

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 β -fructosidase motif were found.

서론

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

Inulinase는 inulin 분해효소로서 작용 기작의 차이에 따라 크게 두 가지로 분류된다. 첫째는 β -D-fructofuranosidase(EC 3.2.1.26, 2,1- β -D-fuctan fructohydrolase)로 inulin뿐만 아니라 sucrose도 분해하는 효소로 inulin의 말단으로부터 β -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- β -D-fuctan fructanohydrolase(EC 3.2.1.7)로서 inulin은 분해하나 sucrose 분해능은 없는 효소로 inulin 내부의 β -2,1 결합을 가수분해하여 저분자의 fructooligo당을 생성시키는 endo형 inulinase이다. 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 원료기질인 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 α [supE44, $\Delta lacU169(\emptyset 80 lacZ\Delta M15)$, 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- β -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 endoinuliase gene의 염기 배열은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)에 의해 dideoxy chain termination method로 하였다. Nucleotide와 amino acid sequence 분석은 GENETYX-WIN 3.1 software program을 사용하였다.

결과 및 고찰

Endo-inulinase 유전자 클로닝과 제한 효소 지도: *Xanthomonas oryzae* #5 의 chromosomal DNA의 EcoRI 단편으로부터 endo-inulinase 활성을 나타내는 형질 전환주를 분리하였다. 본 균주를 분석한 결과 11.5kbp의 삽입 DNA를 가지는 재조합 plasmid을 가지고 있었고, 이 재조합 plasmid를 pDI 1을 명명하였다(Fig.1). pDI 1으로부터 효소활성을 갖는 SmaI-EcoRI 단편을 pUC19에 subcloning 하고, 이를 pDI2로 명명하였다.

Endo-inuliase 유전자의 Nucleotide sequence: Sequenceing 전략은 Fig 1에 나 타내었다. 3,999 bp 단편을 함유한 endo-inulinase 유전자의 sequence는 Fig 2에 나 타내었다. Open reading frame은 start codon은 298 위치의 ATG이고, end codon은 4297 위치의 TGA 이다. Start codon으로부터 7 up upstream 의 283-290에 SD 배열이 존재하였다. ORF는 3,999 bp로 길며, 1,333의 polypeptide chain을 encode 한다.

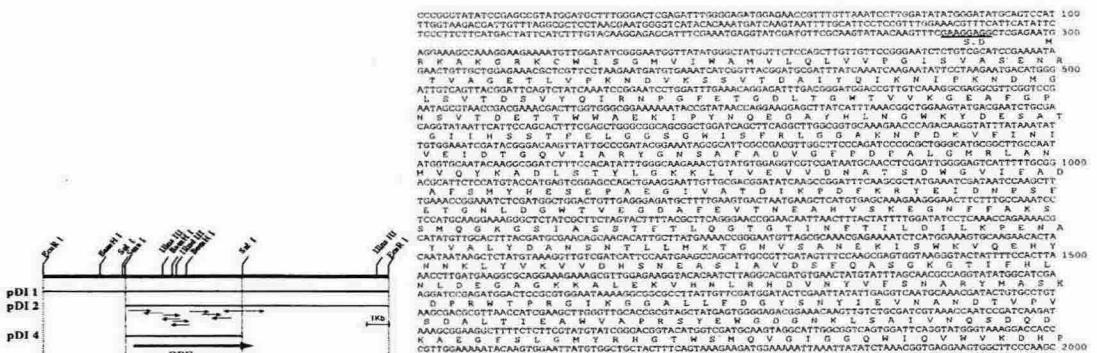
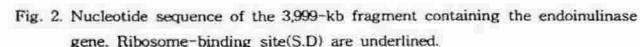


Fig. 1. Linear restriction map of plasmid pDI-1.

ORF, Open reading frame



Endo-, exo-inulinase, levanase 및 CFTase와 homology 비교: Fig. 3에 나타낸 바와 같이 endo-inulilase는 *B. circulans* MCI-2554의 CFTase¹⁾와 아미노산 배열에 있어서 약 72%의 높은 비율의 homology를 나타내었다. *B. circulans* MCI-2554는 4개의 repeat sequence가 존재한다고 보고 된 바 있다. 본 endo-inulilase에서는 *B. circulans* MCI-2554의 2번째 repeat sequence 부분인 268-297 amino acid 부분이 결손 되어 있다.

