

# Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of Endo-Inulinase Gene from *Xanthomonas oryzae* #5

김병우, 김미랑, 유동주

동의대학교 미생물학과

전화 (051) 890-1536, FAX (051) 890-1532

## Abstract

A 11.5-kb DNA fragment containing an endo-inulinase gene was cloned from *Xanthomonas oryzae* #5. It contained a single open reading frame of 3,999bp, encoding a polypeptide composed of signal peptide of 32 amino acids and mature protein of 1,301 amino acids. From the comparison of amino acids sequences with fructan hydrolases, inulinase, levanase and CFTase, the sequence of the endo-inulinase had highly homology of 72% with CFTase of *B. circulans*, and six highly conserved regions including the  $\beta$ -fructosidase motif were found.

## 서론

Inulin은 돼지감자(Jerusalem artichoke), 치커리(Chicory), 다알리아(Dahlia) 등의 국화과(Compositae) 식물의 구근에 함유된 polyfructan으로 30-35개의 fructose가  $\beta$ -2,1결합에 의해 직쇄상으로 연결되어 있고 그 말단에 D-glucose가  $\alpha$ -1,2결합을 하고 있다. 돼지감자는 기후와 토양에 대한 적응력과 번식력, 내병성 및 내충성이 강하고 단위 면적 당 수확량도 많아서 우리 나라에서 재배하기가 용이한 식물 일 뿐 아니라, inulin 가수분해에 의해 75%이상의 fructose를 생산 할 수 있다고 보고 되어 있어 감미 자원이 부족한 우리 나라에서는 매우 유망한 감미 자원으로 활용할 수 있다.

Inulinase는 inulin 분해효소로서 작용 기작의 차이에 따라 크게 두 가지로 분류된다. 첫째는  $\beta$ -D-fructofuranosidase(EC 3.2.1.26, 2,1- $\beta$ -D-fuctan fructohydrolase)로 inulin뿐만 아니라 sucrose도 분해하는 효소로 inulin의 말단으로부터  $\beta$ -2,1결합을 fructose단위로 가수분해하는 exo형 inulinase이다. *Kluyveromyces fragilis*를 비롯한 대부분의 효모와 *Aspergillus niger* 등의 곰팡이 및 *Bacillus subtilis* 등 대부분의 미생물이 생산하는 inulinase가 여기에 속한다. 둘째는 2,1- $\beta$ -D-fuctan fructanohydrolase(EC 3.2.1.7)로서 inulin은 분해하나 sucrose 분해능은 없는 효소로 inulin 내부의  $\beta$ -2,1 결합을 가수분해하여 저분자의 fructooligo당을 생성시키는 endo형 inulinase 이다. 식물에서 얻어질 수 있는 대부분의 inulinase와 *Aspergillus niger*, *Streptomyces chibaensis* 및 *Pseudomonas* sp. 등 극히 일부 미생물에 의해

서 생산되는 것으로 보고되어 있다.

본 연구실에서는 값싼 원료가질인 inulin을 이용한 프락토올리고당을 생산하기 위해 inulin 가수분해 효소 중 endo형 inulinase를 생산하는 *Xanthomonas oryzae* #5을 토양으로부터 순수 분리한 바 있다. 본 연구에서는 상기 *Xanthomonas oryzae* #5 균주의 endo-inulinase 생산 유전자를 *E. coli*에 클로닝하고 염기 배열을 밝혔기에 그 결과를 보고한다.

### 재료 및 방법

**사용 균주 및 균주 배양:** *Xanthomonas oryzae* #5는 2% Inulin, 2% Yeast extract, 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.2%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.05% KCl, 0.05%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0, 37°C에서 배양하였고, 숙주균주는 *E. coli* DH5  $\alpha$  [*supE44*,  $\Delta$ *lacU169*( $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] 사용하였고, vector는 pUC19를 사용하였다. 형질전환체는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin을 첨가한 LB배지에서 배양하였다.

