

음식물쓰레기 당화를 위한 Amylase 생산균의 분리 및 특성조사

리 흥 선 · † 김 성 준
전남대학교 건설지구환경공학부
(접수 : 2007. 4. 2., 게재승인 : 2007. 4. 20.)

Isolation and Characteristics of an Amylase-producing Fungus for Saccharifying Food Wastes

Hongxian Li and Seong-Jun Kim†
Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
(Received : 2007. 4. 2., Accepted : 2007. 4. 20.)

In this study, an amylase-producing fungus, strain 15 was isolated from soil in order to saccharify food wastes with cellulolytic and amylolytic enzymes. The amylase production cultures were performed in Mandel's medium with 1% rice straw and 1% paper wastes as carbon sources. The strain produced various cellulolytic (FPase 0.25, xylanase 20.09, CMCase 3.15 U/mL-supernatant) and amylolytic (α -amylase 1.20, gluco-amylase 0.70, β -amylase 2.40 U/mL-supernatant) enzymes in Mandel's medium. In 10 L jar fermenter, maximum amylase and FPase activities, 3.25 and 0.23 U/mL, were obtained when the culture was grown at 30°C, 200 rpm and 0.6 vvm for 3 days. In 100 mL flask level and 10 L jar fermenter, amylase produced by the strain 15 showed similar cellulolytic and amylolytic enzyme activities with *Trichoderma inhamatum* KSJ1 isolated from rotten woods by previous researcher. The ability of saccharification to food wastes also showed similar degree. However, the isolate 15 appeared to be yellowish in YMEA plate comparing to *Trichoderma inhamatum* KSJ1 in greenish.

Key Words : Amylase, fungus, saccharification, food wastes

서 론

음식폐기물은 대부분 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 아밀로오스, 펙틴 등의 섬유소물질로 구성되어져 있으며, 이러한 섬유소물질은 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제, 아밀라아제 등의 섬유소분해효소에 의해 단당류 및 이당류로 가수분해 되어진다. 이렇게 전환되어진 단당류 및 이당류는 대부분의 미생물이 가장 이용하기 좋은 탄소원 및 에너지원으로 이용되어질 수 있으며, 발효 및 생물산업을 통해 박테리얼 셀룰로오스, 젯산, 에탄올 등으로 전환시킴으로써 음식폐기물을 고부가 자원화할 수 있다.

음식폐기물의 효소학적 가수분해에 중요한 역할을 하고 있는 α -amylase는 glycoside hydrolase로써 13개 과로 분류된다(1). α -amylase는 가수분해효소의 일종으로써, 미생물, 식물, 동물 등 다양한 생명체로부터 발견되었으며 식품공업,

의약공업, 주정공업, 섬유산업, 제지공장, 직물공장과 바이오 에너지 개발에 이용하기 위한 응용 측면에서도 많은 연구가 수행되었다(2-5). α -amylase의 경제적인 대량생산은 전분을 다당류로 전환함에 있어서 매우 중요하며(6-8), 음식물쓰레기 내의 많은 부분을 차지하는 전분의 가수분해는 exo-type와 endo-type의 amylase에 의해 분해된다. α -amylase (1,4- α -D-Glucan Glucanohydrolase)는 액화효소로서 전분을 무작위적으로 분해하는 endo형 효소이며, 전분용액의 점도를 급격히 감소시킨다. β -amylase(1,4- α -D-Glucan maltohydrolase)는 당화효소로서 전분의 1,4- α -glycosidic 결합을 가수분해하여 비환원성 말단으로부터 maltose단위로 순차적으로 분해하는 exo형 효소이다.

당 연구실의 선행 연구에서는 썩은 나무로부터 섬유소분해효소를 생산하는 균주 *Trichoderma inhamatum* KSJ1을 분리하였으며(9), 생산된 섬유소분해효소는 음식물쓰레기의 효소학적 당화에 이용되고 있고, 그 당화액은 박테리얼 셀룰로오스 (BC, Bacterial Cellulose)의 생산배지로 사용하고 있다. 음식물쓰레기를 당화한 후의 남은 고형분과 BC의 배양잔액은 다시 메탄발효공정으로 들어가는 zero-emission의 공정개발을 최종목표로 한다. BC는 원료비용이 높고 대량 생산기술이 어려워 상용화가 되지 않고 있는 실정이

