

## 초식동물 배설물로부터 분리한 *Bacillus* sp. H9-1의 섬유소 분해효소생산 최적화

윤영미<sup>1\*</sup>, 안기홍<sup>1</sup>, 김중곤<sup>2</sup>, 차영록<sup>1</sup>, 박유리<sup>1</sup>, 안종웅<sup>1</sup>, 문윤호<sup>1</sup>, 안승현<sup>1</sup>, 구본철<sup>1</sup>, 박광근<sup>1</sup>

### Optimization of Cellulolytic Enzyme Production for newly isolated *Bacillus* sp. H9-1 from Herbivore Feces

Young Mi Yoon<sup>1\*</sup>, Gi Hong An<sup>1</sup>, Jung Kon Kim<sup>2</sup>, Young-Lok Cha<sup>1</sup>, Yu Ri Park<sup>1</sup>, Jong-Woong Ahn<sup>1</sup>, Youn-Ho Moon<sup>1</sup>, Seung-Hyun Ahn<sup>1</sup>, Bon-Cheol Koo<sup>1</sup>, and Kwang-Geun Park<sup>1</sup>

접수: 2012년 11월 28일 / 게재승인: 2013년 1월 15일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** This study was performed to find cellulolytic strain of enzymatic saccharification for bioethanol production. Cellulolytic strains were isolated from 59 different feces of herbivores from Seoul Grand Park located in Gwacheon Gyeonggi-Do. The cellulolytic strain was selected by congo red staining and DNS method. Among the isolated strains, H9-1 strain isolated from the feces of rabbit has the highest CMCase activity. H9-1 strain was identified as *Bacillus* sp. based on 16S rDNA gene sequencing. The optimal conditions for CMCase activity by *Bacillus* sp. H9-1 were at 40°C and at initial pH 8.

**Keywords:** bioethanol, herbivore feces, *Bacillus* sp. H9-1, CMCase activity

#### 1. 서론

최근 환경오염과 화석연료의 고갈문제로 대체 에너지에 대한 관심이 많아지고 대체에너지의 하나로 재생 가능한 바이

오에탄올에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다 [1]. 초기 바이오에탄올 원료로는 사탕수수과 같은 당질계와 옥수수과 같은 전분질계 바이오매스가 주로 연구되었고, 실제 이를 원료로 바이오에탄올을 생산하여 수송용 바이오연료로 이용되고 있다. 현재 바이오연료는 전 세계적으로 전체 수송연료의 1% 정도를 차지하고 있으나 2030년에는 최대 5%까지 늘어날 것으로 예상된다 [2]. 그러나 이러한 당질계와 전분질계 바이오매스는 식량자원이어서 바이오에탄올 생산에 따른 개도국의 식량수급 불균형으로 설탕, 식량 등의 가격 폭등을 초래한 애그플레이션의 원인으로도 지탄받았다. 이와는 달리 섬유질계 바이오매스의 경우, 식량자원으로 바이오연료를 생산한다는 논쟁에서 자유로워 이를 이용하여 바이오에탄올을 생산하려는 연구에 박차를 가하고 있다 [3,4]. 특히 억새나 갈대의 경우 농경지가 아닌 간척지 등의 척박한 환경에서도 생육이 가능하며, 바이오매스 수량도 우수하여 이에 대한 심층적이고 지속적인 연구가 수행되고 있다 [5,6]. 또한 억새나 갈대 등의 섬유질계 바이오매스는 지구상에 아주 풍부하게 존재하고 있어 이용 가능성이 높다. 그러나 이들을 이용한 바이오에탄올 생산을 위해서는 미생물 발효가 가능하도록 섬유소의 당전환이 필요하며 이를 위해 섬유소 분해효소를 이용한다.