**Chromosomal DNA 및 plasmid의 분리와 형질 전환:** Chromosomal DNA는 Warrick 와 Lederberg의 방법에 따라 분리하였으며, Plasmid는 QIAGEN Plasmid Midi Kit을 사용하여 추출하였다. Gel electrophoresis는 TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 Maniatis등의 방법에 따랐으며, agarose gel상의 DNA 절편은 Gene Clean Kit를 사용하여 추출 회수하였다.

**Endoinulinase 생산 Recombinant clone의 선별:** *Xanthomonas oryzae* #5의 Chromosomal DNA를 Shotgun법에 따라 EcoRI으로 10min 처리 한 2~9Kb의 단편을, EcoRI 처리한 후 CIP를 처리한 pUC19와 ligation 하였다. 형질전환주는 ampicillin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(100mM), X-Gal (20mg/ml) 함유한 LB agar에서 무색 colony를 선별하여 LB에서 2일 배양 후 배양 상층액을 inulin과 반응 시켜 paper chromatography( n-Butanol : Pyridin : Water = 6 : 4 : 3 )으로 inulin 분해능이 있는 형질전환주를 선별하였다.

**DNA Sequencing 및 Computer Analysis:** Plasmid pUC19에 subcloning 시킨 endoinulinase gene의 염기배열은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)에 의해 dideoxy chain termination method 로 하였다. Nucleotide 와 amino acid sequence 분석은 GENETYX-WIN 3.1 software program을 사용하였다.



