

Xylanase와 Mannanase를 생산하는 *Aspergillus niger*의 분리와 동정에 관한 연구

김병석* · 조진국** · 송진욱** · 이학교** · 황성구**

한국효소(주)*, Hankyong National University**

Studies on the Isolation and Identification of Xylanase and Mannanase Producing *Aspergillus niger*

Byoung Suk Kim*, Jin Kook Cho**, Jin Ook Song**, Hak Kyo Lee** and Seong Gu Hwang**

Korea Enzyme Co., Ltd.*, Hankyong National University**

ABSTRACT

This study was undertaken to screen a high xylanase and mannanase producing microbes. In the first experiment, screening was undertaken against 50 samples of microorganisms having xylanase and mannanase activities from soil and fallen leaves. The screening process has focused on picking out fungi having high xylanase and mannanase activities under the solid-state fermentation. The xylanase and mannanase activities of 6 screened microbes were 0.9~1.6 unit/mL and 0.2~0.4 unit/mL, respectively, under the submerged fermentation condition. However, under the solid-state fermentation, xylanase and mannanase activities were 103.7~220.0 unit/g and 20.1~40.3 unit/g, respectively. Finally one microbe (E-3) was selected and its xylanase and mannanase activities were 197.3 unit/g and 39.9 unit/g, respectively. The morphological and molecular biological classification of E-3 showed 99% homology with the *Aspergillus niger*.

(Key words : *Aspergillus niger*, Xylanase, Mannanase)

I. 서 론

효소제는 가축의 영양학적 이용성을 증진시킬 뿐만 아니라 안전성이 높은 축산물을 생산하고자 사료에 지속적으로 첨가되고 있으며, 반추동물뿐만 아니라 가금, 돼지같은 단위동물사료에도 꾸준히 사용되고 있다(Graham와 Balnave, 1995).

사료에 효소제를 첨가하였을 때, 돼지의 증체량, 소화율, 생산성이 증가하며(한, 1992; 권 등, 2003; 심 등, 2003; 김 등, 2006), 이스라엘 잉어의 성장에도 영향을 미치고(노 등, 1994), 가금의 증체량, 사료섭취량, 사료효율도 증가한다(한과 민, 1991)고 한다.

한편 xylose와 mannan은 식물세포벽에 존재하는 난분해성 탄수화물인 헤미셀룰로오스의 주요 성분이다. 난분해성 탄수화물은 반추동물을 제외한 가금, 돼지같은 단위동물에서 소화되지 않으며, 장내점도를 증가시키는 원인이 되어 소화관 내에서 다른 영양소의 흡수를 방해한다(Burnett, 1966; White, 1981; McCracken 등, 2001).

따라서 헤미셀룰로오스 분해효소인 xylanase와 mannanase를 효소제로 동시에 활용할 경우 육계의 소화율이 증가하고(Berg, 1959), 돼지의 영양소 흡수 방해가 감소하며(Chesson, 1987), 장내 점질도를 저하시키는 기능을 함으로서 소화기 질병을 예방하고(Campbell과 Bedford, 1992), 가축생산성의 증대, 사료효율의 증대 및 환경오염의 저감효과(Castanon 등, 1997)를 기대할 수 있을 것이다.

본 연구는 가축의 생산성 및 사료효율의 증대를 위한 헤미셀룰로오스 분해효소인 xylanase과 mannanase를 산업적으로 생산하기 위하여 효소의 활성이 좋은 균주를 선발할 목적으로 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주의 선별

Xylanase와 mannanase 효소활성이 우수한 균주를 분리하기 위하여 토양 및 낙엽 등에서 수집한 시료 각 15g을 멸

Corresponding author : Seong Gu Hwang, Hankyong National University, Anseong 450-149, Korea. Tel: 82-31-670-5121, Fax: 82-31-670-5491, E-mail: sghwang@hknu.ac.kr

균된 증류수에 연속희석한 후 2% agar가 함유된 czapek agar (NaNO₃ 1g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.0004 g/L, Peptone 5 g/L, Glucose 30 g/L; pH 5.0) plate에 도말하고 30°C에서 72시간 이상 배양하여 고체배양에 가장 유리한 성장조건을 가진 곰팡이 위주로 1차 선별하였다.