Cellulase는 복합효소로서 endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) 및  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) 등의 3가지 유형의 효소들로 구성되어 있으며, 이들 효소는 기질의 활성도 특성에 따라 각각 CMCase, avicelase 및 PNPase로 구분하기도 한다 [7]. 이러한 cellulase는 제지, 섬유, 사료, 식

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터  
IBioenergy Crop Research Center, National Institute of Crop Science,  
RDA, 199, Muan-ro, Cheonggye, Muan, Jeonnam 534-833, Korea  
Tel: +82-61-450-0134, Fax: +82-61-453-0085  
e-mail: mi3710@korea.kr

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 축산환경과  
<sup>2</sup>Animal Environment Division, National Institute of Animal Science,  
RDA, 143-13, Seosuwon-ro, Suwon 441-706, Korea

품산업, 바이오에너지 산업 분야에 널리 이용되고 있으며, 섬유소 분해에 유용한 미생물의 탐색 및 동정, 효소의 생산 최적화, 효소의 이용 등 여러 연구가 진행되고 있다 [8-11].

섬유소 분해효소는 곰팡이, 세균, 방선균 등 여러 미생물들에 의해 생산된다. 특히 *Tricoderma reesei*, *Aspergillus niger* 등의 곰팡이가 생산하는 cellulase는 활성이 우수하여 Genencor, Novozyme 등에서 이들이 생산하는 효소를 생산 판매하고 있다 [12-14]. 곰팡이가 분비하는 cellulase는 일반적으로 약산성 영역에서 높은 활성을 보이는 반면, 세균이 생산하는 효소는 중성 또는 알칼리성에서 최대 활성을 주로 나타내는 것으로 보고되고 있다 [15]. 억새나 갈대 등의 초본계 바이오매스의 전처리에는 황산 등의 산을 이용한 전처리보다 암모니아, NaOH 등 염기 처리가 더 효율적이며, 처리 후 섬유소의 효율적인 당전환을 위해서는 중성이나 염기조건에서 효과적으로 cellulase를 생산하는 미생물이 유용하다 [16-18]. 현재 섬유소 분해효소를 생산하는 세균에 대한 연구가 많이 진행되고는 있지만 산업화되어 이용되고 있지는 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 초본계 식물을 먹이로 하는 초식동물의 배설물로부터 섬유소 분해효소를 생산하는 균주를 분리동정하고자 하였다. 또한 섬유질 분해효소를 생산하는 분리 균주의 최적 효소생산조건을 구명함으로써 국내 바이오에탄올 생산관련 분야의 발전에 기여하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. CMCase 생산균주의 분리

초식동물의 배설물에서 섬유소 분해활성이 있는 균을 분리하기 위해 서울대공원(Gyeonggi-Do, Korea)으로부터 소과(25종), 사슴과(14종), 낙타과(4종), 기린과(1종), 코끼리과(1종), 말과(6종), 캥거루과(4종), 하마과(2종), 토끼과(1종), 코뿔소과(1종) 등 총 10과(59종)에 대한 배설물을 분양받았다.

각각의 배설물 1g을 0.85% NaCl 용액에 현탁 희석하여 PCA (plate count agar) 배지에 100  $\mu$ L를 도말한 후 37°C에서 1일 혹은 2일 배양하였다. 배양된 배지에서 분리된 colony들을 변형된 YPD (yeast extract, bacto-peptone, 1% CMC) 고체배지에 계대 배양한 후 congo red 염색을 통해 활성이 있는 균주를 선별하였다.

### 2.2. 섬유소 분해 활성 우수 균주의 선정

Congo red 염색에서 활성을 보인 균주들 중에서 섬유소 분해 활성이 우수한 균주의 2차 선별을 위하여 탄소원으로 1% CMC를 함유한 변형된 100 mL YPD 액체배지에 분리균주를 접종 배양 (37°C, 150 rpm)하고 원심분리 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) 한 후 상등액만을 따로 취하여 조효소로 사용하였다.

효소의 활성은 Ghose [19]의 실험을 변형하여 측정하였다. 원심분리한 조효소 상등액 0.5 mL을 2% CMC 0.5 mL에 첨가한 후 50°C에서 30분간 효소와 기질을 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 즉시 DNS (Dinitrosalicylic acid) 3 mL을 첨가 하고,

100°C에서 5분간 반응시킨 후 증류수 20 mL을 첨가하여 냉각시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 정량을 위하여 glucose를 표준당으로 0.1~1.0 g/mL 범위의 정량곡선을 작성하였다. 이때 효소의 활성은 IU (International Unit)로 나타내었으며, 1분 동안 1  $\mu$ mol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의한다.

