

두 종류 *Bacillus*속 균주의 Xylanases 특성 비교

진현경, 윤기홍*

우송대학교 바이오식품과학전공

Received: August 3, 2016 / Revised: August 17, 2016 / Accepted: August 19, 2016

Comparative Characterization of Xylanases from Two *Bacillus* Strains

Hyun Kyung Jin and Ki-Hong Yoon*

Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 34606, Republic of Korea

Two xylanase genes were cloned into *Escherichia coli* from *Bacillus* sp. YB-1401 and *B. amyloliquefaciens* YB-1402, which had been isolated as mannanase producer from home-made doenjang, respectively, and their nucleotide sequences were determined. Both xylanase genes consisted of 642 nucleotides, encoding polypeptides of 213 amino acid residues. The deduced amino acid sequences of the YB-1401 and YB-1402 xylanase, designated Xyn1401 and Xyn1402, differed from each other by single amino acid residue, Asn for Xyn1401 and Lys for Xyn1402, corresponding to amino acid position of 127. Their amino acid sequences were highly homologous to those of xylanases belonging to the glycosyl hydrolase family 11. The 28 amino acid stretch in the N-terminus of both enzymes was predicted as signal peptide by SignalP4.1 server. Both xylanases were localized at the level of 91–94% in culture filtrate of the recombinant *E. coli* cells, suggesting they were secreted efficiently in *E. coli* cells. The optimal reaction conditions were 50°C and pH 6.0 for Xyn1401, and 55°C and pH 6.5 for Xyn1402, respectively, indicating one amino acid difference from each other affected pH and temperature profiles of their activities. In addition, their thermostabilities were somewhat different from each other.

Keywords: *Bacillus*, cloning, comparison, properties, xylanase

목재, 초본류와 곡류를 두루 포함한 식물에서 반섭유소 형태로 존재하는 xylan은 D-xylose 잔기간에 β -1,4 배당결합의 골격을 하고 있는 다당류이다. Xylan의 분해에는 여러 종류의 효소가 관여하며 이들 중 D-xylosyl 잔기간 배당결합을 무작위로 절단하는 endo- β -1,4-xylanase (xylanase)가 가장 중요한 작용을 한다. Xylanase를 생산하는 다수의 미생물이 분리되고, 효소 생산성, 효소 특성 및 그 유전자에 대한 연구가 꾸준히 수행되어 glycosyl hydrolase family (GH) 2, 5, 7, 8, 10, 11, 16, 30, 35, 43, 52와 62에 널리 분포해서 속하는 xylanases가 알려졌다. Xylanase는 식품분야, 사료분야, 제지와 펄프분야, 직물 가공분야 및 바이오매스 당화분야와 같이 여러 산업분야에서 활용되고 있다. *Aspergillus*, *Trichoderma*와 같은 균류나 *Bacillus* 속 균주가 xylanase의

생산균으로 사용되고 있으며, xylanase의 산업적 활용성을 증가시키기 위해 효소 생산성이 향상된 균주의 개발, 효소의 특성 개량이나 고정화 효소의 개발 등의 다양한 접근이 진행되고 있다. *Bacillus* sp. YB-1401과 *B. amyloliquefaciens* YB-1402는 서로 아미노산 배열이 유사한 mannanase를 생산하는 것으로 보고되었으며[4], xylanase도 생산하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 이들 균주로부터 xylanase 유전자를 클로닝하고 재조합 대장균이 생산하는 xylanase의 반응 특성을 비교하고자 하였다.

