Microbiol. Biotechnol. Lett. (2016), 44(3), 324–332
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1605.05004
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

Xylan과 Xylan 가수분해물에 의한 *Bacillus safensis* 분리균의 Xylanase 생산

진현경, 윤기홍*
우송대학교 바이오식품과학전공

Received: May 31, 2016 / Revised: June 8, 2016 / Accepted: June 9, 2016

Xylanase Production from *Bacillus safensis* Isolate by Xylan or Xylan Hydrolyzed Products

Hyun Kyung Jin and Ki-Hong Yoon*
Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 34606, Republic of Korea

A bacterial strain capable of hydrolyzing xylan was isolated from fermented soybean paste obtained from a domestic Buddhist temple, using enrichment culture with rice straw as a carbon source. The isolate, named YB-1301, was identified as *Bacillus safensis* on the basis of its DNA gyrase subunit B gene (*gyrB*) sequence. The xylanase productivity of strain YB-1301 was drastically increased when it was grown in the presence of wheat bran or various xylans. In particular, the maximum xylanase productivity reached above 340 U/ml in the culture filtrate from LB broth supplemented with only birchwood xylan at shake-flask level. The xylanase production was significantly induced by xylans at the stationary growth phase in LB medium containing xylan, whereas only a small amount of xylanase was constitutively produced from cells grown in LB medium with no addition of xylan. Furthermore, xylanase biosynthesis was induced more rapidly by the enzymatically hydrolyzed products of xylan than by the non-hydrolyzed xylan. In addition, the xylanase in the culture filtrate of *B. safensis* YB-1301 was found to have optimal activity at 55℃ and pH 6.5–7.0.

Keywords: ***Bacillus safensis*, induction, xylanase, xylan hydrolyzates**

서 론

Xylan은 목재의 세포벽에 존재하는 반섬유소의 주요 구성물이며, 초본류와 곡류에도 두루 존재한다. Xylan은 D-xylose 잔기간에 β-1,4 배당결합의 골격을 하고 있는 다당류이며 식물의 종류에 따라 xylose 잔기의 2번 또는 3번 탄소위치에 acetyl, L-arabinofuranosyl, 4-*O*-methyl-α-D-glucuronopyranosyl 과 D-xylosyl 잔기가 서로 다른 함량으로 결합되어 있다. 또한 L-arabinofuranose는 ferulic acid 또는 D-galactose가 결합된 형태로도 존재한다[5]. Xylan의 분해에는 D-xylosyl 잔기간 배당결합을 절단하는 endo-β-1,4-xylanase (xylanase)와 β-xylosidase가 중요한 역할을 하지만 α-L-arabinofuranosidase, α-D-glucuronidase, acetylxylan esterase, feruloyl esterase와 α-galactosidase 등의 여러 효소가 관여하여 xylan 분해 효율에 영향을 미친다[14].

Xylanase는 제빵과 제과, xylo 올리고당과 xylitol 생산, 과일음료와 커피 가공 등의 식품산업, 가축 사료의 소화 효율을 높이기 위한 사료산업, 제지와 펄프 산업과 직물가공 및 바이오 매스 당화 과정에 활용되어 산업적으로 중요한 효소이다[8]. 상품화된 대부분의 xylanase는 균류인 *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*로부터 생산되며, *Bacillus*속 균주에서 생산되는 효소도 있다[17]. 세균은 균류에 비해 효소 생산성이 낮지만, 다수의 세균으로부터 xylanase의 생산성, 효소 및 그 유전자에 대한 연구가 수행되었다.

세균 중에서도 단백질을 균체외로 분비 생산하는 능력이 우수한 *Bacillus*속이나 이와 유사한 *Geobacillus*속과 *Paenibacillus*속의 균주로부터 여러 종류의 xylanase 유전자가 보고되었으며 이들 중 다수의 xylanase는 glycosyl

***Corresponding author**
Tel: +82-42-630-9742, Fax: +82-42-630-9389
E-mail: ykh@wsu.ac.kr
© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

hydrolase (GH) family 10과 11에 속한다. GH11에 속하는 xylanase는 GH10의 효소보다 그 크기가 작으며 활성 domain으로만 구성되어 있다. *B. pumilus* (228 잔기; GenBank accession no. ABM54186), *B. safensis* (228 잔기; KIZ54927), *B. subtilis* (213 잔기; ACT79298), *B. licheniformis* (213 잔기; ACF05486), *B. circulans* (213 잔기; P09850)와 *B. firmus* (210 잔기; AAQ14588) 의 xylanase는 GH11에 속하며, GH10에 속하는 *G. stearothermophilus* (331 잔기; ABI49937, 412 잔기; ABI49951), *B. cellulosilyticus* (335 잔기; ADU28829), *B. coagulans* (358 잔기; AEP00091), *P. barcinonensis* (1,086 잔기; CAA07173)의 xylanase는 GH11 xylanase와 달리 2개 이상의 domain들로 구성된 효소도 있다. GH2에 속하는 xylanase는 *B. pumilus* (409 잔기; AAM21605), *B. safensis* (409 잔기; KDE27822)와 *B. altitudinis* (408 잔기; KDE32897)의 효소이며, 이외에도 *B. firmus* (396 잔기; AAQ83581)의 xylanase는 GH35, *B. subtilis* (513 잔기; AEP90993), *B. atrophaeus* (512 잔기; EIM08957), *B. safensis* (512 잔기; KDE26331), *B. pumilus* (511 잔기; AEK35326)의 xylanase는 GH43, *G. stearothermophilus* (620 잔기; BAA05669)의 xylanase는 GH52에 각각 속하여 아미노산 배열이 다양한 xylanase들이 존재한다.