### 2.3. 섬유소 분해 활성 우수 균주의 동정

선발된 균주의 동정은 형태학적 특성 조사, 생화학적 특성 분석, 16S rDNA 염기 서열 분석을 통해 이루어졌다. 형태학적 특성은 균주를 PCA 배지에 접종 배양한 후 관찰하였다. 선발 균주의 생화학적 특성 분석은 API 50 CHB kit (bioMerieux Vitek, France)를 이용하여 수행되었다. 마지막으로 유전자 염기서열 분석을 위해 균을 액체 배양한 후 genomic DNA extraction kit (DyneBio, Korea)로 genomic DNA를 추출하고, 16S rDNA universal primer를 이용하여 PCR을 수행 하였다. PCR product를 T-easy vector 에 ligation 후 형질전환 재조합 균주를 선발 하고 plasmid 추출 후 *Hind*III, *Bgl*II로 DNA 크기를 확인하고 (주)마크로젠(Daejeon, Korea)에 sequence 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 상동성을 분석하고 Clustal X software version 1.81을 통해 phylogenetic tree를 작성하였다.

### 2.4. 균주의 효소생산 최적 조건

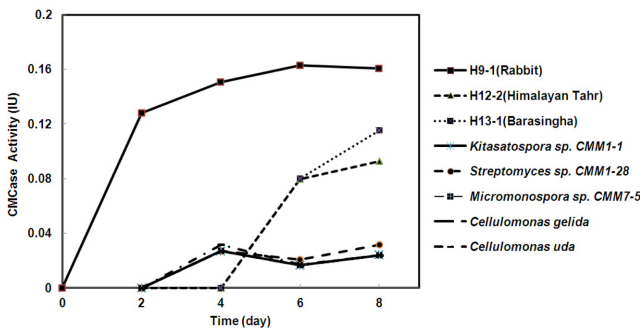
배양온도 및 배지의 초기 pH에 따른 균주의 효소 생산과 효소 활성정도를 알아보기 위하여 변형된 YPD(yeast extract, bacto-peptone, 1% CMC) 액체배지에 고체배지에서 배양된 H9-1 균주를 접종 배양하여 종균으로 사용하였다. 배양온도에 대한 균주의 효소 생산 및 효소 활성의 측정을 위해 1% CMC를 함유한 액체배지 100 mL에 종균 2 mL을 접종하고, 배양 온도를 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C로 달리하면서 150 rpm으로 24 시간 배양하였다. 배양액은 원심분리 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) 한 후 상등액만을 조효소로 사용하여 DNS법 [20]으로 효소의 당화정도를 측정하여 알아보았다. 선발 균주의 초기 pH 영향은 1% CMC를 함유한 액체배지에 0.1 N-1 N HCl과 0.1 N-1 N NaOH 시약을 이용하여 pH를 4에서 10으로 배지를 조정한 후 멸균하여 종균을 접종 배양하고 조효소의 당화정도를 DNS법으로 측정하여 확인하였다.

## 3. 결과 및 고찰

본 연구는 초본계 바이오매스의 당화효소 개발을 위해 초식동물의 배설물을 서울대공원으로부터 분양받아 이들로 부터 섬유소 분해능이 우수한 미생물을 분리, 선별, 동정하고자 하였다. Table 1은 초식동물 10과 59종에 대한 배설물로부터 분리된 균주들을 탄소원이 CMC로 대체된 YPD 배지에 접종 배양한 후 congo red 염색을 통해 clear zone 형성이 우

**Table 1.** CMCase activities of first selected strains by intensities of halos on CMC agar from feces of herbivores. +++: strong, +: weak, -: null