중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용하여 두 균주로부터 xylanase 유전자를 클로닝 하기 위해서 *B. subtilis* 또는 *B. amyloliquefaciens*의 xylanase 유전자 정보를 (Genbank accession no. CAD60654, AAD10834, AAL32473, ADK92885, ABA64459, ACX32454, CAA41783) 비교 분석하여 PCR 반응으로 완전한 구조유전자의 증폭이 가능한 염기서열로 구성된 oligonucleotide를 primer로 설계하였다. Upper primer (BCSG2-1F; 5'-GCTRCCTCATGTCAAAGTCAGAA-3')는

*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

개시코돈으로 예상되는 지점으로부터 약 20개 nucleotides가 앞으로 떨어져 있는 상부지역 서열에 해당하며 lower primer (BCSG2-R; 5'-CCCCTVATTAARRATRAKCTGTTA-3')는 종결코돈의 염기를 포함하며 그 하부 지역에 해당하는 서열이다. Xylanase 유전자에 따라 염기서열이 다른 부분도 있어 degenerated primers로 제작하였다.

Bacillus sp. YB-1401과 *B. amyloliquefaciens* YB-1402의 유전체는 genomic DNA prep kit (Solgent, Korea)로 분리하여 주형 DNA로 사용하였으며, primers BCSG2-1F/R과 혼합하여 *Pfu-X* DNA polymerase로 xylanase 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 95°C에서 3분간 열처리한 후 95°C에서 30초, 57°C에서 40초, 72°C에서 1분간 반응을 30회 반복하고 최종적으로 72°C에서 20분간 방치하여 수행하였다. 그 결과 약 0.7 kb 크기로 증폭된 DNA를 얻었고 이를 *HincII*로 절단된 pUC19와 ligation한 후 *Escherichia coli* DH5a에 도입하였다. 형질전환된 *E. coli*를 oat spelt xylan (OSX,

0.5%)과 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 LB 평판배지에 배양하여 xylan 분해능이 있는 재조합 균주를 선별하였다. PCR 과정 중 변이가 발생하였는지 여부를 조사하기 위해 YB-1401과 YB-1402로부터 xylanase 유전자가 클론된 형질전환주를 각각 3주씩 선별하여 플라스미드 DNA를 분리하고 그 염기서열을 결정하였다. 그 결과 동일한 균주에서 유래된 xylanase 유전자의 염기서열은 동일한 것으로 나타났으며 PCR 과정 중에 변이가 일어나지 않은 것이 확인되었다. YB-1401 (*xyn1401*, KX620014)과 YB-1402 (*xyn1402*, KX620015)의 xylanase 유전자는 213개 아미노산으로 구성된 단백질을 동일하게 코드하였으며, 구조 유전자는 서로간 6개의 염기서열이 달랐다. 한편 PCR로 클로닝된 *B. subtilis* cho40 (ADN03187)와 *B. subtilis* ABGx (AFV73208)의 xylanase 유전자는 아미노 말단지역이나 카르복실 말단지역에 상응하는 염기서열이 누락되어 완전한 구조유전자의 서열이 확인되지 않았다[5, 13]. 이로 보아 본 실험에서 설계된 BCSG2-

YB1	<i>MFKFKKKFLVGLTAAFMSTSMFSATASAGTDYWNQWTDGGTVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNYLTYGWTRAPL</i> E YVVV	110
YB2	*****	110
CH4	-----*****	99
AM4	*****S*****	110
YA1	*****S*****S*****I*****	110
BS8	*****S*****S*****I*****	110
AB3	---*****S*****S*****I*****	106
BP7	***T*****N***N*****A*****	110
YJ6	*****S*****S*****I*****S*****	110
MS5	*****S*****K**S*****A*****	110
YB1	DSWGTYRPTGYKGTVNSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDNITFTQYWSVRQSKRPTGSNAATFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVLAT E GYKSSGSSNVTW	213
YB2	*****K*****	213
CH4	*****K*****T*****M*****	202
AM4	*****T***I*****S*****	213
YA1	*****K*****R*****T*****	213
BS8	*****K*****R*****T*****M*****	213
AB3	*****K*****R*****T*****T*	206
BP7	*****Y*****V*****D*****K*****RY*****S*****	213
YJ6	*****K*****E*PK*****K*****K*****I*S*****	213
MS5	*****Y*****K*****E*QHS*****R*****N**K*****K*****I*S*****	213