*B. safensis*는 *B. pumilus*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* 및 *B. aerophilus*와 함께 *B. pumilus* 그룹에 속하는 균으로 2006년 미국 항공우주국의 우주선 조립시설에서 오염균으로 분리된 FO-36b가 *B. safensis*로 처음 동정되었으며[20], 우주의 저중력 상태에서 성장이 우수한 *B. safensis* JPL-MERTA-8-2가 지구의 작업환경에서 분리되었다[6]. 한편 균체외 효소로 keratinase [11], xylanase [24], inulinase[21]를 생산하는 *B. safensis*가 분리되어 효소 생산성에 대한 연구가 수행되었으며, 발효식품에서도 *B. safensis*가 분리된 바 있다[1, 10]. 한편 *B. safensis*와 분류학적으로 유사도가 매우 높은 *B. pumilus* SV-205의 경우 탄소원과 질소원을 포함한 배지 첨가물, 배양 시간, 배지의 pH, 배양온도, 교반 속도를 최적화함으로써 xylanase 생산성이 크게 향상된 바 있다[16]. 본 연구에서는 사찰에서 제조된 된장으로부터 xylan 분해능이 우수한 *B. safensis*을 분리하고 부가 탄소원과 그 가수분해산물이 분리균의 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

효소 생산균 분리

충청남도에 소재한 사찰에서 제조된 된장을 수집하여 밀기울, 왕겨, 쌀기울과 옥분이 각각 0.5% 농도로 첨가된 SMM 배지(0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 1.4% K_2HPO_4, 0.6% KH_2PO_4, 0.1% trisodium citrate·H_2O, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)에 접종하여 30℃에서 약 4일간 진탕 배양하고 동일한 배지에 3–4일 간격으로 4회 계대 배양을 실시하였다. 최종 계대 배양액을 동일한 성분을 함유한 평판배지에 각각 도말하여 30℃에서 콜로니가 형성될 때까지 배양한 후 서로 다른 형태의 콜로니를 선발하여 oat spelt xylan (0.5%)이 함유된 LB 평판배지에 접종하였다. 동일온도에서 배양하면서 oat spelt xylan의 분해환을 관찰하여 xylanase를 생산성이 우수한 균주를 분리하였다.

분리균의 동정

분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람 염색과 포자 염색을 실시하였으며, LB 액체 배지에서 배양한 균체를 0.85% NaCl 용액에 현탁한 후 제조사의 지침을 따라 API 20E와 API 50 CHB (Biomereux, France) kits에 접종하여 37℃에서 배양하면서 1일과 2일째 각각 탄수화물 이용능과 생화학적 특성을 관찰하였다. 분리균의 16S rRNA 유전자와 DNA gyrase subunit B (*gyrB*) 유전자의 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 8–27), 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 1,492–1,510)과 *gyrB* 유전자의 염기서열 5'-TTATCTACGACCTTAGACG-3' (*B. pumilus gyrB* 유전자 염기서열 382–400) 5'-TAAATTGAAGTCTTCTCCG-3' (*B. pumilus gyrB* 유전자 염기서열 1,446–1,464)을 primer들로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시함으로써 얻은 PCR 산물을 정제하여 그 염기서열을 결정하였다. 균의 동정을 위해서는 16S rDNA와 *gyrB* 유전자 염기서열을 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 다른 세균의 유전자 염기서열과 그 상동성을 비교하였다.

Xylanase 활성 측정

Xylanase 활성은 oat spelt xylan을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1% (w/v) oat spelt xylan 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.5) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 50℃에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 용액 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xylose를 표준시료로 사용하여 동일조건에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건에서 1분 동안

xylan으로부터 1 μmol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

증균 배양을 이용한 xylanase 생산균의 탐색과 분리균의 특성

국내 사찰에서 제조된 된장을 수집하여 다양한 미생물을 분리하기 위해 합성 배지인 SMM에 왕겨, 밀기울, 쌀기울, 옥분을 탄소원으로 각각 첨가한 배지에 된장을 접종하였다. 동일 배지에서 계대 배양을 하여 증균한 후 최종 배양액을 동일한 성분의 평판배지에 도말한 후 4일간 배양한 결과 증균 배양액별로 형태적으로 차이가 있는 2–4 종류의 콜로니가 분리되었다. 이들 분리균을 LB 평판배지에 배양하여 콜로니 모양을 비교하였을 때 증균 과정 중에 배지에 첨가된 탄소원의 종류에 따라 분리된 균종은 차이가 있는 것으로 나타났다.

이들 콜로니 중에서 xylan의 분해능이 우수한 균주를 선발하기 위해서 평판배지에서 oat spelt xylan 분해환의 크기를 비교하여 xylan 분해능이 가장 우수한 균주를 1 주 분리하였다. 분리균 YB-1301의 다른 고분자 물질 가수분해능을 조사하기 위해 skim milk (1%), potato starch (0.2%), tributyrin (1%)과 carboxymethyl cellulose (CMC; 0.5%)를 각각 첨가한 LB 평판배지에서 24시간 배양하여 분해환을 조사한 결과, YB-1301은 esterase, protease, CMCase 활성을 보였으나 amylase 활성은 보이지 않았다. 배양온도에 따른 성장도를 조사한 결과 50℃ 이하에서는 성장하였으며 45℃ 부근에서 성장속도가 가장 높았고 55℃ 이상에서는 거의 성장하지 못하였다.

분리균의 동정을 위해 형태적 특성을 관찰한 결과 YB-1301은 그람 양성 간균이며 포자를 형성하였다. YB-1301의 유전체로부터 증폭된 1,410 bp 크기의 16S rDNA 염기서열을 결정하여(Genbank accession No. KX277964) 다른 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과, 분리원이 다른 *B. safensis* (KU714601, KP717556). *B. pumilus* (KU160384, KR091846), *B. altitudinis* (KT719761) 균주들의 16S rDNA 서열과 동일하였다. *B. pumilus* 그룹에 속하는 *B. pumillus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis*와 *B. aerophilus* 사이에는 16S rDNA 서열이 99% 이상으로 유사도가 매우 높은 균종이 많아 이들 균주를 서로 구별하기 위해서는 16S rDNA 서열보다 *gyrA* (DNA gyrase subunit A), *gyrB* (DNA gyrase subunit B), *rpoB* (RNA polymerase subunit B) 유전자의 염기서열을 비교하는 것이 바람직한 것으로 보고된 바 있다[1, 3, 12]. 그러므로 YB-1301의 *gyrB* 유전자 중의 일부를 증폭하여 999 bp 크기의 염기서열을 결정하였으며 (KX277965) 이를 다른 균주와 비교한 결과 *B. safensis* Bs31 [3], *B. safensis* KL-052 [20], *B. safensis* SAFN-027 (AY167876), *B. safensis* C91b [10]을 비롯한 다수의 *B. safensis* 분리균과 98% 이상의 상동성을 보였다.