Strain	Family of herbivore	CMCase activity on CMC medium	
		Transparency	Halo size (cm)
H8-1	Hippopotamus	+++	2.0
H9-1	Rabbit	+++	2.6
H9-2	Rabbit	+++	2.5
H10-1	Rhinoceros	+++	2.3
H10-2	Rhinoceros	+++	2.0
H11-1	Cattle	+++	1.4
H11-3	Cattle	+++	1.2
H12-2	Cattle	+++	4
H13-1	Deer	+++	2.1
H13-2	Deer	+++	1.5
H13-4	Deer	+++	2.0
H16-1	Camel	+++	2.5
H17-2	Camel	+++	2.1
H17-3	Camel	+++	3.4
H18-1	Horse	+++	2.4
H18-2	Horse	+++	1.4
H24-2	Deer	+	2.5
H24-3	Deer	+++	3.6
H25-1	Kangaroo	+++	3
H25-2	Kangaroo	+	2.5
H25-4	Kangaroo	++	3
H41-1	Cattle	+++	3.5
H55-1	Cattle	+	3.5
H59-2	Cattle	+++	1.3



**Fig. 1.** CMCase activities of the second selected strains from feces of herbivores by DNS method.(37°C, 150 rpm).

수한 24개의 균주들을 1차 선별한 결과이다. 이후 1차 선별된 각 균주들의 배양액을 조효소로 사용하여 DNS법을 이용한 효소활성 측정 결과, H9-1, H12-2, H13-1의 활성이 다른 균주들에 비해 우수하게 나타났다 (data not shown). Fig. 1은 활성이 우수한 H9-1, H12-2, H13-1 균주들의 배양시간에 따른 효소활성과 기존의 섬유소 분해활성이 있다고 알려진

*Cellulomonas gelida* 등 5개의 균주들을 농촌진흥청 농업유전자원센터로부터 분양받아 효소 활성정도를 비교한 결과이다. 토끼의 배설물에서 분리된 H9-1 균주가 배양 6일째 0.16 IU로 가장 높은 활성을 보였으며, 기존의 섬유소 분해능이 있다고 알려진 균주들의 활성은 0.04 IU로 섬유소 분해활성이 H9-1 균주보다 낮았다. 또한 H9-1 균주의 효소 활성은 배양 2일째부터 우수하게 나타나 초본계 바이오매스 당화 효소로의 가능성을 확인 할 수 있었다. Feng et al.[20]은 토끼의 맹장에서 메타게놈법으로 섬유소 분해활성이 있는 DNA를 분리하였으며 이러한 결과는 본 실험결과와도 관련이 있으리라 사료된다.

H9-1 균주의 동정을 위해 PCA 배지에 균을 배양한 후 형태학적 특성과 생화학적 특성을 알아보았다(Table 2, Table 3). 분리균주는 glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl-

**Table 3.** Biochemical characteristics of *Bacillus* sp. H9-1 isolated from feces of rabbit

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Control	-	Esculin ferric citrate	+
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	D-cellobiose	+
D-arabinose	-	D-maltose	+
L-arabinose	+	D-lactose (bovine origin)	+
D-ribose	+	D-melibiose	-
D-xylose	+	D-saccharose (sucrose)	+
L-xylose	-	D-trehalose	+
D-adonitol	-	Inulin	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-	D-Melezitose	-
D-galactose	-	D-Raffinose	W
D-glucose	+	Amidon (starch)	+
D-fructose	+	Glycogen	+
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	Gentiobiose	+
L-rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	+	D-Tagatose	-
D-mannitol	+	D-Fucose	-
D-sorbitol	+	L-Fucose	-
Methyl-αD-Mannopyranoside	-	D-arabitol	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	+	L-arabitol	-
N-acetylglucosamine	-	Potassium glucoNaTe	-
Amygdalin	W	Potassium 2-ketogluconate	-
Arbutin	+	Potassium 5-ketogluconate	-

‡ represents good utilization; W weak; - negative.