1차 선별된 균주로부터 xylanase, mannanase를 생산하는 미생물분리를 위해 xylanase 생성균주 선별배지 (xylanase screening medium: Xylan 10g/L, Yeast extract 5 g/L, Bactopeptone 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, Agar 15 g/L; pH 5.0)에서 30°C에서 72시간 배양한 후 oat spelt xylan의 분해능을 가진 균주를 선별하였으며, mannanase 생성균주 선별배지 [mannanase screening medium: Locust bean gum (LBG) 10 g/L, Yeast extract 3 g/L, Peptone 5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, Agar 20 g/L; pH 5.0]에 colony를 도말하여, 30°C에서 72시간 이상 배양하여 clear zone이 생기는 균주를 2차 선별하였다.

2차 선별된 균주를 500 mL 용량의 erlenmeyer flask에 czapek broth (pH 5.0)로 30°C, 150rpm, 72시간 이상 배양하여 그 배양액을 5,000 rpm, 10분간 원심분리 후 상등액을 취하여, xylanase와 mannanase의 효소활성을 측정하였다.

액상배양에서 우수한 효소활성을 가지고 있는 균주를 wheat bran 기본배지 (wheat bran 50%, water 50%)에 30°C, 150 rpm, 72시간 이상 고상배양하여 효소활성을 측정하여 상대적으로 우수한 균주를 최종 선별하였다.

2. 액체배지 배양시의 조효소액

선별된 균주의 효소활성 측정을 위해 배양된 액체배지를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

3. 고체배지 배양시의 조효소액

효소활성 측정을 위해 균주가 배양된 wheat bran 기본배지를 1 mm 거름망에 통과하도록 분쇄하여 시료를 제작한 후, 제작된 시료 15 g에 0.2M acetate-acetate buffer (pH 4.8)를 첨가한 후 최종량을 300 mL로 하여, 1시간 동안 150 rpm으로 교반 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다.

4. Xylanase 활성측정

Xylanase 활성은 oat spelt xylan을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법 (Miller, 1959)으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1% (w/v) oat spelt xylan 용액 1 mL

와 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0)로 희석한 효소용액 1 mL와 혼합하여 50°C에서 10분 동안 반응시켰다. DNS 용액 2 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xylose를 표준시료로 사용하여 농도별 용액을 만든 후 동일 조건으로 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit은 위의 조건에서 1분 동안 oat spelt xylan으로부터 1 μM의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다 (Khasin 등, 1993).

5. Mannanase 활성측정

Mannanase 활성은 LBG을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 DNS 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1% (w/v) LBG 용액 1 mL와 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0)로 희석한 효소용액 1 mL와 혼합하여 50°C에서 10분 동안 반응시켰다. DNS 용액 2 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mannose를 표준시료로 사용하여 농도별 용액을 만든 후 동일 조건으로 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit은 위의 조건에서 1분 동안 LBG로부터 1 μM의 mannanose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

6. 분리균주의 형태학적 동정

선발된 우수균주를 대상으로 형태학적 동정을 실시하였다. 0.6% agar이 첨가된 czapek agar medium (pH 5.0)에 30°C에서 3일간 배양하여, colony, conidia, conidiophore, conidial heads, sterigmata, vesicles의 형태와 색깔, 특징을 microscope photogram으로 측정하여 그 결과를 Barron (1968)과 Arx (1970)의 방법에 따라 확인하였다.

7. 분리균주의 분자생물학적 동정

선발된 균주를 czapek broth에서 배양하여 원심분리한 후 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 동결건조하여 동결건조된 균체를 액체질소를 이용하여 마쇄하고 25 mg을 취하여 500 μL lysis buffer [400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM EDTA (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% SDS]를 10분간 실온에서 반응시켰다. 이 반응액에 150 μL potassium acetate 용액 [5 M Potassium acetate (pH 4.8) 60 mL, Glacial acetic acid 11.5 mL, D.W. 28.5 mL]를 첨가하여 교반한 후 10,000×g로

