돈의 생산성에 긍정적인 영향을 미쳤다고 보고한 바 있다. 한편, cellulase와 xylanase를 함께 사료에 첨가하여 가축에 급여할 경우에 cellulose와 xylan을 동시에 분해할 수 있으므로 가축의 생산성 증대, 사료효율의 증대 뿐만 아니라 환경오염의 감소효과가 크다고 알려져 있으며(Omogbenigun 등, 2004), 장내 lactobacilli속 유산균수도 증가하였다고 보고된 바 있다(Kiarie 등, 2007).

최근 들어 국제 사료곡물 가격이 급등함으로써 국내 동물자원산업의 생산기반이 위협받고 있는 상황이기 때문에, 수입에 주로 의존하고 있는 사료곡물의 효율적인 이용이 더욱 중요한 상황이다. 그동안 사료효율 향상을 목적으로 cellulase 또는 xylanase를 분비하는 곰팡이에 대한 연구는 보고되고 있지만(김 등, 2003; 정 등, 2004), 이 두 가지 효소를 함께 분비하는 세균에 대한 보고는 많지 않은 실정이다. 정 등(2003)은 xylanase 및 cellulase 활성을 나타내는 균주를 분리하고 효소 생산을 위한 대량배양 조건을 확립한 바 있으나, 효소의 특성에 대해서는 조사된 바가 없다. 본 연구에서는 사료곡물의 효율적인 이용을 목적으로 난소화성 탄수화물인 cellulose 및 xylan을 동시에 분해할 수 있는 세균을 분리하였으며, 형태학적 및 생화학적 특성과 분리한 미생물이 분비하는 효소의 특성에 대해 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 분리 및 배지

일반 토양, 돈분, 퇴비 등의 각종 시료를 채취한 후에, 멸균된 생리식염수 (0.85% NaCl)에

현탁시켰으며, 희석액 0.1 ml를 1.0% carboxymethyl cellulose (Sigma)를 함유한 Nutrient agar에 도말하고 37°C에서 배양하였다. 배양된 균들의 replica plate를 만들고 24시간 동안 배양한 후에, 0.2% (w/v) Congo red 용액으로 염색하였으며 1 M NaCl로 세척한 후에 나타나는 노란색 투명환 (halo)이 큰 균주들을 선발하였다. 선발된 균주들을 다시 1.0% oat spelt xylan (Sigma)를 함유한 Nutrient agar에 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후에 0.2% (w/v) Congo red 용액으로 염색하였으며 clear zone이 큰 균주를 최종 선발하였다.

2. 분리균주의 동정

선별한 균주의 동정을 위해 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석함으로써 균주를 최종적으로 동정하였다. 형태학적인 특성은 전자현미경 (Scanning Electron Microscopy)으로 관찰하였으며, Sohn 등(2004)의 방법에 준하였다. 생화학적 특성조사는 API 50 CHB kit (biomerieux Vitek, Inc.)를 이용하여 37°C에서 48시간 배양 후 실시하였다. DK42 strain의 16S rRNA 유전자 서열분석을 위해, genomic DNA extraction kit (Qiagen)을 이용하여 분리균주로부터 genomic DNA를 추출한 다음, forward primer (5'-AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 reverse primer (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') set를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 50 pmole primer, 50 ng template DNA, 10XTaq DNA polymerase buffer 5nL, 2.5mM dNTP mixture 4 uL, Taq DNA polymerase (TaKara, Japan) 1 U가 포함된 PCR mixture를 95°C에서 5분간 변성시킨 후에 95°C에서 1분, 55~60°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30 cycle을 반복함으로써 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 pSTBlue-1 (Novagen, USA)에 클로닝한 다음, BigDye™-terminator sequencing kit과 ABI PRISM377 sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 염기서열을 분석하였다.

3. 배양시간에 따른 균주의 성장과 효소 생산

균의 성장 및 효소 생산량 조사를 위해서는, cellulase의 경우 CNY medium (1% CMC sodium salt, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 0.3% peptone, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.2% K₂HPO₄, pH 6.8)에 접종하고, 37°C, 130 rpm에서 진탕배양하면서 샘플링하였다. Xylanase의 경우, XNY medium (1% xylan, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 0.3% peptone, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.2% K₂HPO₄, pH 6.8)에 접종한 후, cellulase와 동일한 방법으로 진행하였다. 선발된 균주의 성장 정도는 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하였으며, 균주를 액체 배양하면서 샘플링한 상등액을 사용하여 효소 활성을 측정하였다.