Fig. 1. Amino acid sequence comparison of the Xyn1401 and Xyn1402 with others. The amino acid sequences of eight xylanases from *B. subtilis* strains cho40 (CH4; ADN03187), AMX-4 (AM4; ACT79298), ABGx (AB3; AAFV73208), and *Bacillus* strains YA-14 (YA1; CAA41783), BP-7 (BP7; CAD60654), YJ6 (YJ6; ACR47980), and *B. subtilis* (BS8; ABW87792), and *B. licheniformis* MS5-14 (MS5; ACF05486) are aligned with Xyn1401 (YB1) and Xyn1402 (YB2) by introducing gaps (hyphens) to maximize similarities. Residues identical to the amino acid sequence of the Xyn1401 are indicated by asterisks in other sequences. Signal peptide is italicized and two catalytic residues are shown with square boxes. Residues reported to be related with thermostability are indicated by bold characters and underlines. Numbers at the end of each line correspond to the amino acid position in the xylanases.

1F와 BCSG2-R은 xylanase 구조유전자를 완전하게 증폭하기에 유용한 primers로 여겨진다.

클론된 유전자의 염기서열로부터 유추된 Xyn1401과 Xyn1402의 아미노산 배열은 127번째의 Asn과 Lys을 제외하고는 모두 동일하였다. SignalP4.1 프로그램으로 분석한 결과 두 효소의 signal peptide는 아미노 말단의 28개 아미노산으로 동일하게 구성된 것으로 예측되었다. 재조합 대장균의 배양상등액으로부터 정제된 *Bacillus* sp. YJ6의 xylanase는 아미노 말단 배열이 ASTDYWQN로 보고되었으며[13], 이 배열은 Xyn1401과 Xyn1402의 signal peptide 바로 다음에 배열된 AGTDYWQN에 해당하였다. 그러므로 SignalP4.1 프로그램으로 예측된 Xyn1401과 Xyn1402의 signal peptide는 타당한 것으로 판단된다. Xyn1401과 Xyn1402의 아미노산 배열을 NCBI database에서 다른 단백질의 아미노산 배열과 비교한 결과 GH11에 속하는 xylanase와 매우 높은 상동성을 보였으며, 동일한 배열을 갖는 xylanase도 확인되었다. 상동성이 높은 xylanase는 대부분이 유전체 서열로부터 유추된 것으로 효소 특성에 대해서는 보고되지 않은 실정이다. 그러므로 아미노산 배열의 차이와 효소 반응특성 사이의 관계를 비교하기 위해 효소에 대한 연구가 진행된 xylanase의 아미노산 배열을 Xyn1401과 Xyn1402와 비교하였다(Fig. 1). Signal peptide 부분을 제외하고 mature 단백질 부분만을 기준으로 하였을 때 Xyn1401과 Xyn1402의 아미노산 배열은 *B. amyloliquefaciens* CH51 [1] (1/0 잔기), *B. subtilis* cho40 [5] (3/2 잔기), *B. subtilis* AMX-4 [14] (3/4 잔기), *Bacillus* sp. YA-14 [16] (5/4 잔기), *B. subtilis* [3] (6/5 잔기), *B. subtilis* ABGx [10] (6/5 잔기), *Bacillus* sp. BP-7 [2] (9/9 잔기), *Bacillus* sp. YJ6 [13] (11/10 잔기)과 *B. licheniformis* MS5-14 [6] (16/16 잔기)의 xylanase와 차이가 있었다. 한편 GH11에 속하는 xylanase의 활성잔기가 *B. circulans*의 xylanase에서 106Glu와 200Glu로 보고되었으며[11], *B. subtilis*의 xylanase는 Q7H/N8F/S179C 변이 또는 Q7H/G13R/S22P/S179C 변이에 의해 열안정성이 크게 향상되어 이들 아미노산 잔기 지점이 효소의 열안정성과 관련성이 있는 것으로 확인되었다[8, 9]. Xyn1401과 Xyn1402를 포함하여 이와 비교된 다른 xylanases에서 이들 주요 잔기가 모두 동일하게 배열된 것으로 나타났다.