† Corresponding Author : Department Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1864, Fax : +82-62-530-0864
E-mail : seongjun@jnu.ac.kr

기 때문에, 당 연구실에서는 음식물쓰레기 효소당화액을 BC 생산용 배지원으로 활용하여 BC를 저비용 생산하고 있으며, 50 L 공기순환배양기를 구축하여 BC를 대량생산하고 있다(10). 그리하여 BC의 대량 생산을 위하여서는 섬유소분해효소의 저비용 대량생산과 고효율의 당화율을 확보하는 것이 중요하다. 저비용 섬유소분해효소의 생산에 있어서 배지원료에서 약 70%를 차지하는 탄소원인 Avicel, CMC은 섬유소폐기물 (1%의 폐지와 1%의 벃짚)로 대체하는데 성공하였다. 저비용 섬유소분해효소의 완성과 더불어 음식물쓰레기의 많은 부분을 차지하는 전분 계열을 당화시킬 수 있는 amylase 균주의 분리가 필요하다.

본 연구에서는 전분의 함량이 비교적 높은 음식물쓰레기의 효율적인 당화를 위해, 기존의 *Trichoderma inhamatum* KSJ1보다 효과적으로 amylase를 생산할 수 있는 균주를 분리하여 amylase 생산특성과 음식물쓰레기 당화능력을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

Amylase 생산균의 분리와 선별

Amylase를 생산하는 미생물 분리를 위해 제주도에서 갖고 온 토양시료 1 g을 멸균수 50 mL에 현탁한 후 실온에서 15분간 진탕하여 적당량을 취하여 amylase 생산균 분리 배지 (조성: soluble starch 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, NaCl 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, CaCO_3 0.1%, 2% agar, pH = 6.0)에 도말 (spreading)한 후 30°C에서 3일간 배양하였다. 형성된 colony 중에서 배지 주위에 환이 생기는, 즉 amylase 활성이 높은 것으로 추측되는 colony를 우선적으로 선별하였으며, 액체배지에 다시 접종하여 여러번 계대 배양을 통하여 단일 균주를 분리하였다.

균주배양

분리한 amylase 생산균을 YMEB (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, distilled water 1.0 L) 배지 100 mL (in 500 mL baffle flask)에 30°C, 120 rpm에서 3일간 전 배양한 후, Mandel (rice straw 1.0 g, paper wastes 1.0 g, peptone 1.0 g, Urea 0.3 g, CaCl_2 0.3 g, KH_2PO_4 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg, CoCl_2 2.0 mg, distilled water 1.0 L, pH 6.0) 배지 100 mL (500 mL baffle flask)에 1% 접종하여 30°C, 120 rpm에서 5일간 본배양하였다. 5일 배양 후 얻은 조효소액은 효소활성 측정을 통하여 높은 amylase 활성을 갖는 균주를 선별하였다. 실험에 사용한 폐지와 벃짚은 다음과 같이 조제하였다. 폐지는 종이 box를 대략 1.5 × 1.5 cm 크기로 손으로 찢어서 Mixer로 3분 갈아서 사용하였고, 벃짚은 작두로 약 5 mm 크기로 잘라서 수돗물에 1일 정도 담근 후, 파쇄기 (고추가는 기계)로 3번 갈아서 80°C에서 72시간 건조과정을 거친 후 Mixer로 다시 2분 갈아서 사용하였다. 원소분석결과 폐지의 N 0.5% 미만, C 39.1%, H 5.90%이었고, 벃짚의 N 0.5% 미만, C 37.5%, H 5.31%이었다.

효소활성 측정

효소액의 제조: 멘델배지에 5일간 배양한 amylase 생산균과 *T. inhamatum* KSJ1 균주는 10,000 rpm, 10분 동안 원심분리 (Mega21R, Hanil R&D Co., Korea)하여 그 상등액을 효소활성 측정에 사용하였다.

α -amylase 활성: α -amylase의 활성 측정은 Thomas 등(11) 및 Ji 등(12)의 방법을 수정하여 1% 용해성 전분용액 0.8 mL에 50 mM citrate buffer (pH 4.8)로 희석되어진 효소액 0.2 mL을 혼합한 반응물을 시험관에 넣고 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS 방법(10)으로 측정하였다. DNS 방법은 50°C에서 30분간 반응시킨 반응물 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 첨가하여 100°C에서 5분간 반응시킨 후, 증류수 20 mL를 넣어 vortex mixer (G-560, Scientific industries INC., USA)로 희석하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 이는 D-glucose를 (0.5-2.0 mg/mL) 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다.