**Table 2.** Morphological characteristics of *Bacillus* sp. H9-1 colony

Family of herbivore	Strain	Morphology of H9-1 [PCA]								Gram Staining
		Form	Surface	Texture	Elevation	Margin	Opacity	Color		
rabbit	H9-1	irregular	dull	brittle	flat	undulate	opaque	white	G (+)	

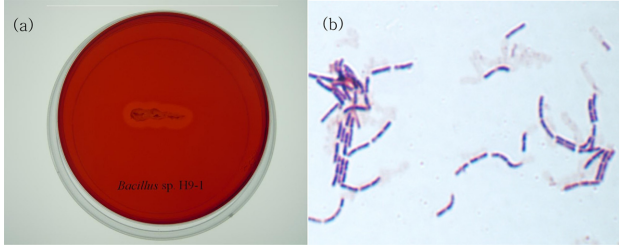


Fig. 2. Congo red (a) and Gram staining (b) of *Bacillus* sp. H9-1.

$\alpha$ D-glucopyranoside, amygdalin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose, amidon, glycogen, gentiobiose 등의 탄수화물을 이용하여 생육하였으며 이외의 탄수화물은 이용하지 못함을 확인하였다. Fig. 2는 H9-1 균주의 congo red 염색을 통한 효소 활성과 그램염색의 결과이다. H9-1균주는 섬유소 분해능이 있으며 colony의 모양이 불균일하고 불투명한 그램양성의 간균임을 확인할 수 있었다. 분리균의 계통학적 유연관계를 조사하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. Fig. 3은 H9-1 선발균의 분석된 16S rDNA 염기서열과 GeneBank에 등록된 균주들의 염기서열을 비교 작성한 계통도이다. 염기서열 분석에서 H9-1균주의 염기서열은 *Bacillus subtilis*와 99% 상동성을 나타내어 본 균주를 *Bacillus* sp. H9-1로 명명하였고, 이를 농촌진흥청 유전자원센터에 기탁하였다 (KACC 17125). Seki et al. [22]은 16S rDNA 염기서열에서 100% 상동성을 보이더라도 *Bacillus* 속은 다양한 환경에서 포자로 생존하여 환경에 따라 종다양성이 나타나므로 서로 다른 종으로 분류될 수 있다고 보고하였다. 일반적으로 *Bacillus* 속은 자연계의 토양, 물, 마른풀 등에 널리 분포하며 Gram 양성균으로  $\alpha$ -아밀라아제,  $\beta$ -아밀라아제, 프로테아제, 셀룰라아제 등 다양한 효소를 생산하여 청국장제조, 혈전용해성분을 함유한 기능성 식품의 제조에 이용되고 있다. 본 연구에서 분리 동정된 *Bacillus* sp. H9-1 균주 또한 셀룰라아제 활성이 우수하여 그 이용이 기대된다.

*Bacillus* sp. H9-1 균주의 효소 생산 특성을 알아보기 위해 균의 배양온도와 배지의 초기 pH, 배양 시간에 대한 영향을

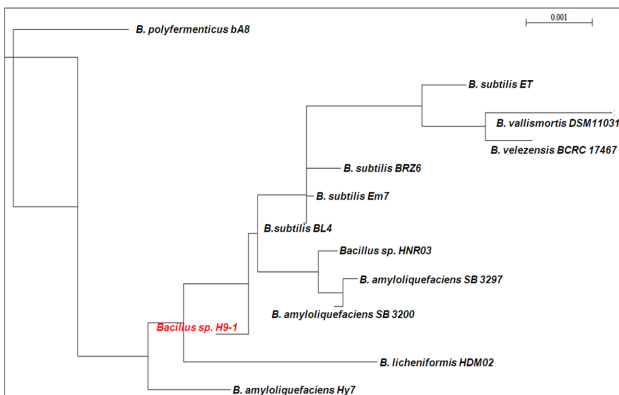


Fig. 3. Phylogenetic relationship of isolated H9-1 strain with other *Bacillus* species based on partial 16S rDNA gene sequences.