4. 조효소액의 조제 및 효소활성 측정

DK42 균주를 각각 CNY 액체배지와 XNY 액체배지에 접종하고 37°C에서 12시간동안 진탕 배양한 후에, 배양액을 10,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 ammonium sulfate로 80%까지 포화시킨 후에, 4°C에서 하룻밤동안 방치하여 효소 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 10,000×g에서 20분동안 원심분리하여 회수한 후에, 50mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)으로 4°C에서 24시간동안 연속 투석하였으며, 투석이 완료된 용액을 효소활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다.

Carboxymethyl cellulase (CMCase)의 활성도는 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다 (Miller 등, 1960). 즉, 증류수에 녹인 1.0% CMC 500 µl, 200 mM phosphate buffer (pH 6.0) 250 ul와 조효소액 250ul을 혼합하고 45°C에서 3시간 반응시킨 후, carboxymethyl cellulose (CMC)으로부터 유리된 glucose 함량을 측정함으로써 분석하였다. Xylanase의 활성도의 측정방법은 CMCase 역가 측정방법과 동일하나, 기질로서 CMC 대신에 xylan을 사용하는 것과 표준시료로 D-xylose를 사용하는 이외에는 동일한 방법을 사

용하여 측정하였다. 효소의 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 CMC 또는 xylan으로부터 1 µmol의 glucose 또는 D-xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

5. 효소의 활성에 미치는 반응조건 분석

Cellulase 및 xylanase의 효소 활성 및 반응에 미치는 온도 및 pH의 영향을 조사하기 위해, DK42 strain이 생산하는 조효소액을 반응에 사용하였다. 효소 반응의 최적 온도를 조사하기 위해, 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)에서 1.0% CMC 또는 xylan 용액을 기질로 사용하여 4°C에서 65°C까지 구간별로 반응시킨 후, 상기 서술한 효소활성 측정법으로 효소 활성을 비교하였다. 효소의 최적 pH를 조사하기 위해서는, 조효소액을 아래의 각 pH 별 완충용액에 넣고 cellulase는 45°C, xylanase는 55°C에서 반응시킨 후, 활성을 비교하였다. 사용한 완충용액으로서, pH 2.0는 50 mM glycine-HCl buffer, pH 3.0~5.0 사이는 50 mM citrate-NaOH buffer, pH 6.0~8.0 사이는 50 mM potassium phosphate buffer, pH 9.0는 50 mM glycine-NaOH buffer를 각각 사용하였다.

6. Cellulase 및 xylanase의 온도 안정성

두 효소의 온도 안정성을 검토하기 위해, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)에 조효소액을 첨가하여 35°C에서 65°C까지의 각 온도에서 120분간 처리한 후에 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 분리 및 동정

일반 토양, 돈분, 퇴비 등의 각종 시료를 채취한 후에, 1% xylan (Sigma) 또는 1% CMC (Sigma)를 포함한 Nutrient agar (Difco)에 도말하고, 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난

고체배지를 0.2% Congo red로 염색하였으며, 노란색 투명환 (halo)을 나타내는 균주를 선발하였다 (Fig. 1). 돈분으로부터 선발된 DK42 균주를 동정하기 위해 특성을 조사한 결과, 본 균주는 Gram 양성의 간균으로서 (Fig. 2), 호기성의 포자 형성균이었다. DK42 균주의 당류 이용성에 대한 특징을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같으며, *Bacillus licheniformis*에 속하는 것으로 나타났다 (신뢰도 99.9%). 또한 DK42 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 후에 NCBI의 BLAST search program을 이용하여 상동성을 비교한 결과, 99%의 신뢰도로 *B. licheniformis*에 속하는 것으로 나타났으므로, 선발한 균주를 *Bacillus licheniformis* DK42로 명명하였다. 한편, *B. licheniformis* DK42가 생산하는 cellulase계 효소를 조사한 결과, avicelase 및 β -glucosidase 활성은 유도되지 않았기 때문에, *B. licheniformis* DK42가 생산하는 효소는 endocellulase인 CMCase인 것으로 추정되었다 (data not shown).