pUC19의 *HincII* 위치에 클로닝된 *xyn1401*과 *xyn1402* 유전자는 *lac* promoter와 동일한 방향으로 삽입되어 있었으며, 이들 재조합 플라스미드를 함유한 *E. coli* DH5 α 형질전환주를 배양하여 xylanase를 생산하였다. 재조합 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 12시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액과 균체파쇄상등액에 존재하는 Xyn1401과 Xyn1402의 활성을 측정할 결과 94.1%와 91.0%가 균체외로 분비됨이 확인되었다. 이러한 결과는 재조합 대장균에서 생

산되는 YB-1401과 YB-1402의 mannanase가 대부분 균체내에 존재하는 것과는 크게 달랐다[4]. Xyn1401과 Xyn1402의 특성을 조사하기 위해 재조합 대장균의 배양상등액을 ammonium sulfate (30–70%)로 처리한 후 침전된 단백질을 10 mM sodium phosphate (pH 6.0) 완충액으로 투석하여 조효소액을 제조하였다. Xylanase 활성을 측정하기 위해서 OSX (0.5%)와 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0 또는 6.5)를 포함한 반응액에 조효소액을 첨가하고 50°C에서 15분 동안 반응을 수행한 후 생성된 환원당을 DNS 방법

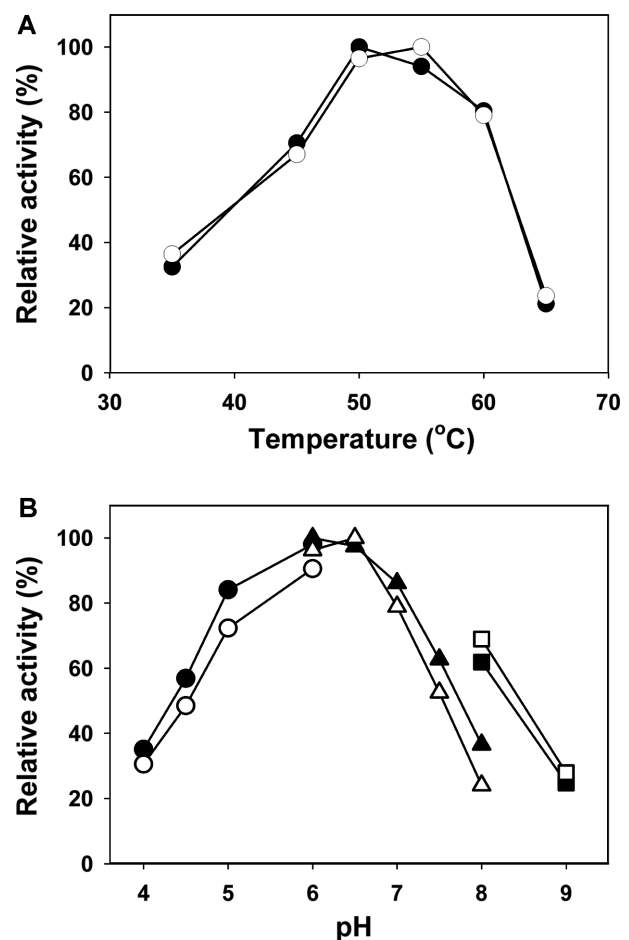


Fig. 2. Temperature and pH optima of Xyn1401 and Xyn1402. Temperature profiles (A) were obtained by measuring the xylanase activities at different temperatures with fixed pH 6.0 for Xyn1401 (-●-) or pH 6.5 for Xyn1402 (-○-). The pH profiles (B) were obtained by measuring the xylanase activities of Xyn1401 (closed) and Xyn1402 (open) at various pH's with a constant temperature of 50°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (circles, pH 4.5–6), sodium phosphate (reverse triangles, pH 6–8), and Tris (squares, pH 8–9). Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