2분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액으로부터 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출한 다음 primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 LR5 (5'-TCCT-GAGGGAAACTTCG-3')를 사용하여 denaturation 95°C/1분, annealing 52°C/1분, extension 72°C/1분, termination extension 72°C/10분의 조건으로 30 cycle 동안 PCR (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Co., USA)을 수행하였다. 0.8% agarose gel 전기영동을 통하여 band를 확인하고 AccuPrep PCR Purification kit (Bioneer Corp., Daejeon, Korea)로 정제하였다. 정제된 PCR product를 Automatic DNA sequencer (ABI3700, Applied Biosystems Inc., Foster, CA, USA)로 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 시에는 primer ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)와 ITS4 (TCCTCCGCTTAT-TGATATGC)를 사용하였다. 이 후 Clustal X (ver.1.83) 프로그램을 이용하여 염기서열을 조합하여 The National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 제공하는 Advanced Blast Search 프로그램을 통하여 GenBank의 염기서열과 비교함으로써 진균의 유전자동정을 하였다. 선발된 균주들의 분자생물학적 동정을 통하여 사료첨가제로서의 안전성을 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 선별

토양 및 낙엽 등을 수집하여 균 분리를 위한 시료로 사용하였고, 미생물을 선별할 때 고상 배양에 용이한 곰팡이 위주로 선별하였다. 곰팡이 균주의 선별은 czapek agar plate상에 형성된 colony의 형태와 크기에 따라 선별하였다. 그 결과 약 50여주의 균주를 분리 선별하였다.

1차 선별된 균주로부터 xylanase, mannanase를 생산하는 미생물분리를 위해 xylanase 생성균주 선별배지, mannanase 생성균주 선별배지에 single colony를 접종한 후 30°C에서 72시간 배양하여 clear zone이 생기는 균주를 2차 선별한 결과, 15종의 균주가 2차 선별되었다 (Table 1).

2차 선별된 15종의 균주를 개별적으로 배양하여, DNS 방법을 활용하여 xylanase, mannanase의 효소활성을 측정하여 6종의 균주를 선별하였고 재검증을 위하여 효소활성을 가지고 있는 6종의 균주를 500 mL 용량의 erlenmeyer flask로 배양하여 원심분리 후 배양상등액을 취하여 효소활성을 측정하여 결과를 Table 2에 나타내었다. 대체로 2가지 효소활성을 모두 가지고 있으나, C-8 균주가 1.6 unit/mL의 가장 높은 xylanase activity을 보였으며, C-5 균주가 0.4 unit/mL의 높은 mannanase activity를 보였고, E-3 균주는 xylanase, mannanase activity가 각각 1.3unit/mL, 0.3unit/mL

Table 1. Enzyme activities of screened microorganism¹⁾

Strain	Enzyme activity ²⁾	
	Xylanase	Mannanase
A-1	+ ³⁾	+
A-5	+	+
B-4	++ ⁴⁾	+
B-6	+	+
B-11	+	++
B-13	++	+
C-2	+	+
C-5	+	++
C-8	++	+
D-1	+	+
D-5	+	+
D-6	+	+
E-3	++	++
E-5	+	+
E-9	+	+

¹⁾ Screening was undertaken against 50 samples of microorganism having xylanase and mannanase activities from soil or fallen leaves cultured on czapek agar (2% agar; pH 5.0) plate at 30°C for 3 days.

²⁾ Represent size of clear zone.

³⁾ + : Represents above 10 mm clear zone forming on xylanase screening medium or mannanase screening medium.

⁴⁾ ++ : Represents above 20 mm clear zone forming on xylanase screening medium or mannanase screening medium.

Table 2. The enzyme activities of various screened fungal strains under submerged culture condition¹⁾

Strain	Enzyme activity (means±SD ²⁾ unit/mL)	
	Xylanase	Mannanase
B-4	1.5±0.2	0.2±0.1
B-11	0.9±0.1	0.3±0.1
B-13	1.3±0.1	0.2±0.1
C-5	1.0±0.1	0.4±0.1
C-8	1.6±0.2	0.2±0.1
E-3	1.3±0.1	0.3±0.1

¹⁾ All the screened strains were cultured on czapek broth at 30°C for 7 days.

²⁾ SD: standard deviation.

으로 모두 우수하게 나타났다.