2. 배양시간에 따른 *B. licheniformis* DK42의 성장과 효소 생산

B. licheniformis DK42 균주의 배양시간에 따른 세포의 효소의 생산량을 분석하였다 (Fig. 3). Cellulase 효소 활성은 대수성장기 중반부터 급격히 증가하였고, 균의 생장이 정체기에 이르면 효소의 활성도 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 한편, xylanase 효소 활성은 세포 성장과 더불어 대수성장기 초기부터 지속적으로 증가하였으며, 대수성장기 후반에 최대 활성을 나타내고 효소 활성이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로, *Bacillus* 속 유래의 탄수화물 분해효소는 세포의 성장과 더불어 지속적으로 증가하고 정체기에 이르러 최대 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있는데 (김 등, 1995; 김 등, 2004), *B. licheniformis* DK42가 분비하는 cellulase는 이러한 경향과 일치한 반면 xylanase는 더 빠른 시점에서 생산되는 것으로 나타났다.

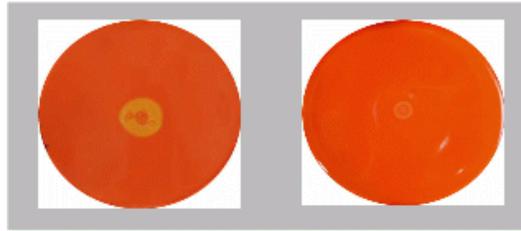


Fig. 1. Detection of cellulase (A) and xylanase activity (B) by congo-red staining of nutrient plate containing 1.0% CMC and 1.0% xylan, respectively.

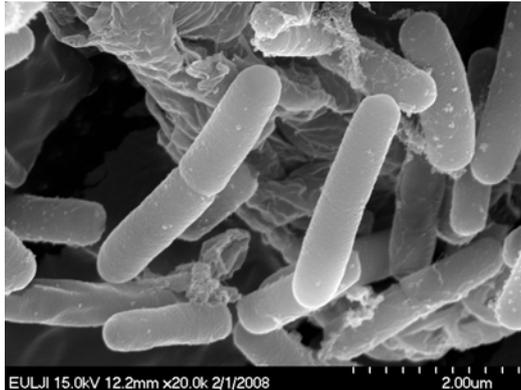


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) micrograph ($\times 20,000$) of the isolated strain DK42.

3. Cellulase와 xylanase 활성에 미치는 온도의 영향

B. licheniformis DK42이 세포외로 분비하는 cellulase와 xylanase가 기질을 가수분해하는데 있어서 반응온도가 미치는 영향을 조사하였다. 배양 상등액을 황산암모늄으로 침전시킨 단백질을 조효소액으로 사용하였으며, 반응온도를 달리하여 cellulase와 xylanase 활성을 측정하였다. Cellulase 활성의 경우에는 최적 온도가 45°C이었으며, 20°C~50°C의 비교적 넓은 범위에서 높은 효소활성을 나타내었다 (Fig. 4). 또한 55°C 이상의 온도에서는 cellulase 활성이 급격히 감소한 반면, 10°C의 낮은 온도에서도 최고 활성의 50% 정도에 해당하는 활성을 나타내었다. 한편, xylanase는 cellulase 보다 약간 높은 55°C에서 최고 활성을 나타내었으며, 온도가

Table 1. Characteristics of the isolated strain, DK42

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Shape	rod		
Gram stain	+	Arbutin	+
Catalase	-	Esculin	+
Control	-	Salicin	+
Glycerol	+	Celliobiose	+
Erythritol	-	Maltose	+
D-arabinose	-	Lactose	+
L-arabinose	+	Melibiose	-
D-ribose	+	Sucrose	+
D-xylose	+	Trehalose	+
L-xylose	-	Inulin	-
D-adonitol	-	Melezitose	-
Methyl-B-D-xylopyranoside	-	Raffinose	+
D-galactose	+	Starch	+
D-glucose	+	Glycogen	+
D-fructose	+	Xylitol	-
D-mannose	+	Gentiobiose	+
L-sorbose	-	D-turanose	+
Rhamnose	-	D-lyxose	+
Dulcitol	-	D-tagatose	+
Inositol	+	D-fucose	-
Mannitol	+	L-fucose	-
Sorbitol	+	D-arabitol	-
α -Methyl, D-Mannopyranside	-	L-arabitol	-
α -Methyl, D-glucoside	+	Gluconate	-
N-Acethyl-glucosamine	+	2-keto-gluconate	-
Amygdalin	+	5-keto-gluconate	-

1) +: positive result, -: negative result

2) API 50CHB kit was used.

낮아지면 효소의 활성도 점진적으로 감소하였다 (Fig. 4).