한편 *B. safensis*, *B. pumilus*와 *B. altitudinis* 표준균과 비교한 결과 YB-1301의 16S rDNA 서열은 *B. safensis* FO-036b (AF234854)와 동일하고, *B. pumilus* ATCC 7061 (AY876289)과는 2개 염기서열이 달랐으며, *B. altitudinis* 41KF2b (AJ831842)와는 7개 염기서열이 차이가 있는 것으로 나타나 YB-1301은 이들 표준균과 16S rDNA 서열이 99.5% 이상의 상동성을 보였다. 이러한 결과는 *B. pumilus* 그룹에 속하는 종이 다른 균주간에 16S rDNA 서열이 99.5% 이상의 상동성을 보인다는 결과와 일치하였다[12]. 그러나 YB-1301의 *gyrB*의 염기서열을 비교한 결과 *B. safensis* FO-036b (AY167867), *B. pumilus* ATCC 7061 (AY167869) 및 *B. altitudinis* 41KF2b (KJ809604)와 각각 97.8%, 91.5%, 91.4%의 상동성을 보여 *B. safensis*와 상동성이 가장 높은 것으로 나타났다. Liu 등은 *B. pumilus* 그룹에 속하는 균주를 대상으로 *gyrB* 유전자의 염기서열 상동성을 조사하여 약 96% 이상의 상동성을 보이면 동일한 종에 속하며, 약 89–96%의 상동성을 보이면 다른 종에 속하는 것으로 보고한 바 있다[12]. 그러므로 분리균은 *gyrB* 유전자 염기서열의 상동성으로 볼 때 *B. safensis*에 속하는 것으로 확인되었다. 국내 된장에서 *B. safensis*가 분리된 보고는 없었으나, 아프리카 지역의 콩류 발효식품인 Yanyanku와 ikpiru에서 분리된 균 중에서 8–19% 정도가 *B. safensis*에 속하는 균주로 보고되었으며[1], 또한 가나에서 식물종자와 카사바 가루를 원료로 제조된 천연 발효식품인 kantong에서도 *B. safensis*가 약 23% 수준의 우점균으로 분리된 바 있다[10].

또한 API 50 CHB와 20E kit를 사용하여 분리균의 생화학적 특성을 조사한 결과 glycerol, L-arabinose, ribose, D-xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, methyl α-D-mannoside, methyl α-D-glucoside, N-acetyl glucosamine, amygdaline, arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, saccharose, trehalose, gentiobiose, D-turanose, D-tagatose를 이용하였으며 다른 탄수화물은 이용하지 못하는 것으로 확인되었다. 또한 분리균은 β-galactosidase와 gelatinase의 활성을 보이며, citrate 이용능과 acetoin을 생성하였다. 한편 *B. pumilus* ATCC 7061과 *B. safensis* FO-36b 균주간에 탄소원 이용성의 가장 큰 차이를 보이는 것은 inositol, methyl α-D-glucopyranoside, maltose와 D-turanose로 보고되었다[20]. *B. safensis* FO-36b는 이들 탄소원을 모두 이용하는 반면에 *B. pumilus*는 이를 모두 이용하지 못하였는데, 분리균 YB-1301은 methyl α-D-glucopyranoside, maltose와 D-turanose를 이용하여 *B.*

Table 1. Effects of additional carbon sources on xylanase production from *B. safensis* YB-1301.

Additional carbon sources (0.5%)	Xylanase productivity (U/ml)	Additional carbon sources (0.5%)	Xylanase productivity (U/ml)
LB	0.28	Rice straw	7.41
Glucose	0.32	Rice bran	7.53
Mannose	0.14	Oat spelt xylan	128.76
Xylose	13.34	Beechwood xylan	188.73
α-Cellulose	10.08	Birchwood xylan	210.07
Palm Kennel meal	0.13	Wheat bran	62.65

*safensis*와 같았지만 inositol은 이용하지 못해 두 균주 중 어느 것과도 완전히 일치하지는 않았다.

부가탄소원에 의한 Xylanase 생산성

Xylanase는 배지에 포함된 탄수화물 종류와 함량에 의해 생산성이 크게 좌우되며, 일반적으로 xylan이나 밀기울이 함유된 배지에서 xylanase의 생산이 증가되는 것으로 보고되었다[7, 9, 16]. YB-1301의 효소 생산성에 미치는 탄수화물의 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지를 기본배지로 하여 단당류와 다당류 및 농산부산물을 0.5% (w/v)가 되도록 각각 첨가하고 37℃에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액에 존재하는 xylanase 활성을 측정하였다(Table 1).

LB 배지에서는 효소 생산성이 0.3 U/ml 미만 정도로 매우 낮았으며, glucose와 mannose가 첨가된 배지에서도 효소 생산성에 변화는 미미한 수준이었다. 그러나 xylose가 첨가된 배지에서는 13.3 U/ml로 약 47배 정도로 효소 생산성이 급증하는 현상을 나타냈으며 xylan이 첨가된 경우 가장 높은 생산성을 보였다. 또한 xylan은 그 종류에 따라 효소 생산성에 미치는 영향이 차이가 있으며 birchwood xylan, beechwood xylan과 oat spelt xylan 순으로 효소 생산성이 증가하였다. Xylan들의 종류에 따라 효소 생산성의 증가 정도의 차이가 발생하는 원인 중 하나로 xylose 잔기 함량의 차이를 고려할 수 있다. 효소 생산성 증대 효과가 높은 beechwood xylan이나 birchwood xylan은 xylose 잔기 함량이 90% 이상인데 비해 oat spelt xylan은 70% 이상이다. 농산 부산물에 의해서도 효소 생산성이 증가하였는데 쌀기울이나 왕겨 보다는 밀기울에 의한 생산성 증가가 더 높았다. 이는 밀기울이 쌀기울이나 왕겨보다 xylan 성분을 더 많이 함유하고 있기 때문으로 여겨진다[13]. 한편 xylanase의 생산성이 불용성 cellulose인 α-cellulose에 의해서도 크게 증가한 현상은 α-cellulose의 제조과정 중 xylan이 완전히 제거되지 않고 최종 제품에 잔존한 때문일 수 있다. 그러나 팜유 추출부산물인 palm kernel meal이 첨가된 배지에서는 균의 성장이 매우 저조하여 효소 생산성이 낮았다.

Table 2. Effects of additional amounts of wheat bran or xylans on xylanase production from *B. safensis* YB-1301.

Amount of additional carbon source (%)	Xylanase productivity (U/ml)			
	Oat spelt xylan	Beechwood xylan	Birchwood xylan	Wheat bran
0.0	0.33	0.31	0.33	0.32
0.5	128.09	188.55	210.08	59.99
1.0	129.13	203.10	238.79	72.74
1.5	132.15	234.87	251.22	135.09
2.0	133.06	273.71	312.91	169.82
2.5	127.24	313.98	340.70	156.60
3.0	113.30	275.80	330.78	156.01

Table 3. Xylanase production from *B. safensis* YB-1301 according to soluble and insoluble fractions.