2. 선별 균주의 검증

액상배양에서 가장 우수한 효소활성을 가지고 있는 3균주를 선발하여 고상배양 효소활성을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 고상배양에서도 xylanase activity는 C-8 균주 (220.0 unit/g)가, mannanase activity는 C-5 균주 (40.3 unit/g)가 가장 우수하였으나, E-3 균주는 xylanase, mannanase activity가 각각 197.3 unit/g, 39.9 unit/g으로 모두 우수한 결과를 나타내어 최종적으로 E-3 균주를 선발하였다.

E-3 균주의 효소활성은 이 등 (2005)이 보고한 *Streptomyces* sp. WL-2의 xylanase의 효소활성인 117.3 unit/mL 보다 높았으며, 오 등 (2002)이 보고한 *Bacillus* sp. WL-3의 mannanase의 효소활성인 35.7 unit/mL 보다 높게 나타났다. 또한 이것은 한 종의 균주가 두 가지 효소의 활성을 가진다는 것에 커다란 의미가 있다.

Table 3. The enzyme activities of various screened fungal strains under solid-state fermentation condition¹⁾

Strain	Enzyme activity (means±SD ²⁾ unit/g)	
	Xylanase	Mannanase
C-5	103.7±2.1	40.3±1.5
C-8	220.0±3.0	20.1±1.1
E-3	197.3±2.6	39.9±1.2

¹⁾ All the screened strains were cultured on wheat bran medium with 50% moisture contents at 30°C for 3 days.

²⁾ SD: standard deviation.

Table 4. Morphological characteristics of the E-3 strain

Classification	Form	Remarks
Conidia	Globose	Diameter 3.0 ~ 5.0µm
	/Elliptical smooth	
	/Slightly rough /Black or brown black	
Conidiophore	Yellow brown	Length 1.0 ~ 1.5mm
	/Smooth	Diameter 2.0 ~ 20.0µm
Conidial head	Black or brown black	Diameter 200 ~ 300µm
Sterigmata	Two series	Diameter 5.5 ~ 10.0µm
		/3.0 ~ 4.0µm
Vesicles	Globose	Diameter 25.0 ~ 50.0µm
	/Light brown or black	

3. 분리균주의 형태학적 동정

선발된 우수 균주인 E-3를 대상으로 형태학적 동정을 실시하였다. Czapek agar medium에 30°C/3일 배양한 결과, colony의 색깔은 흰색에서 갈색, 검은색으로 변화하였으며, conidia는 대체로 둥근 형태에 3.0~5.0 µm이며, conidiophore는 옅은 갈색에 길이는 1.0~1.5 mm, 직경은 2.0~20.0 µm이고, conidial head는 검거나 검은 갈색에 직경은 200~300 µm이며, sterigmata는 두 가지 형태이며, 첫 번째는 직경 5.5~10.0 µm, 두 번째는 3.0~4.0 µm이었다. Vesicle은 둥근형태에 밝은 갈색을 띠고 있으며, 직경은 25.0~50.0 µm이었다. 이러한 특징을 고려한 결과 분리된 균주는 *Aspergillus niger*로 동정되었다 (Fig. 1, Table 4).

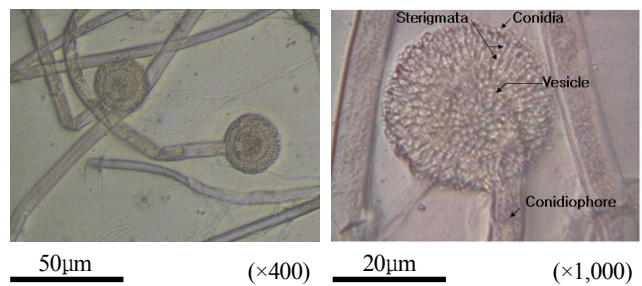


Fig. 1. Microscope photograph of the E-3 strain.