FPase 활성: FPase 활성도는 여과지 (filter paper, Watman No. 1)의 가수분해 능력으로 나타내었는데, 이는 50 mg (1 × 6 cm)의 여과지를 50 mM citrate buffer에 희석되어진 배양 상등액 1.0 mL과 혼합하여, 50°C에서 60분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법으로 정량하여 계산하였다.

기타 효소활성: Xylanase 활성도는 Gawande 등(13)의 방법에 따라, Avicelase 활성도는 Somogyi-Nelson 방법(11)으로, CMCase 활성도는 DNS방법으로, Gluco-amylase 활성도와 β -amylase 활성도는 glucose assay kit (Young Dong, Korea)로 정량하여 계산하였다.

α -amylase, FPase, CMCase, Gluco-amylase, β -amylase의 효소 활성도는 표준 반응 조건에서 1 mol/min의 글루코오스를 생성하는데 필요한 효소량을 1 U로 정의하였으며, Avicelase와 xylanase의 효소활성도는 표준 반응 조건에서 1umol/min의 셀로바이오스, 자일로스에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 U로 정의하였다.

음식물쓰레기 당화능력: 100 mL의 멘델배지 (탄소원은 1%의 벃짚과 1%의 폐지로 대체함)에서 30°C, 120 rpm에서 5일간 배양한 amylase 생산균 배양액 혹은 *T. inhamatum* KSJ1 배양액에 150 g의 습윤 음식물쓰레기를 첨가한 후 50°C, 150 rpm에서 2시간 효소당화반응 후 원심분리 (12,000 rpm, 10분)하여 그 상등액을 DNS 방법으로 생성된 환원당을 측정하여 두 균주의 당화능력을 비교하였다.

SEM (Scanning Electron Microscopy): *T. inhamatum* KSJ1과 amylase 생산균 15번 균주를 YMEA배지에 30°C, 120 rpm에서 3일간 배양한 후 7 × 7 mm 면적으로 채취하여 고정액 [2% Glutaraldehyde + 2% Paraformaldehyde in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)]에 담귀 4시간 반응시킨 후 cacodylate buffer로 20분씩 3회 세척하였다. 다음, OsO_4 in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)에 1시간 반응시킨 후 cacodylate buffer로 20분씩 3회 세척하였다. 그다음, 50%, 70%, 90%, 95% 에탄올에 각각 30분씩 탈수시킨 후, 100% 에탄올로 20분씩 2회 탈수시켰으며, isoanyl acetate 용액에 20분씩 2회 세척하고 임계점건조 후 gold coating하여 SEM

(Hitachi, S-2400, Japan)으로 관찰함으로써 두 균주의 형태학적 특징을 비교하였다.

결과 및 고찰

Amylase 생산균의 분리와 선별

Amylase 생산균주를 분리하기 위하여 제주도에서 채취한 토양시료를 균주 분리원으로 하였다. 균주 분리 배지는 가용성 전분을 탄소원으로 하는 고체배지를 조제하였다. 토양시료 1 g을 멸균수 50 mL에 현탁시킨 후 실온에서 15 분간 진탕하여 amylase 생산균 분리배지에 도말하여 30℃에서 3일간 배양하였으며, 생겨난 콜로니들 중에 전분이 분해된 환을 보이는, 즉 amylase를 많이 생성된 것으로 추측되는 20개 콜로니를 선별하여 액체배지에 30℃, 150 rpm, 3일간 다시 배양한 후 DNS 방법으로 α-amylase 효소활성을 측정하였다. 20개 균주 중 4, 6, 8, 9, 15번 균주의 α-amylase 효소활성은 0.445, 0.212, 0.184, 0.434, 0.286 U/mL-supernatant이었으며, 이 5개 균주를 amylase 생산균 균주로 1차적으로 선별하였다(Table 1). 이 5개 균주와 당 연구실에서 분리한 균주인 *T. inhamatum* KSJ1을 100 mL 멘델배지 (탄소원은 1%의 벳짚과 1%의 폐지를 사용함)에 각각 접종하여 30℃, 120 rpm, 5일간 배양한 후, FPase와 amylase 효소활성을 비교 측정하였다. 그 결과 amylase 생산균 6, 8, 9번 균주는 FPase와 amylase 활성이 거의 나타나지 않았으며, 4번균주와 15번 균주는 FPase 효소활성이 0.075, 0.133 U/mL, amylase 효소활성은 0.253, 2.302 U/mL이었다(Fig. 1). 1차적으로 선별한 amylase를 생산할 수 있는 균주인 4, 6, 8, 9, 15번 균주 중 15번 균주는 4번 균주보다 더욱 높은 amylase 효소활성을 보였으며 이는 기존에 당 실험실에서 분리한 *T. inhamatum* KSJ1 균주와 비슷한 효소활성을 보였다. 때문에 amylase 생산균 15번 균주를 실험구로 사용하여 *T. inhamatum* KSJ1와 음식물쓰레기의 당화능력을 비교하였다.