으로 결정하였다. 반응 pH에 따른 xylanase 활성을 조사하기 위해서는 반응온도를 50°C로 고정하고 반응액 pH를 달리하여 반응을 수행한 후 생성된 환원당을 정량 하였으며 완충액으로는 50 mM sodium citrate (pH 4.0–6.0), 50 mM sodium phosphate (pH 6.0–8.0)와 Tris (pH 8.0–9.0)가 사용되었다. Xyn1401은 50°C와 pH 6.0, Xyn1402는 55°C와 pH 6.5에서 각각 최대 활성을 보여 두 효소간에 최적 반응조건이 차이를 보였다(Fig. 2). 카르복실 말단에 hexahistidine이 융합된 형태로 재조합 대장균으로부터 생산된 *B. amyloliquefaciens* CH51의 xylanase는 Xyn1402와 동일한 배열을 갖는 효소이지만 pH 4.0과 25°C에서 최대활성을 갖는 것으로 보고되어 Xyn1402와 매우 큰 차이를 보였다[1]. 이는 hexahistidyl 잔기가 융합된 때문일 수 있으나 다른 효소들의 경우 이와 같이 큰 변화를 일으킨 예가 보고된 바 없었다. *Paenibacillus* sp. DG-22의 xylanase는 카르복실 말단에 hexahistidine이 융합되어도 유사한 아미노산 배열을 갖는 xylanase와 비교하였을 때 최적 반응온도와 pH가 거의 동일한 것으로 보고되었다[7]. Xyn1401이나 Xyn1402와 아미노산 배열이 유사한 *B. subtilis* CXJZ (pH 5.8, 60°C), *B. subtilis* cho40 (pH 6, 60°C), *Bacillus* sp. YJ6 (pH 5.0, 50°C), *B. subtilis* AMX-4 (pH 6–7, 50–55°C), *B. licheniformis* MS5-14 (pH 6, 40–45°C)와 *Bacillus* sp. BP-7 (pH 6, 60°C)의 xylanase는 최적 반응조건이 약간씩 차이를 보였다.

Xyn1401과 Xyn1402의 열안정성을 비교하기 위해서 실험 정도의 차이를 측정하기에 적절한 온도(48°C, 50°C)에서 시간을 달리하여 효소를 방치하면서 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Xyn1401과 Xyn1402의 반감기는 48°C에서 25분과

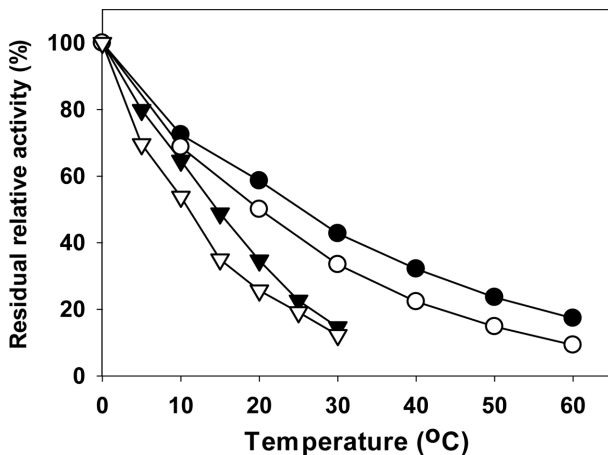


Fig. 3. Thermostability of the Xyn1401 and Xyn1402. Thermostability was determined by measuring the residual activities of Xyn1401 (closed) and Xyn1402 (open) after pre-incubations for various times at 48°C (circle) and 50°C (reverse triangle), respectively. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