Additional carbon sources	Xylanase productivity (U/ml)		
	Total[a]	Soluble[b]	Insoluble[c]
Oat spelt xylan (2%)	145.42	38.74	91.96
Beechwood xylan (2.5%)	315.94	236.20	85.10
Birchwood xylan (2.5%)	340.41	284.75	55.39
Wheat bran (2%)	159.24	19.39	143.49

[a]Total fraction of additional carbon sources suspended in water without physical separation.
[b]Soluble supernatant of the total fraction separated by centrifugation.
[c]Insoluble precipitate of the total fraction separated by centrifugation.

Xylanase의 생산성을 증가시키는 효과가 높은 밀기울과 3종류의 xylan들을 각각 0.5–3.0% 범위로 첨가된 배지에서 효소 생산성을 조사하였다. 그 결과 Table 2에 보인 바와 같이 밀기울은 2%를 첨가하였을 때 170 U/ml로 효소 생산성이 가장 높았으며 2.5% 이상에서는 약간 감소하였다. Oat spelt xylan도 2%를 첨가하였을 때 133 U/ml로 효소 생산성이 가장 높았으며 0.5–3.0% 범위에서 첨가량에 따른 효소 생산성의 차이가 크지는 않았다. Birchwood와 beechwood xylan은 2.5% 첨가하였을 때 효소 생산성이 각각 341 U/ml와 314 U/ml로 가장 높았다.

Xylan이나 밀기울은 수용성 성분과 불용성 성분으로 구성되어 있는데 이들 중 어느 성분이 효소 생산성을 증가시키는지 확인하기 위해 효소 생산성을 최대로 하는 농도로 각 물질을 증류수에 현탁한 후 원심 분리하여 불용성 성분과 수용성 성분으로 분획하였다. 각 분획에 LB 배지를 첨가하여 xylanase 생산성을 조사한 결과 밀기울과 oat spelt xylan은 불용성 성분이 첨가된 배지에서 효소 생산성이 높았으며, birchwood xylan과 beechwood xylan은 수용성 성분이 함유

Table 4. Reducing sugar amount of additional carbon sources before and after enzymatic hydrolysis.

Additional carbon sources (10 mg/ml)	Reducing sugars (mg/ml)		Efficiency of hydrolysis (%)
	Before hydrolysis	After hydrolysis	
Oat spelt xylan	0.02	1.59	15.7
Beechwood xylan	0.16	2.09	19.3
Birchwood xylan	0.10	1.85	17.5
Wheat bran	0.19	0.99	8.0

된 배지에서 효소 생산성이 높았다(Table 3). 불용성과 수용성으로 구분하지 않고 전체를 첨가한 배지에서는 불용성과 수용성 성분이 따로 첨가된 배지에서 각각 생산된 xylanase 생산성의 합과 유사한 수준으로 효소가 생산되었다.

밀기울과 xylan들에 존재하는 환원당은 주로 수용성 성분에 존재한다. 밀기울과 xylan들에 존재하는 환원당의 양을 측정한 결과 밀기울에 포함된 소당류(3.7%)로 인하여[22] 밀기울의 환원당 함량이 가장 높았으며 xylan들 중에서는 beechwood, birchwood와 oat spelt xylan 순서로 환원당이 높았다(Table 4). 그러므로 밀기울과 oat spelt xylan의 경우 수용성 성분에 의한 xylanase 생산성 증가 정도가 낮은 것은 수용성 성분에 xylan 유래의 xylosyl 잔기를 함유한 당이 적은 때문으로 판단된다. Birchwood xylan과 beechwood xylan은 전체를 첨가하였을 때에 비해 수용성 성분에 의해 생산된 xylanase가 각각 83.6%와 74.8% 수준인 것으로 나타났다. Birchwood xylan은 beechwood xylan에 비해 환원당이 약 63% 수준인데 비해 수용성 성분에서 효소 생산성이 높은 것은 birchwood xylan에 xylanase 생산을 유도하는 물질이 많은 때문으로 판단된다.

B. pumilus SV-205는 밀기울이 첨가된 배지에서 6,000–8,500 U/ml의 매우 높은 수준으로 xylanase를 생산하였으며[16], *B. halodurans* PPKS02는 옥수수피를 1% 첨가한 배지에서 최대 85 U/ml의 생산성을 보였다[18]. *B. amyloliqufaciens*는 xylan이 첨가된 배지에서 xylanase 생산성이 증가되었으나 10.5 U/ml로 낮았다[19]. 목화밭에서 분리된 *B. mojavensis*는 밀기울 보다 귀리기울에서 생산성이 높으며 2%일 때 최대 생산성을 보였고[2], *B. aerophilus* KGJ는 고체 배양과정에서 밀기울과 볏짚을 첨가하였을 때 xylanase 생산성이 증가하였다[7]. 또한 xylose를 첨가하였을 때 *B. subtilis* AMX-4의 xylanase 생산성은 약 15배 정도 증가하여 YB-1301과 유사한 수준으로 효소 생산성이 증가되었으나 oat spelt xylan과 밀기울에 의한 증가 정도는 3.2배와 3.9배로 나타나 YB-1301과 큰 차이를 보였다[29]. 한편 cellulase를 생산하는 *Bacillus* sp. 79-28은 밀기울에서 효소 생산성이 증가하였는데 YB-1301과 같이 밀기울의 불용성 성분이 수용성 성분보다 효소 생산성 증가에 기여한 것으로 보고되었다[28]. YB-1301의 xylanase가 그 기질인 xylan들에 의해 생산성이 증가된 것처럼 *B. safensis* AS-08의 inulinase도 반응 기질인 다알리아 괴경의 이눌린에 의해 생산성이 증가된 것으로 알려졌다[21].