Amylase 생산균 15번 균주와 *T. inhamatum* KSJ1의 당화능력

본 연구에서는 기존에 분리한 *T. inhamatum* KSJ1보다 amylase 생산성이 더욱 월등한 균주를 분리하여 음식물쓰레기를 더욱 효과적으로 당화시킴으로써 생성된 당화액을 BC 생산에 이용하고자 하였다. 먼저 두 균주를 멘델배지 100 mL에 30℃, 120 rpm에서 5일간 배양한 후, 분쇄한 습윤 음식물쓰레기 150 g을 넣은 후 50℃에서 2시간 효소학적 당화반응을 시킨 후 DNS 방법으로 환원당을 측정함으로써 두 균주의 당화능력을 비교해보았다. 본 실험에서 사용된 음식물쓰레기는 전남대학교 학생식당의 잔밥을 이용하였으며, 이 음식물쓰레기는 물로 세척되어 나온 것이어서 염분의 작용을 고려하지 않았다. 음식물쓰레기는 파쇄기 (고추 가는 기계)로 2번 간 후 습윤상태 그대로 실험에 사용 하였다. 음식물쓰레기의 조성은 원소분석결과 N 1.56%, C 43.7%, H 6.52%이었으며, 함수율 (80℃에서 24시간 건조)은 73.3%이었다. DNS 방법으로 환원당을 측정한

결과 amylase 생산균 15번 균주는 38.1 g/L의 환원당이 생성되었으며, *T. inhamatum* KSJ1는 37.8 g/L의 환원당이 생성되어 두 균주의 당화능력은 거의 비슷하였다(Table 2).

Table 1. Amylase activities produced by 20 isolates in first screening

Candidate No.	Amylase activity (U/ml)
1	0.079
2	0.013
3	-0.056
4	0.445
5	0.140
6	0.212
7	-0.047
8	0.184
9	0.434
10	0.0076
11	-0.054
13	-0.032
14	-0.041
15	0.286
16	-0.039
17	0.037
19	-0.058
20	-0.044

Table 2. Comparison of saccharification ability to food wastes of isolate 15 and *T. inhamatum* KSJ1. The cultures solutions were obtained in 100 mL Mandel's medium (30℃, 120 rpm, 5 days)

	Enzyme activity (U/mL)		Reducing sugar concentration after Saccharification (g/L)
	Amylase activity	FPase activity	
<i>T. inhamatum</i> KSJ1	1.141	0.356	37.8
isolate 15	1.285	0.214	38.1