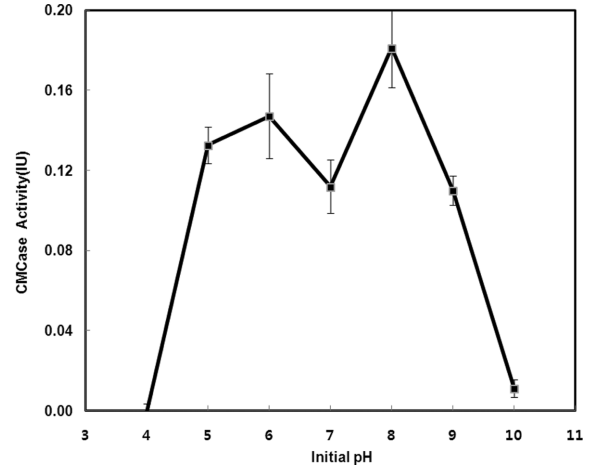


Fig. 4. Effect of initial pH on the production of CMCCase by *Bacillus* sp. H9-1 (150 rpm, 40°C, 48 hr incubation time).

조사하였다. Fig. 4는 배지의 초기 pH에 따른 균이 생산한 CMCCase 효소의 활성을 나타낸 것이다. pH 8에서 배양한 H9-1 균의 효소 활성이 0.18 IU로 가장 높게 나타났다. 또한 pH 5-9 범위에서도 0.11 IU 이상의 비교적 높은 활성을 보여 산 또는 알칼리 용매로 가수분해하여 약산성이나 약알칼리성을 띄는 섬유질계 바이오매스를 당화하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 섬유질계 바이오매스를 이용하여 바이오에탄올 생산을 위해서는 섬유소의 당으로의 전환이 필요하며 이 공정에서 섬유소 분해효소가 이용된다. 그러나 섬유소 자체를 전처리 없이 효소를 이용하여 직접 당화하면 효율성이 떨어지게 된다. 섬유질계 바이오매스의 당화를 위한 전처리에는 acid, alkaline, steam explosion, wet oxidation 등의 방법이 이용되고 있으며, 초본계의 경우 glucan과 xylose 수득면에서 NaOH 처리 등의 알칼리 처리가 효과적이라고 보고되었다 [16-18]. 따라서 본 연구에서 동정된 *Bacillus* sp. H9-1의 경우 초기 pH 8에서 최적 활성을 보이고 있어 초본계 바이오매스의 당화에 적합하리라 사료된다.

Fig. 5는 배양온도에 따른 분리 균주가 생산한 효소의 활성

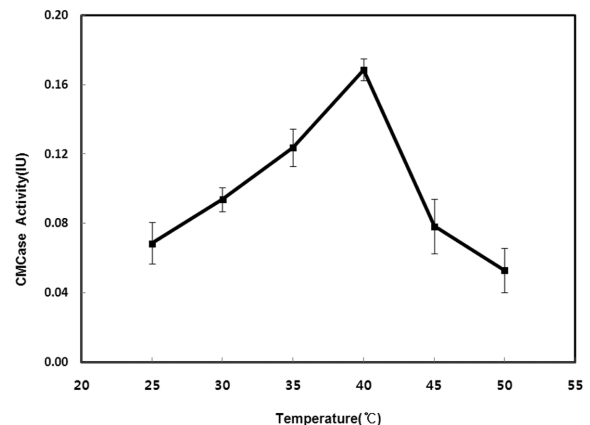


Fig. 5. Effect of temperature on the production of CMCCase by *Bacillus* sp. H9-1 (150 rpm, initial pH 8, 48 hr incubation time).

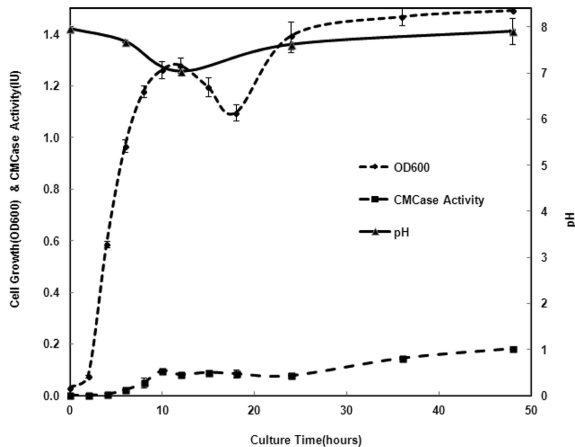


Fig. 6. Cell growth, CMCase activities, and pH change of *Bacillus* sp. H9-1 depending on culture time (initial pH 8, 40°C, 150 rpm).