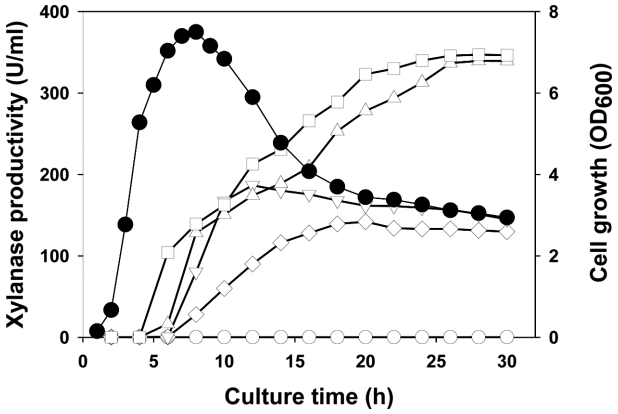

Fig. 1. Growth and xylanase production of *B. safensis* YB-1301. *B. safensis* YB-1301 was grown at 37℃ in LB medium with or without additional carbon sources. The cell growth (-●-) was determined by measuring absorbance of the cell culture grown in LB medium at wavelength of 600 nm. Xylanase activities of culture filtrates were determined in the reaction condition of pH 6.5 and 50℃. Xylanase productivities were indicated according to additional carbon sources as follows: none (-○-), oat spelt xylan (-◇-), beechwood xylan (-△-), birchwood xylan (-□-) and wheat bran (-▽-). Each curve for xylanase production represents the average of three independent experiments within standard errors of 3% between them.

균의 성장과 효소 생산성

배양시간에 따른 효소 생산성을 조사하기 위해서 부가 탄소원으로 xylan들과 밀기울을 최적 농도로 첨가한 LB 배지를 사용하였고, 균의 성장을 조사하기 위해서는 부가 탄소원이 첨가되지 않은 LB 배지를 사용하였다. 37℃에서 진탕 배양하면서 일정 시간마다 LB 배지의 배양액을 채취하여 흡광도를 측정한 결과 Fig. 1에 보인 바와 같이 균의 성장은 7–8시간만에 최대에 도달하였으며 그 후에는 사멸기로 진입하여 배양액의 흡광도가 감소하였다. LB 배지의 배양상등액에 존재하는 xylanase 활성을 조사한 결과 활성이 매우 낮은 수준이기는 하지만 30시간 배양할 때까지 꾸준히 증가하는 현상을 보였다.

배양시간이 4시간이 되었을 때 균의 성장이 중기 대수기 단계에 도달하였지만, xylan들이나 밀기울이 첨가된 배양액에 존재하는 xylanase 활성은 LB 배지와 유사한 수준으로 매우 낮았다. 밀기울과 oat spelt xylan의 첨가배지에서는 6시간 배양하였을 때도 LB 배지와 큰 차이가 없었으며 8시

간 배양하였을 때는 효소 생산성이 증가하기 시작하였다. 그러나 birchwood xylan과 beechwood xylan은 6시간 배양하였을 때부터 효소 생산성이 증가하기 시작하였고 특히 birchwood xylan에 의한 효소 생산성의 증가 정도가 높았다. 밀기울 첨가 배지에서는 12시간 배양시 최대 활성을 보였고 그 후에는 서서히 감소하였으며, ost spelt xylan 첨가 배지에서는 18–20시간까지 증가하다가 그 후에는 약간 감소하였다. Beechwood xylan 첨가 배지에서는 26시간까지, birchwood xylan 첨가 배지에서는 28시간까지 효소 생산성이 각각 증가하다가 그 후에는 30시간까지 큰 변화가 없이 유지되었다. 이와 같이 YB-1301은 배지내 첨가된 부가탄소원의 종류에 따라 효소 생산성 뿐 아니라 효소 생산단계, 효소 생산성이 최대에 이르는 배양 시간과 그 후 생산성의 감소와 유지되는 형태가 다른 것을 알 수 있다.

부가 탄소원의 종류에 따라 차이는 있지만 생육 정지기 단계에 이를 때부터 효소 생산이 시작되었고 그 후 급격하게 증가하여 사멸기에 이르기까지 지속적으로 효소 생산성이 증가한 것은 균의 성장 과정에서 항시적으로 생산되는 적은 양의 xylanase에 의해 배지에 첨가된 부가 탄소원의 xylan 성분이 xylose와 xylosyl 잔기를 포함한 소당류로 전환되고 이들이 균체내로 흡수되어 효소 생산을 유도하였을 것으로 예상되었다[17]. 밀기울 첨가배지에서는 최대 활성이 이르는 시간이 xylan들에 비해 짧은 것은 밀기울에 존재하는 xylan 함량이 적으므로 배양 중 배양액에 생성되는 xylan 가수분해 산물의 함량도 낮으므로 지속적으로 xylanase의 생산을 유도하지 못하기 때문으로 여겨진다. 이와 유사하게 다른 2종류 xylan들에 비해 oat spelt xylan이 첨가된 배지에서 20시간 이후에는 효소 생산성 지속적으로 증가하지 못하는 것도 oat spelt xylan에 존재하는 xylose 잔기 함량이 낮기 때문으로 판단된다. 더구나 birchwood xylan과 beechwood xylan이 첨가된 배지에서 효소 생산이 더 빠르게 유도되기 시작한 것은 이들 xylans의 수용성 성분이 배양 중 생성되는 xylanase에 의해서 빠르게 분해되어 xylanase 생산을 유도할 수 있는 소당류로 전환되었기 때문으로 추정된다.

낙타 배설물에서 분리된 *B. safensis* M35는 밀기울이 첨가된 배지에서 24시간만에 xylanase 생산성이 3.2 U/ml로 최대로 나타났으며[24], *B. pumilus* AJK는 밀기울(2%)가 첨가된 배지에서 60시간 배양하였을 때 xylanase 생산성이 300–330 U/ml에 이르는 것으로 보고되었다[9]. Keratinase를 균체외로 분비 생산하는 *B. safensis* LAU 13 [11]은 72시간 배양하였을 때 효소 생산이 최대에 이르고 그 후에는 서서히 감소하는 현상을 보였으며, *B. pumilus*의 xylanase 유전자를 함유한 *Kluyveromyces lactis*는 72시간 배양하였을 때 xylanase 생산성이 최대 180 U/ml로 나타났다[25]. 한편 *B. halodurans* PPKS와 *B. subtilils* YB-30은 YB-1301과는 달리 xylanase 생산성이 균의 성장과 연계하는 양상으로 증가하고 정지기에 최대에 도달하였다[18, 27].

Table 5. Induction of xylanase biosynthesis in *B. safensis* YB-1301 by enzymatically hydrolyzed products of xylans and wheat bran.

Additional substrates	Concentration (%)	Xylanase productivity (U/ml)[a]			
		Non-hydrolyzed substrates		Hydrolyzates	
		1 h	2 h	1 h	2 h
None		0.14	0.15	0.14	0.14
Oat spelt xylan	0.2	0.14	0.16	0.21	5.43
	1	0.15	0.20	3.87	30.78
Beechwood xylan	0.2	0.14	0.31	0.30	19.66
	1	0.16	3.63	3.04	41.03
Birchwood xylan	0.2	0.14	0.24	0.45	25.89
	1	0.16	4.28	4.34	43.05
Wheat bran	0.2	0.14	0.22	0.21	9.33
	1	0.16	0.25	1.29	23.36

[a]Xylanase productivity was determined at 1 h and 2 h after addition of non-hydrolyzed substrates or hydrolyzates to culture medium.