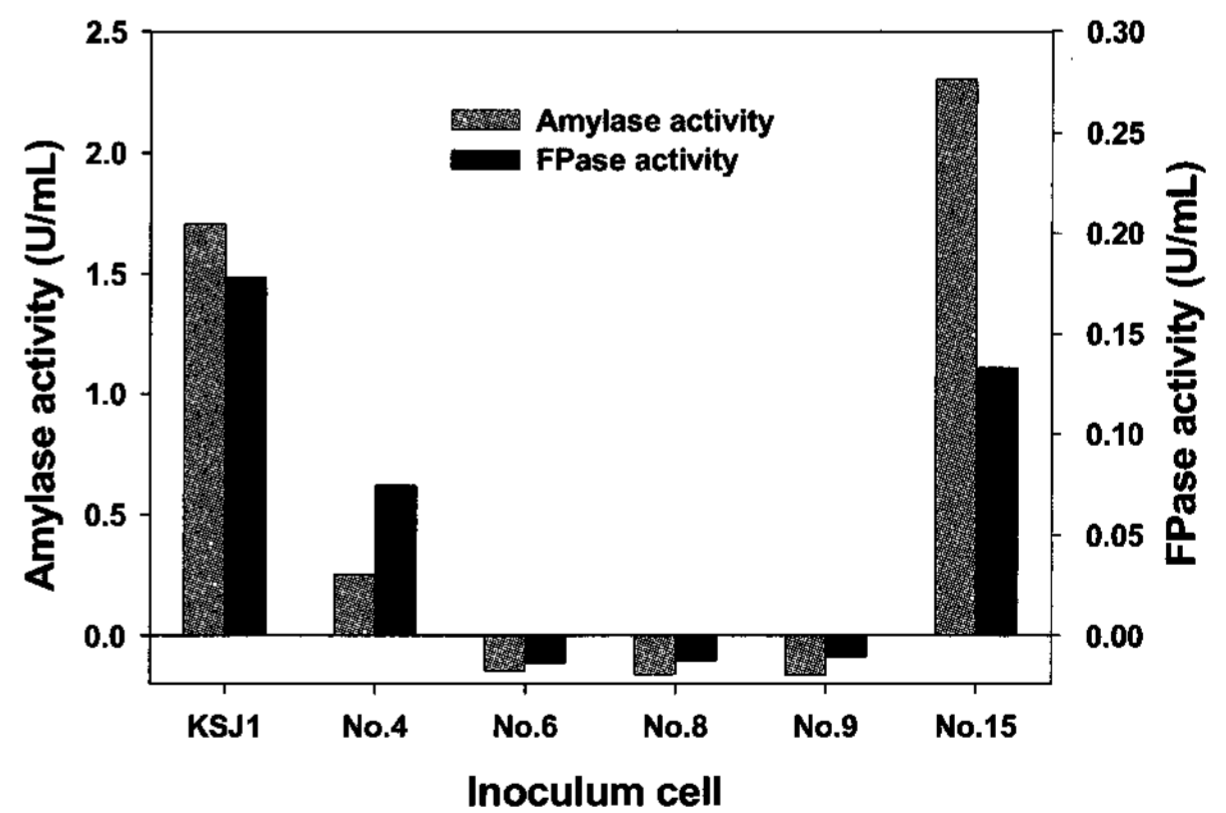


Figure 1. Amylase and FPase activities of several candidates in 100 mL Mandel's medium (30℃, 120 rpm, 5 days).

10 L 생물반응기에서의 amylase 생산균 15번 균주와 *T. inhamatum* KSJ1의 FPase, amylase 효소생산성

Flask level에서 amylase 생산균 15번 균주와 *T. inhamatum* KSJ1의 FPase와 amylase 효소활성은 비슷한 수준이었으며, 규모확대된 10 L 생물반응기에서는 어떠한 효소활성의 차이가 있을지 검토할 필요가 있다. 먼저 두 균주를 100 mL의 YMEB 배지 (in 500 mL baffle flask)에 30℃, 120 rpm에

서 3일간 전배양하였다. 두 균주의 섬유소분해효소의 생산성은 scale-up된 10 L 생물반응기 (BioG, Hanil R&D Co., Korea) 에서 수행하여 비교하였다. 실험에 사용된 생물반응기는 pH, 온도, 교반속도, 공기량, 용존산소 등 조절 및 제어가 가능하였다. 5 L 멘델배지 (탄소원은 1%의 벳짚과 1%의 폐지를 사용하였으며, 멘델배지의 초기 pH = 6.0으로 조절함)를 멸균한 후 전배양한 두 균주를 각각 2% 접종하여 30°C, 200 rpm, 0.6 vvm으로 교반 배양하였다. 12시간 간격으로 amylase, FPase의 효소활성을 측정하여 비교해본 결과, 3일 배양 후 amylase 생산균 15번 균주와 *T. inhamatum* KSJ1의 amylase 활성은 3.245 U/mL, 4.190 U/mL, FPase 활성은 각각 0.231 U/mL, 0.217 U/mL 이었다(Fig. 2). 전체 배양과정 중 두 균주의 FPase 활성은 거의 비슷하였으며, amylase 활성은 *T. inhamatum* KSJ1가 본 실험에서 분리한 amylase 생산균 15번 균주보다 약간 높은 활성을 보였다. 하지만 배양과정 중 *T. inhamatum* KSJ1가 생성한 거품의 유출로 인하여 배양액이 amylase 생산균 15번 균주보다 더욱 많이 줄어들어 결과적으로 두 균주가 생성한 amylase의 효소총량은 큰 차이가 없었으며, 두 균주의 amylase 효소생산성은 비슷한 수준이라 볼 수 있다.