20분, 50°C에서는 14분과 11분으로 각각 확인되어 Xyn1402보다 Xyn1401이 열에 안정한 것으로 나타났다(Fig. 3). 최적 반응온도는 Xyn1402가 높은데도 불구하고 Xyn1401보다 열안정성이 낮은 것은 Xyn1402의 경우 기질과 혼합되어 있을 때가 기질이 없을 때 보다 높은 온도에서도 안정성이 증가되어 최적 반응온도가 높아졌을 수 있다. *Cellulosimicrobium* sp. YB-43으로부터 생산된 mannanase C는 기질과 혼합하지 않은 상태로 30°C에서 1시간 동안 방치하였을 때 잔존 활성이 50% 이하로 감소하였고 40°C에서 1시간 동안 방치할 경우에는 완전히 실패되었지만 기질인 locust bean gum과 혼합된 상태에서 최적 반응온도가 65°C로 나타났는데 이는 기질이 존재하면 고온에서도 효소 활성이 유지된 때문으로 판단되었다[15]. Xyn1402와 동일한 *B. amyloliquefaciens* CH51의 xylanase는 모균주에서 생산된 경우는 Xyn1402보다 열안정성이 높았고 재조합 대장균에서 생산된 경우 Xyn1402보다 열안정성이 낮은 것으로 나타났다[1]. 한편 *B. amyloliquefaciens*의 xylanase는 한 지점변이(S138T)에 의해 최적 반응조건이 pH 6.0과 55°C에서 pH 5.0과 50°C로 변화되었을 뿐 아니라 열안정성이 증진된 것으로 보고되었다[12]. 이와 같이 한 개의 아미노산 잔기의 차이에 의해 변이체의 특성이 변화한 양상은 Xyn1401과 Xyn1402의 최적 반응조건과 열안정성의 차이와 유사하다고 하겠다.

Xyn1401과 Xyn1402의 기질 특이성을 조사하기 위해 xylan, carboxymethyl cellulose (CMC)와 locust bean gum (LBG)을 0.5% 농도로 하여 최적 반응 pH에서 각각 반응을 수행하였다. 그 결과 Xyn1401과 Xyn1402는 beechwood xylan (BeX), birchwood xylan (BiX), arabinoxylan (AX)과 OSX를 유사하게 분해하여 기질별로 활성의 차이가 크지 않았으며 LBG와 CMC는 분해하지 못하였다(Table 1). *Bacillus* sp. YJ6, *B. subtilis* AMX-4와 *Bacillus* sp. BP-7의 xylanases는 xylan의 종류에 따른 활성의 차이가 Xyn1401이나 Xyn1402보다 크며 OSX에 대한 활성은 가장 낮았다[2, 13, 14]. 이와 달리 Xyn1401과 Xyn1402는 다른 기질에 비해

Table 1. Substrate specificity of the crude xylanase (Xyn1401 and Xyn1402).

Substrates	Relative activity (%)	
	Xyn1401	Xyn1402
Oat spelt xylan	100.0	100.0
Beechwood xylan	105.4	109.8
Birchwood xylan	99.5	97.6
Arabinoxylan	105.7	103.4
Locust bean gum	ND	ND
Carboxymethylcellulose	ND	ND

ND, not detected.