정도를 나타낸다. 40°C에서 섬유소 분해활성이 0.17 IU 로 가장 높게 나타났고, 45°C, 50°C에서는 활성이 0.08 IU, 0.05 IU로 낮게 나타났다. 반면에 Shabeb et al. [23]은 *Bacillus subtilis* KO균주가 45°C에서 가장 높은 생산성을 보였고 50°C에서는 효소 생산성이 매우 낮았다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. H9-1균주의 경우 좀 더 낮은 온도에서 효소 활성을 보이므로 당화과정에서 사용될 에너지 절감에 더 효과가 있을 것으로 사료된다.

Fig. 6은 분리균주의 효소 생산을 위한 최적 배양온도와 초기 pH 조건에서 배양시간에 따른 균의 성장과 효소 활성을 나타낸 것이다. *Bacillus* sp. H9-1 균은 배양 4시간부터 지수 성장기에 들어가 10시간부터 정지기에 이르렀다. 배양 12시간부터 16시간까지 배양균의 생장이 사멸기 처럼 보이다가 다시 약간의 성장을 한 후 균은 정지기에 이르렀다. 그러나 OD 값은 살아 있는 균뿐만 아니라 죽은 균 까지 측정하는 것으로 균으로 인한 현상이라기보다 배지에 현탁되어 있던 CMC가 균이 생산한 섬유소 분해효소에 의해 분해되어 당으로 전환되면서 일시적으로 OD 값이 낮게 측정되었으리라 사료된다. 효소의 활성은 균의 성장곡선과 비례하여 증가하다가 10시간부터 일시적으로 변화가 없다가 다시 증가하였는데 이는 섬유소 분해효소에 의해 CMC가 glucose로 분해되면서 효소의 생성을 억제 했으리라 생각된다. 분리균의 효소 활성 최적화를 위한 배양 조건은 배양온도 40°C, 배지의 초기 pH 8, 배양 시간 48 hr였으며 이때의 효소 활성은 0.18 IU 이었다.

#### 4. 결론

본 연구는 초본계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산 공정에서 필요한 당화효소생산을 위하여 수행되었다. 효소

를 생산하는 균주의 선별을 위해 59종의 초식 동물 배설물로부터 균주를 분리하고 congo red 염색법으로 섬유소 분해활성이 있는 균주를 1차 선별한 후, DNS 방법으로 효소의 활성을 측정하여 활성이 우수한 균을 2차 선별하였다. 토끼의 배설물에서 분리된 H9-1 균주가 배양 6일째 0.16 IU 로 가장 높은 활성을 보였으며 균의 형태학적 특성과 16S rDNA 분석 결과 *Bacillus* sp.임을 확인하고 *Bacillus* sp. H9-1로 명명하였다. 선별 균주의 효소 생산 최적화를 위해 배양 온도와 초기 배지 pH를 최적화 하였다. 최적조건은 배양온도 40°C, 초기 배지 pH 8, 배양시간 48 hr이며, 최적효소활성은 0.18 IU이었다. 본 연구에서 분리한 H9-1 균주는 중성과 약알칼리조건에서 효소 활성이 우수한 균주로서, 분리균주 *Bacillus* sp. H9-1로부터 생산된 효소는 바이오에탄올 생산을 위하여 약알칼리로 전처리하는 초본계 바이오매스를 당화시키는 데 유리한 효소임을 확인하였다.

