

Product of inulo-oligosaccharides from inulin by endo-inulinase activating enzyme and Its deletion mutant protein from CFTase

김병우, 류혜경, 유동주, 김현정

동의대학교 미생물학과

전화 (051) 890-1536, FAX (051) 890-1532

**Abstract**

We have previously reported recombinant deletion mutant was constructed from cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase(CFTase) gene of *Xanthmonas oryzae* MGL21. Purification of the mutant protein from *E. coli* and reaction condition for the production of inulo-oligosaccharide(ISO) were studied.

The molecular mass of the CFTase deletion mutant protein was estimated to be 90kDa by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis.

Optimum reaction pH and temperature were pH6.5 and 40°C, respectively. Under optimal reaction conditions, endo-inulinase activating enzyme was rapidly produced ISO from inulin. Components were DP(degree of polymerization) 3and 4 with trace amount of smaller oligosaccharides.

**서론**

CFTase(cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase)는 inulin과 같은 fructan 기질에 작용하여 CF를 합성하는 분자 내 당전이 반응인 cyclization과  $\beta$ -(2→1)-fructooligosaccharide 사이의 당전이 반응인 coupling 반응, disproportionation 반응 또는 hydrolyzing 반응을 매개하는 다기능 효소(multi functional enzyme)이다. 또한 CFTase는  $\beta$ -(2→1) fructosidic결합을 분해하는 효소인  $\beta$ -fructofuranosidase (invertase, sucrase), levanase 및 inulinase등과 amino acid sequence에서 높은 homology를 가지고 있다. 그래서 CFTase도  $\beta$ -fructofuranosidase family로 분류되어 질뿐만 아니라, 단백질 구조와 catalytic mechanism도 비슷할 것으로 추측되어진다.

본 연구에서는 *Xanthmonas oryzae* MGL21 유래의 CFTase유전자로부터 제작한 endo-inulinase 유사 활성을 나타내는 deletion mutant protein을 분리, 정제하고 inulin으로부터 ISO 생산을 위한 효소반응 조건을 검토하고 효소적 특성에 대해 밝혔기에 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### protein overexpression

재조합 균주 pDI2 $\Delta$ N $\Delta$ C-His 로부터 mutant enzyme의 대량발현을 위하여 재조합 균주를 Km이 첨가된 LB배지에 전배양하고 전배양액을 Km이 첨가된 NZCYM배지에 접종 한 후 약 24시간 정도 배양하여 O.D<sub>660</sub>=0.35 정도일 때 10mM의 lactose를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다.

### purification of enzyme

배양액은 원심분리하여 균체를 파쇄하고 농축하여 20mM Tris-HCl buffer(pH7.8)에 투석 후 DEAE-cellulose ion-exchange chromatography를 거친 후 동결건조로 농축하고 Novagen Hisbind Kit를 이용하여 순수분리 정제 하였다.

### 최적 pH 및 최적 온도

효소반응의 최적 pH를 알아보기 위해 pH5.0~10범위에서 조효소액을 2% inulin과 45°C에서 30분간 반응시켜 활성측정으로 최적 pH를 측정하였고, 최적 반응온도를 알아보기 위해 30~60°C 범위에서 30분간 반응하여 측정하였다.

### TLC를 이용한 반응생성물 확인

Inulin에 대한 효소반응의 차이점을 비교하기 위해 CFTase와  $\Delta$ N $\Delta$ C deletion mutant의 조효소액을 2% inulin과 1:1로 45°C에서 시간별로 반응시켰다.

## 결과 및 고찰

### Purification of enzyme

정제된 효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 밴드를 나타내었으며 분자량은 약 90kDa로 염기서열로부터 예상되는 분자량과 거의 일치하였다.

### General properties

$\Delta$ N $\Delta$ C deletion mutant enzyme의 효소반응의 최적 pH를 알아보기 위해서 pH5.0~10범위에서 조효소액을 2% inulin과 45°C에서 30분간 반응시켜 활성을 측정하였다. 측정결과 pH6.5에서 최적활성을 나타내었다.

효소반응의 최적온도를 알아보기 위해 30~60°C 범위에서 30분간 상기의 최적 pH에서 동일한 방법으로 효소활성을 측정한 결과 40°C에서 최적 활성을 나타내었다.

### TLC이용한 효소활성 측정

Inulin에 대한 효소반응의 차이점을 비교하기 위해 CFTase와  $\Delta$ N $\Delta$ C deletion mutant의 조효소액을 2% inulin과 1:1로 45°C에서 시간별로 반응시킨 결과 CFTase는 주산물이 CF였고,  $\Delta$ N $\Delta$ C deletion mutant는 fructooligosaccharide를 생성함을 알 수 있었다.

## 요약

*Xanthomonas oryzae* MGL21 유래의 CFTase의 repeat영역을 deletion 시킨  $\Delta N\Delta C$  deletion mutant는 protein 정제결과 약 90kDa 이었으며 pH6.5, 45°C에서 최적 효소 반응을 하였다.

또한 Inulin과 반응시켰을 때 CFTase는 main product가 CF인데 비해  $\Delta N\Delta C$  deletion mutant는 main product가 fructooligosaccharide였다.

이러한 결과로부터 CFTase의 N말단 repeat영역과 C말단 repeat영역을 제거하였을 경우 endoinulinase와 활성이 유사하며, 유전자 크기 및 아미노산 서열도 유사함을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Kushibe, S., K. Mitsui, M. Yamagishi, K. Yamada, and Y. Morimoto. "Purification and characterization of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase(CFTase) from *Bacillus circulans* MCI-2554"(1995), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59(1), 31-34.
2. Eom, S.-J., Y.-M. Kwon, and Y.-j. Choi. "Molecular cloning of *Pseudomonas* sp. inulinase gene and its expression in *E. coli*"(1995), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23(5), 550-555.
3. Kwon, Y.-M., H.-Y. Kim, and Y.-J. Choi, "Cloning and Characterization of *Pseudomonas mucidolens* Exoinulinase"(2000), *J. Microbiol. Biotechnol.* 10(2), 238-243.
4. Laloux, O., J. P. Cassart, J. Delcour, J. van Beeumen, and J. Vandehaute. "Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* inulinase var. *marxianus* ATCC 12424"(1991), *FEBS Lett.* 289(1), 64-68.
5. Martin, I., M. Debarbouille, E. Ferrari, A. Klier, and G. Rapoport. "Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase"(1987), *Mol. Gen. Genet.*, 208, 177-184.