4. 분리균주의 분자생물학적 동정

3차 선발 과정을 통하여 최종 선발되어진 E-3 균주에 대한 균 동정의 일환으로 18S와 28S rDNA의 염기서열을 분석하였다. 분석 결과 582 bp 크기의 18S rDNA 사이의 internal space region의 염기서열을 얻었으며, Genbank 염기서열을 분석한 결과 *Aspergillus niger*와 99% 일치하는 결과를 나타내었다 (Fig. 2).

```

Query   4 CTGGCAG-CCCCGCCTCAAGAAATCAA*CTCCACTTGC*GATACGGTCGATCAGGGGTATCA
Sbjct  58 CTGGCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAA-TCCACTTGC*GATACGGTCGATCAGGGGTATCA

Query   63 ATGCTTCTCGGAGACTTCGCATCTTTGGGGCCAATACGCGCCCTTGT*TTTCTCTGGCAA*
Sbjct  117 ATGCTTCTCGGAGACTTCGCATCTTTGGGGCCAATACGCGCCGTTCTTTTCTCTGGCAA

Query   123 CAAATCGGCCATCTCCCCTGATGTTCTGCCGGATGCCATGTCACTTTCGCCCAGGTTCT
Sbjct  177 CAAATCGGCCATCTCCCCTGATGTTCTGCCGGATGCCATGTCACTTTCGCCCAGGTTCT

Query   183 CTCCCGCCATGGAGCACGGTATCCGACCGACTCCAAGGG*AAAGAAATACTCCGCT*GTCAT
Sbjct  237 CTCCCGCCATGGAGCACGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCCGCTCTCAT

Query   243 CGAGGAGATCCAGCAGAACGCGACAACCTTCGAGGGGAAATATGCCTTCTGAAGACATA
Sbjct  297 CGAGGAGATCCAGCAGAACGCGACAACCTTCGAGGGGAAATATGCCTTCTGAAGACATA

Query   303 CAACTACAGCCTGGGCGCGGATGAT*CTGACTCCCTTCGGAGAGCAGGAGCTGGTCAACTC
Sbjct  357 CAACTACAGCCTGGGCGCGGATGACCTGACTCCCTTCGGAGAGCAGGAGCTGGTCAACTC

Query   363 CGGCGTCAAGTTCTACCAGCGATACGAATCGCTCACAAGAAACATTGTCCCGTTCATCCG
Sbjct  417 CGGCGTCAAGTTCTACCAGCGATACGAATCGCTCACAAGAAACATTGTCCCGTTCATCCG

Query   423 ATCCTCAGGCTCCA*ACCGCGTGATTGCCTCTGGCAATAAATTCATCGAGGGCTTCCAGAG
Sbjct  477 ATCCTCAGGCTCCAGCCGCGTGATTGCCTCTGGCAATAAATTCATCGAGGGCTTCCAGAG

Query   483 CACTAAGCTGAAGGATCCTCGTGCCAGCC*AGGCCAATCGTCGCCAAGA*CCGACGTGGT
Sbjct  537 CACTAAGCTGAAGGATCCTCGTGCCAGCCCGGCCAATCGTCGCCAAGATCGACGTGGT

Query   543 CATTTCAGAGGCCAGCACATCCAACAACACTCTCGATCCG
Sbjct  597 CATTTCAGAGGCCAGCACATCCAACAACACTCTCGATCCG
    
```

Fig. 2. 18S ribosomal DNA sequence of the E-3 strain.

* Different DNA base of E-3 from whole DNA sequence of *Aspergillus niger* gene.

IV. 요약

본 연구에서는 xylanase, mannanase를 생산하는 미생물균주를 분리하기 위해 1차로 토양 및 낙엽 등에서 곰팡이 균주를 약 50여 주 분리하였으며, 1차 선발된 균주로부터 xylanase, mannanase를 생산하는 미생물 분리를 위해 xylanase 생성균주 선별배지, mannanase 생성균주 선별배지에 single colony를 접종한 후 clear zone이 생기는 15종의 균주를 2차 선발하였다. 2차 선발된 균주를 개별적으로 배양하여, DNS 방법을 활용하여 xylanase, mannanase 효소활성을 측정하여 6종의 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 액상배양에서 생산한 xylanase, mannanase 효소활성이 각각 0.9~1.6 unit/mL, 0.2~0.4 unit/mL 범위로 나타났다. 이

중 결과가 좋은 3종을 선정하여 고상배양으로 배양한 균주의 xylanase, mannanase 효소활성은 각각 103.7~220.0 unit/g, 20.1~40.3 unit/g으로 분석되었다. 선발된 3종의 균주 중 xylanase, mannanase 효소활성이 각각 197.3 unit/g, 39.9 unit/g으로 가장 높은 E-3 균주를 최종적으로 선발하였다. 최종으로 분리한 E-3 균주는 형태학적 특징과 DNA 염기서열을 비교한 결과 *Aspergillus niger*와 99% 일치하였다.