**Endo-, exo-inulinase, levanasae 및 CFTase와 homology 비교:** Fig. 3 에 나타낸 바와 같이 endo-inuliasae는 *B. circulans* MCI-2554의 CFTase<sup>1)</sup>와 아미노산 배열에 있어서 약 72%의 높은 비율의 homology를 나타내었다. *B. circulans* MCI-2554는 4개의 repeat sequence가 존재 한다고 보고 있다. 본 endo-inuliasae에서는 *B. circulans* MCI-2554의 2번째 repeat sequence 부분인 268-297 amino acid 부분이 결손 되어 있다. *Pseudomonas mucidolens* endo-inulinase<sup>2)</sup>, exoinulinase<sup>3)</sup> 및 *Kluyveromyces marxianus* inulinase<sup>4)</sup>, *Bacillus subtilis* levanasae<sup>5)</sup> 와 amino acid 비교 분석한 결과  $\beta$ -fructouranosidase motif 포함한 6개의 유사 부위를 가지고 있었다(Fig. 4).

```

XO 1: MRAK-GRKC WISGVNVMH VGLVVPVSI VASENRTVAG ETLVPMVDK SSVTDIAYGI
BC 1: MREVKRGGKS GFAALATNSL FFLIAPGIS AAAE ---PGAD--- IEDA
XO 60: KNIPKQWML SVTDSVVOIR NPFGETSILT GWYVYGEAF GPNVSVDTEI MNAKIPYMQ
BC 43: -LISEASESI PVDVAVOIE NPFGETSILT GNSVADGAF GPDVSVDTEI MNAKIPYMQ
XO 120: BGAVHMGK VDESATIIH SSTFELGSSG WISFLGGAK NPKDFINIV EITDGOVIR
BC 102: BGAVHMGK VDESATIIH SSTFELGSSG WISFLGGAK NPKDFINIV EITDGOVIR
XO 180: YGNSAFADVG FPDPAAGMRL ANHYQYKADL STYLKQKLVY EVDVWATSVD GVFADAFSP
BC 162: YGNSAFADVG FPDPAAGMRL ANHYQYKADL SHIKQKLVY EIVDHSATSDV GLIFADAFSP
XO 240: YHSESEADGI VATDIKDFK RYELIDWPS-
BC 222: YHSESEADGI VATDIKDFE RYELIDWPSF TQDLTQMTVI EGADRGPNVS SDETVMWAER
XO 268:
BC 268: IPYDQEGATH LMGWYPESE TGVLRSSFTF LGGSGHITFK LGGQKHTDQV YSVVIEAETD
XO 342: NLIARYGNSA FTVGDFPTFA GGRRLANNEG YKAULSKHIG KCLYLEIVDH GVSQMLVFA
BC 268:
BC 402: DAFRTPEIV PEDGVVAENI IPAEIANRGR FETQMLDQVY EGDAEYVTE AHVSGEENF
XO 299: AKSSNGDGS IASSTFTLQ TQTLNPTLID ILKPEYAYVA LYDANSTLL MGTGNVSANE
BC 462: ALSSTDGGGS IASSTFTLQ AGLINFTVLD LNFLEBAYVA LYDANSTVI KITONIGANE
XO 359: KISWVGVSH NKCLYKVVVD HSRKASIAVD SPDASQGTI FHLNLDGAS KKALEKVNHL
BC 522: OISWVGVSH NKCLYKVVVD GSDGADIAVD GPCARTGTFT FHLNLDGAS KKALEKVNHL
XO 419: RHDVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
BC 31: NDSIDVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
XO 479: APRVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
BC 582: APRVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
XO 539: YKNNVVAATPSKELKGI ---KLVNDEYVAGATPVNVI TPSTELI IGNKPKF
BC 150: NMSVYVYATYDKTSRHLKACLPSSKLV KLVNDEYVAGATPVNVI TPSTELI IGNKPKF
XO 591: VEGVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
BC 210: VEGVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
XO 651: FGDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
BC 814: FGDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
XO 708: MVNHNVPALAPEAG-TLD-PDG-TLD-VD ---RGNMPLPYTA-GM 751
BC 871: MVNHNVPALAPEAG-TLD-PDG-TLD-VD ---RGNMPLPYTA-GM 914
XO 752: DLSLSPNGRTGLA-TP-ADLSDPYLEKVVYKPP-VTDEKQKIDH ---IYVYNGK---
BC 915: DLSLSPNGRTGLA-TP-ADLSDPYLEKVVYKPP-VTDEKQKIDH ---IYVYNGK---
XO 808: EYDKVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
BC 968: EYDKVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY
XO 863: LFLG---TD-S-TGKQK-Y-IEMVHPEKPEPEVADRGVYVYVITGDRDNFK 913
BC 1026: LFLG---TD-S-TGKQK-Y-IEMVHPEKPEPEVADRGVYVYVITGDRDNFK 1076
XO 914: FIDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
BC 1077: FIDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
XO 1028: DPR---EAKPKLVKRSRGGQETLLIYDQKGTTPNVDRTKSS LDPDVRVD-GIQQGVYD 1084
BC 1191: DPR---EAKPKLVKRSRGGQETLLIYDQKGTTPNVDRTKSS LDPDVRVD-GIQQGVYD 1247
XO 1085: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1143
BC 1248: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1306
XO 1144: NALTKGPAAPVYVYVDEKMSVYKDI TELPHNDFAT GDLTGMTEG DAFQNIHVTD 1203
BC 1307: NALTKGPAAPVYVYVDEKMSVYKDI TELPHNDFAT GDLTGMTEG DAFQNIHVTD 1366
XO 1065: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1143
BC 1248: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1306
XO 1065: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1143
BC 1248: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1306

```

Fig. 3. Comparison of amino acid sequence of endo-inulinase with cyclinulo-oligosaccharide fructanotransferase.