Xylan 가수분해 산물에 의한 Xylanase 생산 유도

배지내에 첨가된 xylan이 가수분해된 후 그 가수분해물이 xylanase의 생산성을 유도하는지 확인하기 위해 xylan들과 밀기울을 xylanase로 전처리한 후 가수분해물을 배지에 첨가하여 효소 생산성을 조사하였다. 밀기울 또는 xylan들의 가수분해 산물을 제조하기 위해서는 이들이 2% 첨가된 각 반응액에 모두 동량의 xylanase를 처리하여 45℃에서 약 5시간 반응을 실시하였다. Xylanase를 처리하기 전과 후의 반응액에 존재하는 환원당의 양을 조사한 결과 beechwood xylan, birchwood xylan, oat spelt xylan과 밀기울 순으로 가수분해에 의해 생성된 환원당의 양이 높은 것으로 확인되었다(Table 4).

LB 배지에 접종하여 진탕 배양을 하면서 균의 생육이 중기 대수기(OD_{600} = 4.5)에 이르렀을 때 효소로 전처리 하거나 전처리 하지 않은 부가 탄소원을 포함한 LB 배지와 균 배양액을 혼합하여 최종적으로 배양액에 부가 탄소원의 함량이 0.2%와 1.0%가 되도록 하였다. 이를 37℃에서 진탕 배양하면서 30분, 1시간, 2시간 마다 배양액을 채취하여 배양상등액에 존재하는 xylanase 활성을 조사하였다(Table 5). 그 결과 30분 배양액에서는 모든 배지에서 효소 생산이 거의 유도되지 않았으며(결과 미제시) 1시간이 되었을 때부터 첨가물 성분에 따라 xylanase 생산성에 차이를 보였다. 가수분해하지 않은 부가 탄소원을 첨가한 배지에서는 1시간 배양한

후에도 무첨가 배지와 거의 차이가 없었으며 2시간이 되었을 때 1%의 birchwood xylan과 beechwood xylan이 첨가된 배지에서 xylanase 활성이 증가하기 시작하여 4.3 U/ml과 3.6 U/ml로 나타났다. 그러나 가수분해하지 않은 부가 탄소원이 0.2% 첨가된 배지에서는 2시간 배양 후에도 무첨가 배지에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

효소 가수분해물을 0.2% 첨가한 배지에서 1시간 배양하였을 때 효소 생산성이 매우 미약하게 증가되었지만 1% 첨가한 배지에서는 분명하게 관찰되었다. 밀기울과 oat spelt xylan을 가수분해하지 않고 첨가한 배지에서 2시간 배양하였을 때 보다 가수분해물을 첨가한 배지에서 1시간 배양 하였을 때가 효소 생산성이 훨씬 높았다. 또한 birchwood xylan과 beechwood xylan 가수분해 산물을 첨가한 배지의 1시간 배양액에 존재하는 효소활성이 가수분해하지 않은 xylan들을 첨가한 배지의 2시간 배양액에 존재하는 효소활성과 유사한 수준이었다. 이와 같이 가수분해물을 첨가한 배지에서 효소가 빨리 생산되는 것으로 보아 xylan 가수분해 산물이 xylanase의 생산을 유도한 것으로 판단된다. 그리고 xylanase 생산이 유도되는 시간이 xylan 가수분해 산물의 첨가량에 따라 차이가 있으며 최소 1시간 이상 걸리는 것으로 보아 xylan 가수분해 산물이 일정량 이상 균체로 운반되어 xylanase 유전자의 전사를 촉진하는 것으로 보인다[17].

가수분해 산물을 첨가한 배지에서 2시간 배양 후에는 부가 탄소원의 종류와 첨가량에 따라 효소 생산성에 큰 차이를 보였다. Oat spelt xylan의 경우는 0.2%를 첨가하였을 때보다 1%를 첨가하였을 때 약 6배 이상의 활성에 차이가 있었으며, 밀기울의 경우 oat spelt xylan와 비교하였을 때 첨가량이 0.2%일 때는 oat spelt xylan 보다 높았으나, 1%일 때는 낮은 것으로 나타났다.

한편 birchwood xylan과 beechwood xylan의 가수분해물을 0.2%로 첨가하였을 때 각각의 효소 생산성은 25.9 U/ml과 19.7 U/ml이며 이는 oat spelt xylan (1.0%) 가수분해물에 의한 효소 생산성 대비 약 84%와 64%이고 밀기울(1.0%)의 가수분해물에 비해서 약 110%와 84% 수준이었다. Xylanase에 의해 가수분해되어 생성된 환원당을 기준으로 oat spelt xylan (1%)과 밀기울(1%) 가수분해물과 각각 비교하였을 때 0.2% birchwood xylan 가수분해물에 존재하는 환원당은 23%와 45%, 0.2% beechwood xylan 가수분해물에는 24%와 48% 수준의 환원당이 존재하였다. 그런데 birchwood xylan와 beechwood xylan 가수분해물(0.2%)을 첨가한 배지에서 효소 생산성의 비율이 환원당의 비율보다 높은 것은 밀기울이나 oat spelt xylan보다 birchwood xylan과 beechwood xylan 가수분해물의 성분의 차이 때문으로 판단되며, 이와 유사하게 가수분해물의 환원당 함량이 beechwood xylan 보다 적은 birchwood xylan 가수분해물에 의한 효소 생산성이 더 증가한 것도 birchwood xylan 가수분해산물에 *B. safensis*의 xylanase 생산을 효율적으로 유도하는 물질이 상대적으로 많이 존재하기 때문으로 여겨진다.

본 연구에서는 xylan 가수분해물 중에서 어떠한 물질이 xylanase 생합성을 유도하는지 확인되지 않았지만, *Thermoascus aurantiacus*의 xylanase는 xylobiose에 의해 생산이 유도되며 또한 낮은 농도의 xylose에 의해서도 생산이 유도된다고 알려져 있으며[4], *Cryptococcus albidus*의 xylanase도 xylobiose의 유사물질이며 대사가 되지 않는 β-methylxyloside에 의해 유도되는 것으로 보고되었다[15].