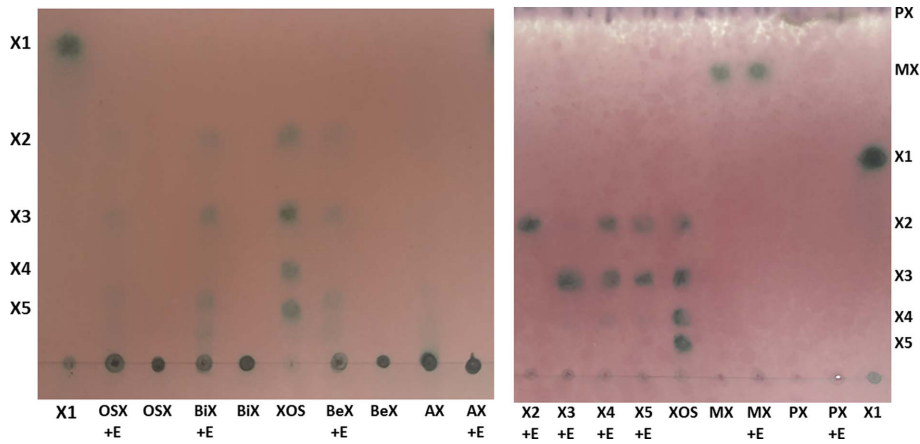


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β -1,4-linked xylooligosaccharides and xylans with Xyn1401. The reaction mixtures containing the crude xylanase and xylooligosaccharides or xylans in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were incubated for 5 h at 40 °C. XOS stands for standard xylooligosaccharides indicated by X2 (xylobiose), X3 (xylotriose), X4 (xylotetraose) and X5 (xylopentaose) at left or right sides of both panels. X1, xylose; MX, methyl xylose; PX, phenyl xylose; OSX, oat spelt xylan; BiX, birchwood xylan; BeX, beechwood xylan; AX, arabinoxylan; E, xylanase.

BiX에 대한 활성이 낮은 편이었다.

자일로올리고당 (XOS)과 xylans의 가수분해 산물을 조사하기 위해 최적 pH로 조절된 반응액에 XOS, methyl xylose, phenyl xylose 또는 xylan을 기질로 첨가하고 과량의 효소를 처리하여 45°C에서 4시간 동안 반응을 실시한 후 반응산물을 TLC로 분석하였다. 그 결과 Xyn1401은 Fig. 4에 나타난 바와 같은 반응 산물을 생성하였으며, Xyn1402도 Xyn1401과 동일한 반응 산물을 생성하였다(결과 미제시). Methyl xylose, phenyl xylose와 xylobiose (X2)는 분해되지 못하였고 xylotriose (X3)는 매우 미약하게 분해되었다. Xylotetraose (X4)와 xylopentaose (X5)는 X2와 X3으로 분해되었으며 xylose는 관찰되지 않았다. Xylan은 그 종류에 따라 가수분해 산물이 다르게 나타났으며 BiX, BeX와 OSX의 주된 분해산물로 X2와 X3이 관찰되었고 이동도가 X4와 X5 사이에 있는 물질도 존재하였는데 이는 측쇄를 갖는 XOS로 판단된다. BiX와 BeX로부터 분해된 산물은 OSX 보다 많았으며 AX의 분해산물은 관찰하기 어려운 수준이었다. Table 1에 보인 바에 의하면 Xyn1401과 Xyn1402의 AX 분해활성이 다른 xylan에 비해 약간 높은 수준이었지만 분해산물이 TLC에서 거의 탐지되지 않은 이유는 다른 xylan의 가수분해물에 비해 AX 분해산물의 증합도가 높아 거의 이동하지 않은 때문으로 추정된다. AMX-4 xylanase는 Xyn1401이나 Xyn1402와 유사하게 XOS, BiX, OSX를 분해하여 X2와 X3를 주된 분해산물로 생성하였으며[14], 이와 달리 *B. amyloliquefaciens* xylanase와 *B. licheniformis* xylanase은 xylans을 주로 X3, X4와 X5로 분해하며 X2의 생성량은 매우 적은 것으로 밝혀졌다[6, 12]. 이로써 Xyn1401과 Xyn1402는 127번째 아미노산 잔기 한 개의 차이로 인하여

기질특이성이나 반응산물 생성에 영향을 받지 않았지만, 최적 반응온도와 최적 반응 pH 및 열안정성에 변화가 일어난 것이 확인되었다.