XO, *X. oryzae* endo-inuliasae; BC, *B. circulans* CFTase.

```

XO 359: KISWVGVSH NKCLYKVVVD HSRKASIAVD SPDASQGTI FHLNLDGAS KKALEKVNHL 418
BC 522: OISWVGVSH NKCLYKVVVD GSDGADIAVD GPCARTGTFT FHLNLDGAS KKALEKVNHL 581
Pendo 1: MNTDTEGTLIAYNSPDSGRTAVDVIQK 30
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 419: RHDVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 479
BC 31: NDSIDVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 88
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 479: APRVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 538
BC 582: APRVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 641
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 539: YKNNVVAATPSKELKGI ---KLVNDEYVAGATPVNVI TPSTELI IGNKPKF 590
BC 150: NMSVYVYATYDKTSRHLKACLPSSKLV KLVNDEYVAGATPVNVI TPSTELI IGNKPKF 209
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 591: VEGVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 650
BC 210: VEGVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 709
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 651: FGDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
BC 814: FGDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 708: MVNHNVPALAPEAG-TLD-PDG-TLD-VD ---RGNMPLPYTA-GM 751
BC 871: MVNHNVPALAPEAG-TLD-PDG-TLD-VD ---RGNMPLPYTA-GM 914
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 752: DLSLSPNGRTGLA-TP-ADLSDPYLEKVVYKPP-VTDEKQKIDH ---IYVYNGK---
BC 915: DLSLSPNGRTGLA-TP-ADLSDPYLEKVVYKPP-VTDEKQKIDH ---IYVYNGK---
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 808: EYDKVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 862
BC 968: EYDKVYVYFVSHARVNASDPRTFPRG IEGGALLPDSVSY NVYNAIDVPSVSDILTEAWY 1025
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 863: LFLG---TD-S-TGKQK-Y-IEMVHPEKPEPEVADRGVYVYVITGDRDNFK 913
BC 1026: LFLG---TD-S-TGKQK-Y-IEMVHPEKPEPEVADRGVYVYVITGDRDNFK 1076
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 914: FIDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
BC 1077: FIDGQHRPQYHANEPTG ---IYVYNGK--- IYVYNGK---
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 1028: DPR---EAKPKLVKRSRGGQETLLIYDQKGTTPNVDRTKSS LDPDVRVD-GIQQGVYD 1084
BC 1191: DPR---EAKPKLVKRSRGGQETLLIYDQKGTTPNVDRTKSS LDPDVRVD-GIQQGVYD 1247
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 1085: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1143
BC 1248: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1306
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 1144: NALTKGPAAPVYVYVDEKMSVYKDI TELPHNDFAT GDLTGMTEG DAFQNIHVTD 1203
BC 1307: NALTKGPAAPVYVYVDEKMSVYKDI TELPHNDFAT GDLTGMTEG DAFQNIHVTD 1366
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 1065: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1143
BC 1248: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1306
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0
XO 1065: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1143
BC 1248: LKGEN-LKLIHFLDRSVYEAFAVYKQKLTTRVYVGRVYSLGLIWAADDGNIH KSNQWDM 1306
Pendo 1: 0
KXKI 1: 0
BSLKV 1: 0

```

Fig. 4. Comparison of amino acid sequence of endo-inulinase with other  $\beta$ -D-fructofuranosidase.

XO, *X. oryzae* endo-inuliasae; BC, *B. circulans* CFTase; Pendo, *Pseudomonas* endo-inuliasae; KXKI, *K. marxianus* inulinase; BSLKV, *B. subtilis* levanasae

## 요약

토양에서 분리한 endo-inulinase 생산 균주인 *Xanthomonas oryzae* #5로부터 11.5kb의 endo-inulinase 유전자를 포함하는 재조합 plasmid를 함유한 형질 전환주를 분리하였다. 11.5kb의 단편으로부터 8.6kb, 4.1kb의 단편을 포함한 pDI 2, pDI4 재조합 plasmid를 제작하여 활성을 확인한 결과 endo-inulinase 활성을 나타내었으며, 재조합 plasmid pDI 2를 이용하여 DNA sequence를 한 결과 endo-inulinase 유전자는 1,333개의 아미노산으로 구성된 ORF를 가지고 있었다. 또한 *B. circulans* MCI-2554의 CFTase와 아미노산 배열에 있어서 약 72%의 높은 homology를 나타냈었으며, 다른 fructan hydrolases, inulinase, levanase와의 아미노산 비교로부터  $\beta$ -fructouranosidase motif를 포함한 6개의 유사부위를 확인하였다.

## 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. Vandenhaute. "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.