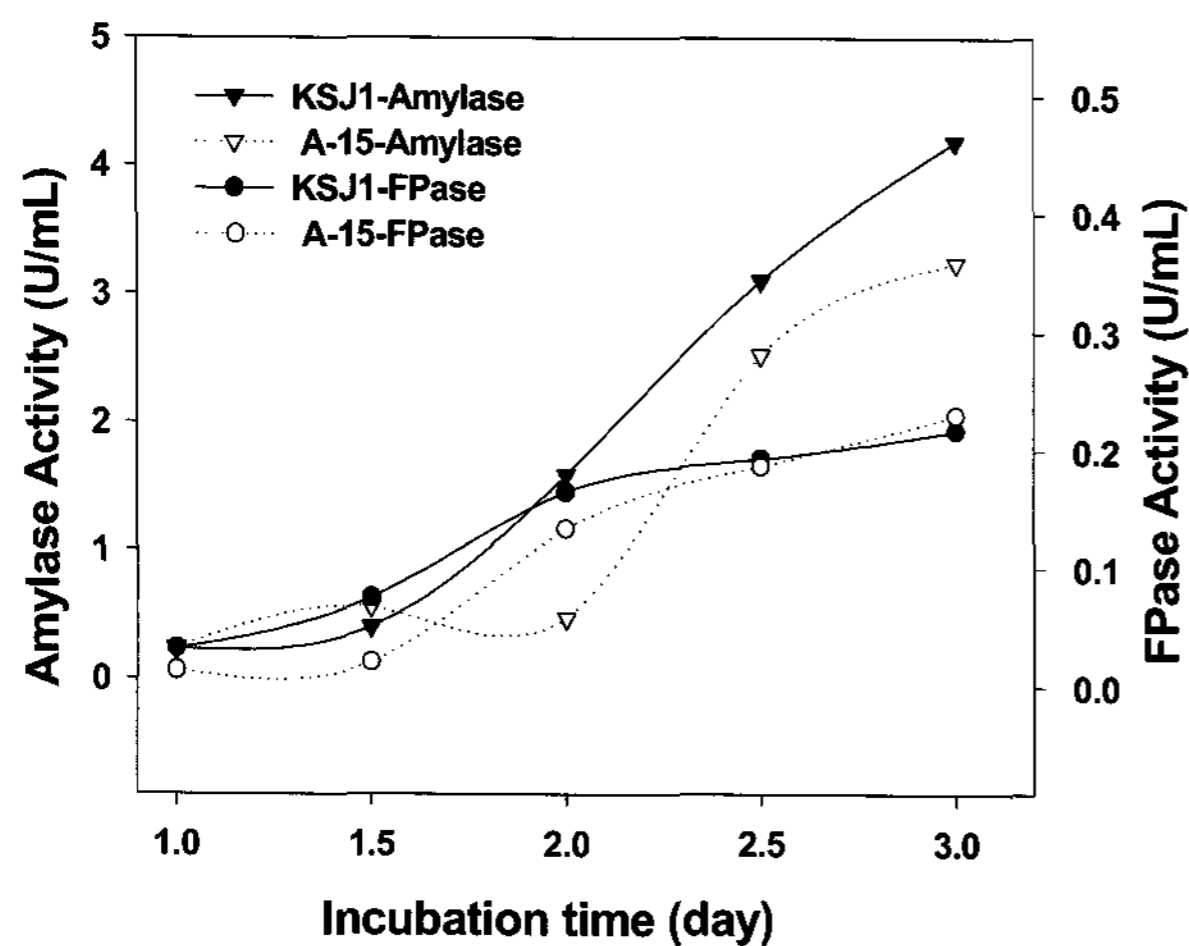


Figure 2. Time profiles of amylase and FPase activities produced by the isolate 15 and *T. inhamatum* KSJ1 in 10 L jar fermenter with 5 L Mandel's medium (30°C, 200 rpm, 0.6 vvm, 3 days).