#### REFERENCES

- Limayem, A. and S. C. Ricke (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. 38: 449-467.
- Kil, S. C., S. W. Kim, and M. S. Oh (2012) Global trends of bioethanol science information. *Econ. Environ. Geol* 45: 589-597.
- Kim, K. S. and J. S. Kim (2010) Optimization of ammonia percolation process for ethanol production from *Miscanthus Sinensis*. *Korean Chem. Eng. Res.* 48: 704-711.
- Cardona, C. A., J. A. Quintero, and I. C. Paz (2010) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Biore-source Technology*. 101: 4754-4766.
- Moon, Y. H., B. C. Koo, Y. H. Choi, S. H. Ahn, S. T. Bark, Y. L. Cha, G. H. An, J. K. Kim, and S. J. Suh (2010) Development of "Miscanthus" the promising bioenergy crop. *Kor. J. Weed Sci.* 30: 330-339.
- An, G. H., S. I. Lee, B. C. Koo, Y. H. Choi, Y. L. Cha, S. T. Bark, J. K. Kim, B. C. Kim, and S. P. Kim (2011) Effects of application of solidified sewage sludge on the growth of bioenergy crops reclaimed land. *Korean J. Crop Sci.* 56: 299-307.
- Kim, D. W., C. H. Chung, and T. S. Kim (1992) Sugar production mechanism by the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials: Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase components. *Polymer*. 16: 436-442
- Bhat, M. K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18: 355-383.
- Mawadza, C., R. Hatti-Kaul, R. Zvauya, and B. Mattiasson (2000) Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*. 83: 177-187.
- Kim, H. J., Y. H. Kim, M. J. Cho, K. Shin, D. H. Lee, T. J. Kim, and Y. S. Kim (2010) Characterization of cellulases from *Schizophyllum commune* for hydrolysis of cellulosic biomass. *Mokchaekonghak*. 38: 547-560.
- Deswal, D., Y. P. Khosa, and R. C. Kuhad (2011) Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp.

- RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology* 102: 6065-6072.
12. Reczey, K., Zs. Szengyel, R. Eklund, and G. Zacchi (1996) Cellulase production by *T. reesei*. *Bioresource Technology*. 57: 25-30.
  13. Esterbauer, H., W. Steiner, I. Labudova, A. Hermann, and M. Hayn (1991) Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*. 36: 51-65.
  14. Shu, G., M. Hu, S. Wang, and H. Chen (2011) Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Environmental Sciences*. 8: 357-361.
  15. Lee, S. H., J. P. Chae, M. J. Kim, and D. K. Kang (2010) Isolation of *Bacillus amyloliquenfaciens* ATC6 producing acidic cellulase. *Journal of Animal Science and Technology*. 52: 65-70.
  16. Bark, S. T., B. C. Koo, Y. H. Choi, Y. H. Moon, S. H. Ahn, Y. L. Cha, J. K. Kim, G. H. An, S. J. Suh, and D. H. Park (2010) The effect of extrusion treatment on aqueous ammonia soaking method in *Miscanthus* Biomass pretreatment. *New and Renewable Energy*. 6(4): 6-14.
  17. Han, M. H., Y. Kim, Y. G. Kim, B. W. Chung, and G. W. Choi (2011) Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Korean J. Chem. Eng.* 28: 119-125.
  18. Yoo, H. Y., S. B. Kim, H. S. Choi, K. Kim, C. H. Park, and S. W. Kim (2012) Optimization of sodium hydroxide pretreatment of canola agricultural residues for fermentable sugar production using statistical method. *IPCBE*. 28:175-179.
  19. Ghose, T. K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*. 59:257-268.
  20. Feng, Y., C. J. Duan, H. Pang, X. C. Mo, C. F. Wu, Y. Yu, Y. L. Hu, J. Wei, J. L. Tang, and J. X. Feng (2007) Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75:319-328.
  21. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 35:426-428.
  22. Seki, T., C. K. Chung, H. Mikami, and Y. Oshima (1978) Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 28:182-189.
  23. Shabeb, M. S. A., M. A. M. Younis, F. F. Hezayen, and M. A. Nour-Eldein (2010) Production of cellulase in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain, *World Applied Sciences Journal*, 8:35-42.