4. Cellulase 및 xylanase 활성에 미치는 pH의 영향

B. licheniformis DK42가 생산하는 cellulase 및 xylanase 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. 배양상등액으로부터 제조한 조효소액을 pH 2.0~9.0 범위로 조정된 후에 효소 활성을 측정 한 결과, 두 효소 모두 pH 6.0에서 최대의 효

소 활성을 나타내었다 (Fig. 5). 한편, cellulase 활성의 경우에는 pH 5.0~pH 8.0까지 상대적으로 넓은 범위에서 최대 활성이 70% 이상을 유지한 반면, xylanase 활성의 경우에는 pH 5.0 이하 또는 pH 8.0 이상에서는 활성이 급격히 저하되었다.

5. Cellulase와 xylanase의 온도 안정성

B. licheniformis DK42 균주가 분비하는 cellulase 및 xylanase의 열안정성을 조사하기 위

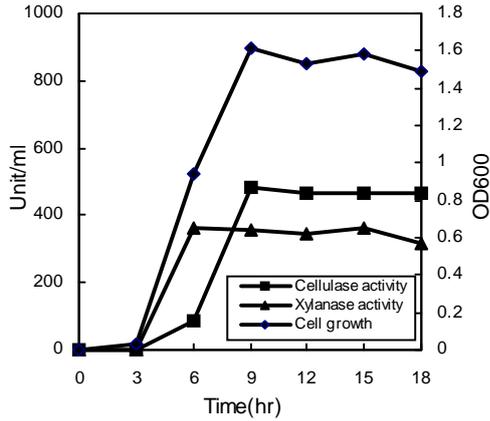


Fig. 3. Growth and enzyme production of *B. licheniformis* DK42. *B. licheniformis* DK42 was grown in nutrient broth supplemented with 1% CMC at 37°C with vigorous shaking. The cell growth was determined by measuring OD₆₀₀ of the cell culture. Enzyme activity was determined with the culture supernatants.

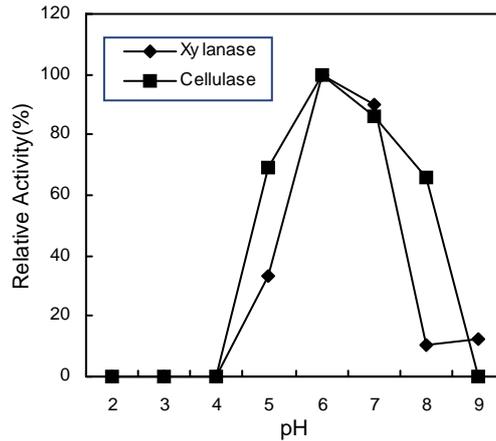


Fig. 5. Effect of pH on the activity of the cellulase and xylanase from *B. licheniformis* DK42. The maximum specific activity of crude enzymes was set as 100%. The buffer solutions used were 50 mM glycine- HCl buffer (pH 2), 50 mM citrate- NaOH (pH 3-5), 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6-8), and 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9).

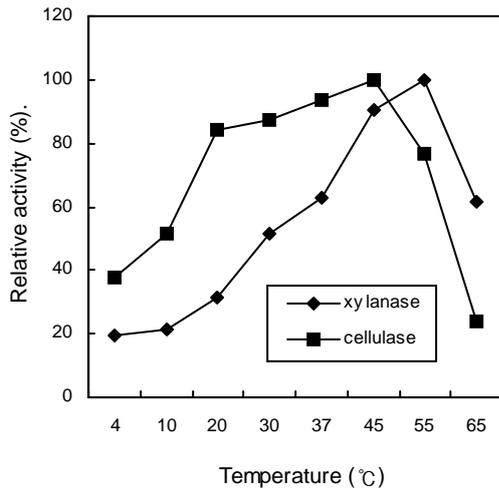


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of the cellulase and xylanase from *B. licheniformis* DK42. The maximum specific activity of crude enzymes was set as 100%. Assays were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0)

해, 조효소액을 각 온도에서 시간별로 방치한 후 남아있는 효소의 잔존활성을 측정하였다. Cellulase의 경우, 45°C에서는 2시간 후에도 효소의 활성이 안정하게 유지되었으나 55°C에서는 시간의 경과에 따라 효소의 활성이 점진적으로 감소하여 1시간 후에는 최대 활성의 50%가 소실되었다 (Fig. 6). 한편 xylanase의 경우, 45°C 이상의 온도에 방치한 경우에는 시간의 경과에 따라 효소의 활성이 점진적으로 감소하였으며, 65°C에서는 cellulase와 마찬가지로 30분 이후부터 효소의 활성이 나타나지 않았다 (Fig. 6).