Amylase 생산균 15번 균주와 *T. inhamatum* KSJ1의 여러 가지 효소활성 비교

Flask level에서 두 균주의 FPase, amylase 효소활성과 음식물쓰레기 당화능력은 거의 비슷하였으며, 규모 확대된 10 L 생물반응기에서도 두 균주의 효소활성은 거의 같아서 서로 다른 균인지 확인하기 위하여 xylanase, avicelase, CMCCase, Gluco-amylase, β -amylase의 효소활성도 비교 검토하였다. 100 mL 멘델배지에서 두 균주를 30°C, 120 rpm, 5 일 배양한 후 얻은 조효소액을 10,000 rpm에서 10분 원심 분리하여 그 상등액을 효소활성 측정에 사용하였다. 그 결과, 두 균주의 FPase, amylase, xylanase, avicelase, CMCCase, Gluco-amylase, β -amylase의 효소활성은 거의 비슷하였다 (Table 3).

Table 3. Comparison of cellulolytic and amylolytic enzymes produced by the isolate 15 and *T. inhamatum* KSJ1 in 100 mL Mandel's medium (30°C, 120 rpm, 5 days)

Enzyme activity	KSJ1	isolate 15
α -amylase activity (U/mL)	1.30	1.20
FPase activity (U/mL)	0.30	0.25
Xylanase activity (U/mL)	19.56	20.09
Avicelase activity (U/mL)	0.008	0.006
CMCase activity (U/mL)	3.64	3.15
Gluco-amylase activity (U/mL)	0.76	0.70
β -amylase activity (U/mL)	2.39	2.40

Amylase 생산균 15번 균주와 *T. inhamatum* KSJ1의 형태학적 특징

T. inhamatum KSJ1와 amylase 생산균 15번 균주의 amylase 생산성은 100 mL flask level과 10 L 생물반응기에서 거의 비슷하였으며, 100 mL flask에서 두 균주의 음식물쓰레기 당화능력 및 xylanase, avicelase, CMCCase, Gluco-amylase, β -amylase 효소활성도 비슷한 수준이었다. 그리하여 두 균주가 서로 다른 균주인지 확인하기 위하여 YMEA 배지에 두 균주를 접종하여 30°C에서 3일간 배양한 후 광학현미경과 SEM (Scanning Electron Microscopy) 사진을 통하여 그 형태학적 특징을 비교하였다. 광학현미경으로 관찰한 결과 *T. inhamatum* KSJ1는 녹색을 띠는 사상균이었고, amylase 생산균 15번 균주는 황색빛을 띠는 사상균으로 두 균주의 형태적 모양은 흡사하였으나 색깔은 차이를 보였다(Fig. 3). 이는 YMEA 고체 배지에 두 균주를 배양하였을 때 amylase 생산균 15번 균주는 황색빛, *T. inhamatum* KSJ1는 녹색빛을 띠는 특징과 비슷한 차이를 보여 동일 속에 속한다고 사료된다. 그리고 SEM 사진을 통하여 이 두 균주의 형태학적 차이를 비교해 본 결과 거의 비슷한 형태학적 특징을 보였다.