요 약

가정식 된장에서 mannanase 생산균으로 분리된 *Bacillus* sp. YB-1401와 *B. amyloliquefaciens* YB-1402로부터 2개의 xylanase 유전자가 대장균으로 클로닝 되었으며 그 염기서열이 결정되었다. 두 xylanase 유전자는 213개 아미노산 잔기의 단백질을 코드하는 642 nucleotides로 동일하게 구성되었다. Xyn1401과 Xyn1402로 명명된 YB-1401과 YB-1402 xylanase의 아미노산 배열은 127번째 잔기인 Asn과 Lys을 제외하고는 모두 동일하였고, glycosyl hydrolase family 11에 속하는 xylanase의 아미노산 배열과 상동성이 높았다. 두 효소의 signal peptide는 SignalP4.1 프로그램에 의해 아미노 말단의 28 잔기 배열로 동일하게 예측되었다. 두 효소는 91-94%가 재조합 대장균의 배양상등액에 존재하였으므로 대장균에서 효과적으로 분비되는 것으로 판단되었다. Xyn1401과 Xyn1402의 최적 반응조건은 50°C와 pH 6.0, 55°C와 pH 6.5로 각각 달랐으며 이로 보아 오직 한 개의 아미노 잔기의 차이가 온도와 pH에 따른 효소 활성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 또한 두 효소는 열안정성도 서로 약간 차이가 있었다.

References

1. Baek CU, Lee SG, Chung YR, Cho I, Kim JH. 2012. Cloning of a

- family 11 xylanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from cheonggukjang. *Indian J. Microbiol.* **52**: 695-700.
2. Gallardo O, Diaz P, Pastor, FI. 2004. Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparison with alkaline pl-low molecular weight xylanases of family 11. *Curr. Microbiol.* **48**: 276-279.
 3. Guo G, Liu Z, Xu J, Liu J, Dai X, Xie D, et al. 2012. Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. *J. Basic Microbiol.* **52**: 419-428.
 4. Jeon HJ, Yoon K-H. 2014. Comparison of acidic pH and temperature stabilities between two *Bacillus* mannanases produced from recombinant *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol.* **50**: 327-333.
 5. Khandeparker R, Verma P, Deobagkar, D. 2011. A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. *N. Biotechnol.* **28**: 814-821.
 6. Lee CC, Kibblewhite-Accinelli RE, Smith MR, Wagschal K, Orts WJ, Wong DW. 2008. Cloning of *Bacillus licheniformis* xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Curr. Microbiol.* **57**: 301-305.
 7. Lee TH, Lim PO, Lee YE. 2007. Cloning, characterization, and expression of xylanase A gene from *Paenibacillus* sp. DG-22 in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 29-36.
 8. Miyazaki K, Takenouchi M, Kondo H, Noro N, Suzuki M, Tsuda S. 2006. Thermal stabilization of *Bacillus subtilis* family-11 xylanase by directed evolution. *J. Biol. Chem.* **281**: 10236-10242.
 9. Ruller R, Deliberto L, Ferreira TL, Ward RJ. 2008. Thermostable variants of the recombinant xylanase A from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution show reduced heat capacity changes. *Proteins* **70**: 1280-1293.
 10. Tarayre C, Brognaux A, Brasseur C, Bauwens J, Millet C, Matéotti C, et al. 2013. Isolation and cultivation of a xylanolytic *Bacillus subtilis* extracted from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**: 225-245.
 11. Wakarchuk WW, Campbell RL, Sung WL, Davoodi J, Yaguchi M. 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* **3**: 467-475.
 12. Xu X, Liu MQ, Huo WK, Dai XJ. 2016. Obtaining a mutant of *Bacillus amyloliquefaciens* xylanase A with improved catalytic activity by directed evolution. *Enzyme Microb. Technol.* **86**: 59-66.
 13. Yin LJ, Lin HH, Chiang YI, Jiang ST. 2010. Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 557-562.
 14. Yoon K-H. 2009. Cloning of a *Bacillus subtilis* AMX-4 xylanase gene and characterization of the gene product. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1514-1519.
 15. Yoon K-H. 2015. Characterization of two β -mannanases from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43. *Korean J. Microbiol.* **51**: 263-270.
 16. Yu J-H, Park Y-S, Yum D-Y, Kim J-M, Kong I-S, Bai D-H. 1993. Nucleotide sequence and analysis of a xylanase gene (*xyn5*) from alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 and comparison with other xylanases. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 139-145.