본 연구에서 cellulase 및 xylanase 효소를 생산하는 *Bacillus*속 균주를 분리하고 효소적 특성을 조사하였다. *B. licheniformis*는 *B. subtilis*와는 달리 혐기적 생장이 가능한 생리적 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Veith 등, 2004). 또한, 탄수화물계 분해효소의 경우에는 단일 효소보다는 복합효소가 cellulose 및 hemi-

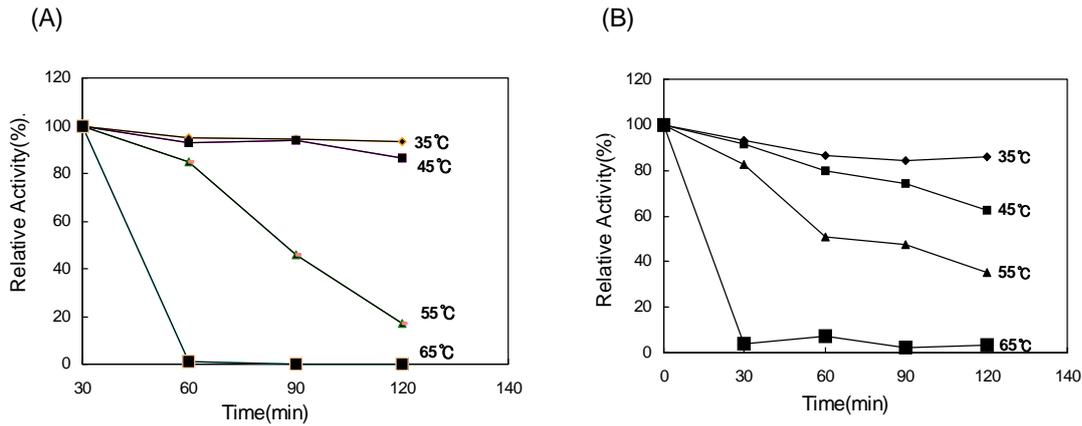


Fig. 6. Effect of temperature on the stability of the cellulase(A) and xylanase(B) from *B. licheniformis* DK42. Assay was carried out after exposure to different temperature for 2hr. The numbers next to the individual plots represent exposure temperature.

cellulose를 분해하는데 상승효과를 준다고 알려져 있으므로 (Sing 등, 2003), cellulase와 xylanase를 함께 분비하는 *B. licheniformis* DK42는 사료의 탄소화성 탄수화물의 이용효율을 높이는 데 유용할 것으로 판단된다. 또한, *B. licheniformis* DK42가 분비하는 cellulase는 저온에서도 활성이 높기 때문에 축산분뇨 처리를 비롯하여 온도가 낮은 조건에서의 바이오매스 분해에도 적용할 수 있을 것으로 보인다 (Akila 등, 2003).

IV. 요약

사료곡물의 효율적 이용을 목적으로 cellulase 및 xylanase를 분비하는 미생물을 분리한 후 가장 생산성이 높은 균주를 선발하였다. 선발된 DK42 균주의 형태, 당 이용성 및 16S rRNA 유전자 서열분석 등을 통해 동정한 결과, *Bacillus licheniformis*에 속하는 것으로 나타났으므로 선발한 균주를 *B. licheniformis* DK42로 명명하였다. *B. licheniformis* DK42가 분비하는 cellulase 효소 활성은 대수생장기 중반부터 급격히 증가하였고, 균의 생장이 정체기에 이르면 효소의 활성도 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 한편, xylanase 효소 활성은 세포 성장과 더불어 대수생장기 초기부터 지속적으로 증가하였으며, 대수생장기 후반에 최대 활성을 나타내고 효소 활성이 더 이상 증가하지 않는 것으

로 나타났다. Cellulase 활성의 경우에는 최적 온도가 45°C이었고 10°C의 저온에서도 최대 활성의 50% 정도의 활성을 나타내었으며, xylanase는 cellulase 보다 약간 높은 55°C에서 최고 활성을 나타내었다. 한편, 두 효소의 열안정성을 조사한 결과, cellulase는 45°C에서는 2시간 후에도 효소의 활성이 안정하게 유지되었으나, xylanase는 45°C에서도 약간 이상의 온도에 방치한 경우에는 시간의 경과에 따라 효소의 활성이 점진적으로 감소하였다. 두 효소의 최적 pH를 조사한 결과, 두 효소 모두 pH 6.0에서 최대의 효소 활성을 나타내었으며, cellulase 활성은 pH 5.0부터 pH 8.0까지 상대적으로 넓은 범위에서 활성을 유지한 반면, xylanase 활성의 경우에는 pH 5.0 이하 또는 pH 8.0 이상에서는 활성이 급격히 저하되었다.