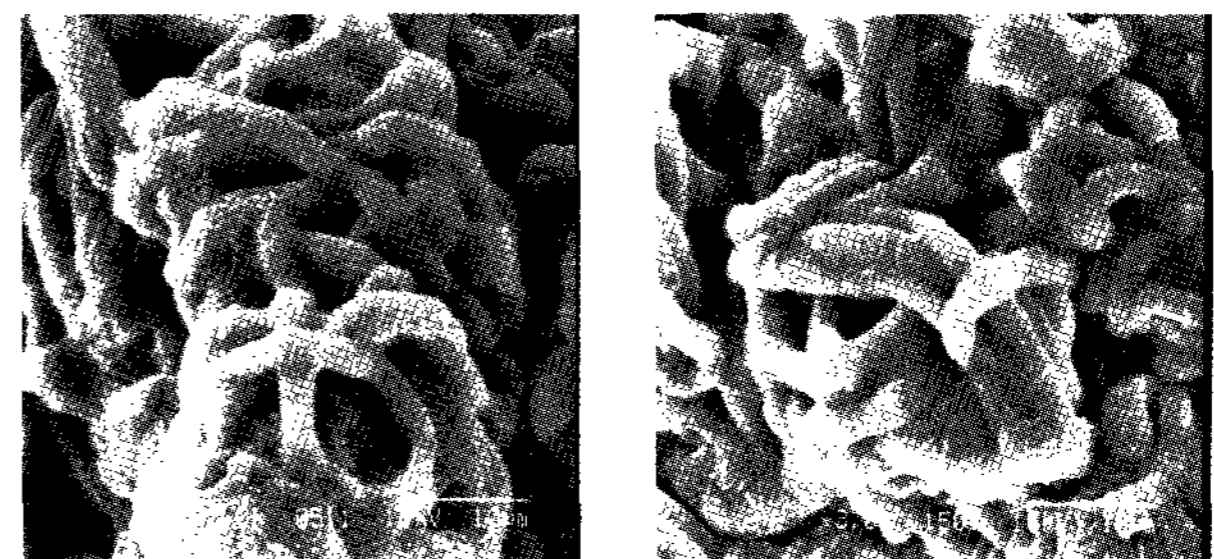


Figure 3. Morphology of *T. inhamatum* KSJ1 (A) and isolate 15 (B) observed by SEM.

요 약

제주도 토양 샘플에서 분리한 amylase 생산균 15번 균주는 100 mL flask level과 10 L 생물반응기에서 *T. inhamatum* KSJ1의 FPase, amylase 효소활성과 거의 비슷하였으며, flask level에서 두 균주의 xylanase, avicelase, CMCCase, Gluco-amylase, β -amylase의 효소활성 및 음식물쓰레기의 당화능력도 모두 거의 비슷하였다. 두 균주를 YMEA 고체배지와 광학현미경으로 그 형태학적 특징을 관

찰한 결과 *T. inhamatum* KSJ1이 녹색빛을 띠는 것과는 달리 amylase 생산균 15번 균주는 황색빛을 띠는 사상균으로 확인되었으며, 두 균주는 동일한 균은 아니지만 동일한 속으로 사료된다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업 및 post-BK 사업지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Henrissat, B. (1991), A classification of glycosylhydrolases based on amino-acid sequence similarities, *Biochem. J.* **280**, 309-316.
2. Akher, M., M. A. Leithy, M. K. Massafy, and S. A. Kasim (1973), Optimal conditions of the production of bacterial amylase, *Zentralbl. Bakteriol., Parasiten K., Infektionskr. Hyg* **2** **128**(5-6), 483-490.
3. Ellaiah, P., K. Adinarayana, Y. Bhavani, P. Padmaja, and B. Srinivasulu (2002), Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a new isolated *Aspergillus* species, *Process Biochemistry* **38**, 615-620.
4. Nigam, P. and D. Singh (1995), Enzymes and microbial system involved in starch processing, *Enzyme. Microb. Technol.* **17**, 770-778.
5. Gigras, P., V. Sahai, and R. Gupta (2002), Statistical media optimization and production of ITS α -amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor, *Current Microbiol.* **45**, 203-208.
6. Ghosh, S. B. and A. K. Chandra (1984), Nutritional requirements and cultural characteristics of *Bacillus apiarius* CBML-152 for the production of thermostable alpha amylase, *Zbl. Mikrobiol.* **139**, 293-304.
7. McMahon, H. E. M., C. T. Kelly, and W. M. Fogarty (1999), High maltose producing amylolytic system of a *Streptomyces* sp, *Biotechnol. Lett.* **21**, 23-26.
8. Pederson, H. and J. Nielsen (2000), The influence of nitrogen sources on the alpha amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures, *Appl. Microbial Biotechnol.* **53**(3), 278-281.
9. Kim, K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, Y. W. Lee, S. Y. Chung, and S. J. Kim (2002), Optimization for the production of cellulolytic enzymes of a fungus, strain FJ1 by response surface methodology, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 195-202.
10. Song, H. J., J. H. Seo, G. S. Cha, and S. J. Kim (2006), Production of bacterial cellulose using saccharified food wastes in 50-L air circulation bioreactor, *J. Kor. Soc. Urban Environ.* **6**(2), 21-27.
11. Thomas, M. W. and K. M. Bhat (1988), Methods for measuring cellulase activities, *Methods Enzymol.* **160**, 87-112.
12. Ji, G. E., H. K. Han, S. W. Yun, and S. L. Rhim (1992), Isolation of amylolytic bifidobacterium sp. Int-5 and characterization of amylase, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**(2), 85-91.
13. Gawande, P. V. and M. Y. Kamat (1998), Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100, *J. Biotechnol.* **66**(2-3), 165-175.