Xylanase의 반응 특성

YB-1301에 의해 생산된 xylanase의 특성을 조사하기 위해 xylanase의 생산성이 높은 birchwood xylan을 첨가한 LB 배지에서 얻은 배양상등액을 효소액으로 사용하였다. 효소를 정제하지 않았으므로 배양상등액에 β-xylosidase, α-arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase, α-glucuronidase 및 ferulic acid esterase와 같은 xylan 분해에 관여하는 효소들이 존재할 경우 xylanase의 반응성에 영향을 미칠 가능성은 있지만 xylanase 생산성이 높은 배지를 사용함으로써 그 가능성을 줄이고자 하였다. 반응 pH와 온도가 배양 상등액의 xylanase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 최적 반응

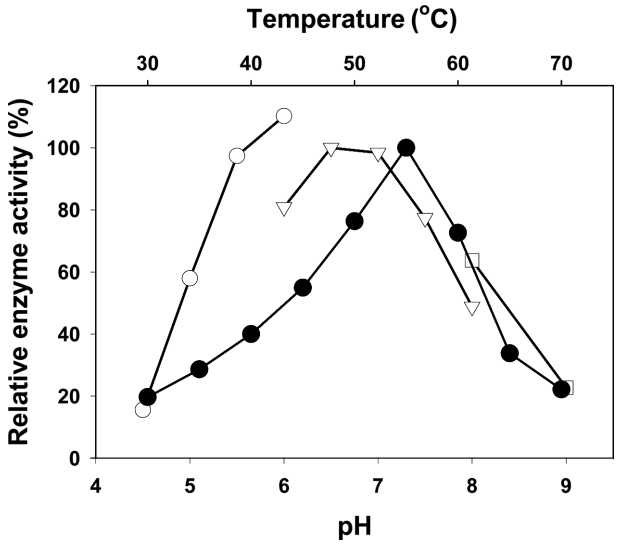

Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the xylanase activity. Temperature profile (-●-) was obtained by measuring the xylanase activity with a fixed pH 6.5 at different temperatures. The reactions were done at various pHs and 55 ℃ for determining the pH profile. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (pH 4.5–9.0, -○-), sodium phosphate (pH 6.0–8.0, -▽-), Tris (pH 8.0–9.0, -□-). Each curve for pH and temperature profiles represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1605.05004

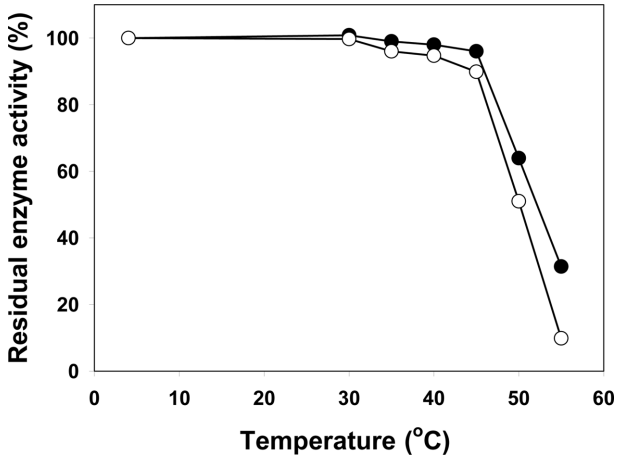

Fig. 3. Thermostability of the xylanase in culture filtrate. Thermostability was determined by measuring the residual activities of xylanase after pre-incubations for 30 min (-●-) and 1 h (-○-) at the different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

조건이 55℃와 pH 6.5–7.0으로 확인되었으며, 인산완충용액에서 보다는 citrate 완충용액에서 활성이 높게 나타났다(Fig. 2).

열안정성을 조사하기 위해서 배양상등액을 여러 온도에서 30분과 1시간 동안 각각 방치한 후에 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 3에 보인 바와 같이 40℃ 이하에서는 1시간 방치한 후에도 95%의 잔존활성을 보였으며, 45℃ 이하에서 30분간 방치하였을 때는 거의 실활이 되지 않았다. 그러나 50℃ 이상에서는 급격하게 실활되었으며 50℃에서 1시간 방치하였을 때 50% 잔존활성을 보였다.

*B. safensis*는 2006년도에 처음 분류되었으므로 이 균주가 생산하는 xylanase 반응특성에 대해 보고된 바가 거의 없으나, 이와 유사도가 매우 높은 *B. pumilus* 균주의 xylanase 특성은 알려진 바가 있다. *B. pumilus* SSP-34의 xylanase는 50℃와 pH 6.0에서 최대 활성을 보이며 50℃ 이하에서 30분간 방치하였을 때 안정하였고[23], 알칼리성 *B. pumilus* BYG의 xylanase는 50℃와 pH 8.0–9.0에서 최대활성을 보이고 55℃에서 30분간 방치하였을 때 잔존활성이 55% 미만이었다[26]. *K. lactis* 재조합 균주로부터 생산된 *B. pumilus* MTCC 5015의 xylanase는 50–60℃와 pH 9.0–10.0에서 최대활성을 보이고 60℃ 이하에서 1시간 방치하여도 실활되지 않았으며[25], *B. safensis* M35의 xylanase는 60℃에서 반감기는 약 30분으로 보고되어[24] *B. safensis* YB-1301의 xylanase는 이들 효소에 비해 열안정성이 낮은 것으로 확인되었다. 또한 *B. pumilus* 그룹의 *B. aerophilus* KGJ 균주에 의해 생산되는 xylanase는 70℃와 pH 4.0에서 최대활성을 보여 YB-1401의 효소와 반응 특성에 큰 차이를 보였다[7].

요 약

왕겨를 탄소원으로 사용하여 증균 배양을 실시함으로써 국내 사찰에서 제조된 된장으로부터 xylan 분해능 우수한 균주를 분리하였다. 분리균 YB-1301은 DNA gyrase subunit B 유전자(*gyrB*)의 염기서열에 근거하여 *Bacillus safensis*로 동정되었다. *B. safensis* YB-1301을 밀기울 또는 여러 종류의 xylan들이 첨가된 배지에서 배양하였을 때 xylanase의 생산성이 급격하게 증가되었다. 특히 birchwood xylan이 첨가된 LB 배지에서 플라스크 배양을 하였을 때 최대 340 U/ml 이상의 xylanase 생산성을 보였다. Xylan이 첨가되지 않은 LB 배지에서는 매우 소량의 xylanase가 균의 성장과 연계되어 항시적으로 생산되지만, xylan이 첨가된 배지에서는 정지기 생육단계에서 xylanase의 생산이 크게 유도되었다. 더구나 xylanase 생합성은 가수분해되지 않은 xylan 보다 xylan의 효소적 가수분해 산물에 의해 더 빠르게 유도되었다. 또한 *B. safensis* YB-1301의 배양상등액에 존재하는 xylanase는 55℃와 pH 6.5–7.0의 반응조건에서 최대활성을 나타냈다.