V. 사사

이 연구는 2006년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구된 것으로 이에 감사드립니다.

VI. 인용문헌

1. Akila, G. and Chandra, T. S. 2003. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated

- from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase. FEMS Microbiol. Lett 219(1):63-67.
2. Beguin, P. and Aubert, J. P. 1994. The biological degradation of cellulase. FEMS Microbiol. Rev. 13:25-58.
 3. Campbell, G. L. and Bedford, M. R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. Can. J. Anim. Sci. 72:449-453.
 4. Castanon, J. I. R., Flores, M. P. and Pettersson, D. 1997. Mode of degradation of non-starch polysaccharides by feed enzyme preparations. Anim. Feed Sci. Technol. 68:361-365.
 5. Chiang, C. -C., Bi, Y. and Peter, W. -S. C. 2005. Effects of Xylanase supplementation to wheat-based diet on the performance and nutrient availability of Broiler Chickens. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 18(8):1141-1146.
 6. Kiarie, E., Nyachoti, C. M., Slominski, B. A. and Blank, G. 2007. Growth performance, gastrointestinal microbial activity, and nutrient digestibility in early-weaned pigs fed diets containing flaxseed and carbohydrase enzyme. J. Anim. Sci. 85(11): 2982-2993.
 7. Kim, H., Park, J. S., Hancock, J. D., Hines, R. H., Cobb, C., Cao, H., Hong, J. W. and Kwon, O. S. 2003. Effects of amylase and cellulase supplementation in sorghum-based diets for finishing pigs. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 16(11):70-76.
 8. Lee, J. -H. and Choi, S. H. 2006. Xylanase production by *Bacillus* sp. A-6 isolated from rice bran. J. Microbiol. Biotechnol. 16(12):1856-1861.
 9. Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. Anal. Biochem. 2:127-132.
 10. Omogbenigun, F. O., Nyachoti, C. M. and Slominski, B. A. 2004. Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. J. Anim. Sci. 82(4):1053-1061.
 11. Sing, H. S., Madlala, A. M. and Prior, B. A. 2003. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. FEMS Microbiol. Rev. 27:3-16.
 12. Sohn, J. H., Lee, J. H., Yi, H., Chun, J., Bae, K. S., Ahn, T. Y. and Kim, S. J. 2004. *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from redtide. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:675-680.
 13. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A. and Gottschalk, G. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7(4):204-211.
 14. 김대준, 신한재, 민본홍, 윤기홍. 1995. 내열성 Cellulase-free Xylanase를 생산하는 고온성 *Bacillus* sp.의 분리 및 효소 특성. 산업미생물학회지. 23(3):304-310.
 15. 김지연, 허성호, 홍정화. 2004. 알칼리성 Cellulase를 생산하는 호알칼리성 *Bacillus* sp. HSH-810의 분리 및 효소 특성. 한국미생물생명공학회지. 40(2):139-146.
 16. 김창현, 이성실. 2003. 한우 및 산양의 장내 섬유소 분해 혐기 곰팡이의 분리 및 특성 규명. 한국동물자원학회지. 45(6):1007-1018.
 17. 김태일, 한정대, 전병수, 하상우, 양창범, 김민균. 1999. 우분으로부터 *Bacillus subtilis*의 분리 및 균주가 분비하는 cellulase의 특성에 관한 연구. 한국미생물학회지. 35(4):277-282.
 18. 정원형, 양시용, 송민동, 하종규, 김창원. 2003. Xylanase, cellulase의 생산성이 높은 *Bacillus* sp.의 분리 및 효소생산을 위한 배지조건의 최적화. 한국미생물생명공학회지. 31(4):383-388.
- (접수일자 : 2008. 2. 18. / 수정일자 : 2008. 5. 27. / 채택일자 : 2008. 6. 9.)