V. 사 사

본 연구는 경기도 고품질친환경농축산물생산기술연구센터 (GRRC)의 연구비 지원으로 연구되었으며 이에 감사드립니다.

VI. 인 용 문 헌

1. Arx, J. A. von. 1970. The genera of fungi sporulating in pure culture. pp. 288. Lehre; J. Cramer.
 2. Barron, G. L. 1968. The Genera of Hyphomycetes from Soil. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 3. Berg, L. R. 1959. Enzyme supplementation of barley diets for laying hens. Poultry Sci. 8:11-32.
 4. Burnett, G. S. 1966. Studies of viscosity as the probable factor involved in the improvement of certain barely for chicken by enzyme supplementation. Brit. Poult. Sci. 7:55-75.
 5. Campbell, G. L. and Bedford, M. R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. Can. J. Anim. Sci. 72:449-453.
 6. Castanon, J. I. R., Flores, M. P. and Petterson, D. 1997. Mode of degradation of non-starch polysaccharides by feed enzyme preparations. Anim. Feed Sci. Technol. 68:361-365.
 7. Chesson, A. 1987. Supplementary enzymes to improve the utilization of pig and poultry diets. pp. 71~89. Recent Advances in Animal Nutrition. (Editors ; Haresign, W. and D. J. A. Cole). Butterworths, London.
 8. Graham, H. and Balnave, D. 1995. Dietary enzyme for increasing enzyme availability. pp. 295-309. Biotechnology in Animal Feeds and Animal feeding (Editors ; R. J. Wallace and A. Chesson). Weinheim, Germany.
 9. Khasin, A., Alchanati, I. and Shoham, Y. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus strearothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 59:1725-1730
 10. McCracken, K. J., Bedford, M. R. and Stewart, R. A. 2001. Effect of variety, the 1B/1R translocation and xylanase supplementation on nutritive value of wheat for broilers. British Poultry Science. 42:638-642.
 11. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.
 12. White, W. B. 1981. An instrument suitable for viscosity determination of chick intestinal fluids. Poultry Sci. 60:1017-1021.
 13. 권오석, 김인호, 이상환, 홍종욱, 김지훈, 문태현, 이지훈. 2003. 자돈 및 육성돈에 있어 α -1,6-galactosidase와 β -1,4-mannanase의 사료내 첨가가 성장 및 영양소 소화율에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지. 45:211-218.
 14. 김혜진, 민병준, 조진호, 진영걸, 유종상, 김인호, 장정순, 이윤교. 2006. 갯벌 미생물 유래 단백질 분해 효소제의 급여가 비육돈의 생산성, 아미노산 소화율, 혈액성상, 육질특성 및 분내 휘발성 지방산과 $\text{NH}_3\text{-N}$ 함량에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지. 48:49-58.
 15. 노선호, 한인규, 원태희, 최윤재. 1994. 항생제, 효소제, 효모제 및 생균제가 이스라엘 잉어의 성장에 미치는 영향. 한국축산학회지. 36:480-486.
 16. 심영호, 채병조, 이지훈. 2003. 탄수화물 분해 복합효소제와 미생물 파이테이즈의 첨가가 육성돈의 생산성 및 영양소 소화율에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지. 45:569-576.
 17. 오영필, 이정민, 조기행, 윤기홍. 2002. Mannanase를 생산하는 *Bacillus* sp. WL-3 균주의 분리와 효소 생산성. 한국미생물생명공학회지. 30:247-252.
 18. 이은희, 김창진, 윤기홍. 2005. Xylanase 생산균 *Sterptomyces* sp. WL-2의 특성과 효소 생산성. 한국미생물생명공학회지. 33:178-183.
 19. 한인규, 민태선. 1991. 복합효소제 (KEMZYME)의 첨가가 유계에 미치는 효과에 관한 연구. 한국영양사료학회지. 15:9-13.
 20. 한인규. 1992. 단위가축에 대한 항생제, 생균제 및 효소제의 성장촉진효과와 작용기전. 한국영양사료학회주최 1992년도 영양사료 기술세미나집. pp. 61-74.
- (접수일자 : 2009. 8. 4. / 수정일자 : 2009. 10. 20. / 채택일자 : 2009. 10. 21.)