References

1. Agbobatinkpo PB, Thorsen L, Nielsen DS, Azokpota P, Akissoe N, Hounhouigan JD, *et al.* 2013. Biodiversity of aerobic endospore-forming bacterial species occurring in Yanyanku and Ikpiru, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. *Int. J. Food Microbiol.* **163**: 231-238.
2. Akhavan Sepahy A, Ghazi S, Akhavan Sepahy M. 2011. Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural waste. *Enzyme Res.* doi 10.4061/2011/593624.
3. Branquinho R, Meirinhos-Soares L, Carrico JA, Pintado M, Peixe LV. 2014. Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. *FEMS Microbiol. Ecol.* **90**: 689-698.
4. Brienzo M, Monte JR, Milagres AM. 2012. Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 113-119.
5. Bruton RA, Fincher GB. 2012. Current challenges in cell wall biology in the cereals and grasses. *Frontiers Plant Sci.* doi 10.3389/fpls.2012.00130.
6. Coil DA, Neches RY, Lang JM, Brown WE, Severance M, Cavalier D, Eisen JA. 2016. Growth of 48 built environment bacterial isolates on board the International Space Station (ISS). *Peer J.* doi 10.7717/peerj.1842.

7. Gowdhaman D, Manaswini VS, Jayanthi V, Dhanasri M, Jeyalakshmi G, Gunasekar V, *et al*. 2014. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. *Int. J. Biol. Macromol*. **64**: 90-98.
8. Haddar A, Driss D, Frikha F, Ellouz-Chaabouni S, Nasri M. 2012. Alkaline xylanases from *Bacillus mojavensis* A21 production and generation of xylooligosaccharides. *Int. J. Biol. Macromol*. **51**: 647-656.
9. Kaur A, Singh A, Dua A, Mahajan R. 2016. Cost-effective and concurrent production of industrially valuable xylano-pectinolytic enzymes by a bacterial isolate *Bacillus pumilus* AJK. *Prep. Biochem. Biotechnol*. doi: 10.1080/10826068.2016.1155059.
10. Kpikpi EN, Thorsen L, Glover R, Dzogbefia VP, Jespersen L. 2014. Identification of *Bacillus* species occurring in Kantong, an acid fermented seed condiment produced in Ghana. *Int. J. Food Microbiol*. **180**: 1-6.
11. Lateef A, Adelere IA, Gueguim-Kana EB. 2015. *Bacillus safensis* LAU 13 a new source of keratinase and its multi-functional biocatalytic applications. *Biotechnol. Biotechnol. Equip*. **29**: 54-63.
12. Liu Y, Lai Q, Dong C, Sun F, Wang L, Li G, Shao Z. 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS One* **8**: e80097.
13. Maes C, Delcour JA. 2002. Structural characterisation of water extractable and water unextractable arabinoxylans in wheat bran. *J. Cereal Sci*. **35**: 315-326.
14. McCleary BV, McKie VA, Draga A, Rooney E, Mangan D, Larkin J. 2015. Hydrolysis of wheat flour arabinoxylan, acid-debranched wheat flour arabinoxylan and arabino-xylo-oligosaccharides by β-xylanase, α-L-arabinofuranosidase and β-xylosidase. *Carbohydr. Res*. **407**: 79-96.
15. Morosoli R, Durand S, Letendre ED. 1987. Induction of xylanase by β-methylxyloside in *Cryptococcus albidus*. *FEMS Microbiol. Lett*. **48**: 261-266.
16. Nagar S, Mittal A, Kumar D, Gupta VK. 2012. Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. *Int. J. Biol. Macromol*. **50**: 414-420.
17. Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorin DS. 2005. Xylanases from fungi properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **67**: 577-591.
18. Prakash P, Jayalakshmi SK, Prakash B, Rubul M, Sreeramulu K. 2012. Production of alkaliphilic, halotolerent, thermostable cellulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste single step purification and characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **28**: 183-192.
19. Saleem M, Aslam F, Akhtar MS, Tariq M, Rajoka MI. 2012. Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus* sp. and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **28**: 513-522.
20. Satomi M, La Duc MT, Venkateswaran K. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **56**: 1735-1740 .
21. Singh RS, Singh RP. 2014. Response surface optimization of endoinulinase production from a cost effective substrate by *Bacillus safensis* AS-08 for hydrolysis of inulin. *Biocatal. Agric. Biotechnol*. **3**: 365-372.
22. Stevenson L, Phillips F, O'sullivan K, Walton J. 2012. Wheat bran its composition and benefits to health, a European perspective. *Int. J. Food Sci. Nutr*. **63**: 1001-1013.
23. Subramaniyan S. 2012. Isolation, purification and characterisation of low molecular weight xylanase from *Bacillus pumilus* SSP-34. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **166**: 1831-1842.
24. Thite VS, Nerurkar AS. 2015. Xylanases of *Bacillus* spp. isolated from ruminant dung as potential accessory enzymes for agro-waste saccharification. *Lett. Appl. Microbiol*. **60**: 456-466.
25. Thomas L, Ushasree MV, Pandey A. 2014. An alkali-thermostable xylanase from *Bacillus pumilus* functionally expressed in *Kluyveromyces lactis* and evaluation of its deinking efficiency. *Bioresour. Technol*. **165**: 309-313.
26. Wang J, Zhang WW, Liu JN, Cao YL, Bai XT, Gong YS, *et al*. 2010. An alkali-tolerant xylanase produced by the newly isolated alkaliphilic *Bacillus pumilus* from paper mill effluent. *Mol. Biol. Rep*. **37**: 3297-3302.
27. Yoon KH. 2015. Production and properties of mannanase and xylanase by a *Bacillus subtilis* isolate. *Microbiol. Biotechnol. Lett*. **43**: 204-211.
28. Yoon KH, Jung KH, Park SH. 1997. Isolation and enzyme production of a cellulase-producing *Bacillus* sp. 79-23. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. **25**: 546-551.
29. Yoon KH, Seol SJ, Cho HC, Lee MS, Choi JH, Cho KH. 2002. Isolation and enzyme production of a xylanase-producing strain, *Bacillus* sp. AMX-4. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. **30**: 123-128.