Pseudomonas mucidolens endo-inulinase²⁾, exoinulinase³⁾ 및 *Kluyveromyces marxianus* inulinase⁴⁾, *Bacillus subtilis* levanase⁵⁾ 와 amino acid 비교 분석한 결과 β -fructouranosidase motif 포함한 6개의 유사 부위를 가지고 있었다(Fig. 4).

XO	1 :	MRKAK-GRKC WISGVVHAW VLQLYVPGIS VASERNTVAG ETLVPMDDVK SSVTDAIYQ
BC	1 :	MREVKKGKGS GFAALAIISL FFLAATGPIGS AAAE— —PAGD— —IEDA—
XO	60 :	KNPKNODGL SVTDSVYVIOI NPFGEITGDLT GWTIVKNSGFAP GPNEVTTTIDT WAAEPIPYNO
BC	43 :	-LISESEELI PVTDAVYVIOI NPFGEITGDLT GWTIVKNSGFAP GPNEVTTTIDT WAAEPIPYDO
XO	120 :	EGAVMLNGWK YDESATGIIH SSTTFELGGG MSPLRGLGG NPDVKVFIIV EIDTQVIAIR
BC	102 :	EGAVMLNGWK YPFSEATGIIH SSTTFELGGG MSPLRGLGG NPDVKVFIIV EIDTQVIAIR
XO	180 :	YGNSAFADVG FPPDPAQMLR AMWVQYKADL STYLQKQLYV EIVDVWATSDW GVIFADAFSN
BC	162 :	FPPDPAQMLR AMWVQYKADL STHIHKKLYV EIVDVWATSDW GVIFADAFM
XO	240 :	YGNSAFADVG VADTKIPDFK RPYDFTPS—
BC	222 :	YHNSEPAFADG VADTKIPDFK RPYDFTPSF EGDDAIPNSV SDETYWAAER
XO	268 :	—
BC	282 :	IPIYDQGRGHY LNGWVYPESTV TGVLRSSTPE LGGSQWTFK LGGGKHTDQV YVSVEIAETG
XO	268 :	—
BC	342 :	NLIARYGNSA FTDVGFPDPA CGMRLLAMQQ YKAULSNSK 10KLYLEIDH GVSDNGLIVFA
XO	268 :	—
BC	402 :	DAFRTRHEIV PEIGVVAENI IPIAEIANRGP ETGNDLIGVTV EGDAAHVDTE AHAKEDNFY
XO	299 :	AKSNSGKNG JASSTETFLQG ITGNTMFTILD ILKPNENAYA LYDANSMTL MGTGNSANE
BC	462 :	—
XO	356 :	ALLESSTEKS ITSMNTFLQG AGIINFLDTL ILNPEASAYA LYDANSSTVI KITGNIGAME
BC	522 :	QLSKMYKQHY NNLVYVKKVVD YHNEASIAVQD SPQASOKTI FHLNLDEGQ KXALEKVRHL
XO	419 :	RQDQVYVFSH ARYMASKDPF MTPRGKIGGA LIFEGQSYVI EVHANDOTPV SYDALTIEAVW
BC	582 :	EDQWVYVFNQD ARYMASKDPF MTPRGKIGGA LIFEGQSYVI EIDADETVPV SYDALTIEAVW
XO	479 :	APRSYEWGMDG NKLSAIVNG DODKAEGFLS GHYRHTNSM QVIGIGOMIQ VNVXKDPLEX
BC	642 :	APRSYEWGMDG NKLSAIVNG DODKAEGFLS GHYRHTNSM QVIGIGOMIQ VNVXKDPLEX
XO	539 :	YHNNYYAATF SKDGGKXLYL LGEAEVASA TPNVYVITPS TESLJIGION KPELAGVFS
BC	702 :	YHNNYYAATF DKEESEKLYL LGEAEVASA TPAVGPVTSFS GESLILVGN KPELAGVFS
XO	599 :	FNMESGLIDE VKLKHVHALTH QSLIAGYSEV KALHGGSPXPK LIMADIDEQ SFVTDGDKHRP
BC	762 :	FNMESGLIDE VKVNRHNLTH GEILAYZEVS KALHGGSPYD IPMADIDEQ SFVTDGDKHRP
XO	654 :	QYAHMPDMN MEHAAPAHYV NGKHYLFLYH NHDQPPWMMQI HNGSVDNNDM VNENWVPRAL
BC	822 :	QYAHMPDMN MEHAAPAHYV NGKHYLFLYH NHDQPPWMMQI HNGSVDNNDM VNENWVPRAL
XO	719 :	ALPEAGTLQPD GTMSWSSAAYD RGWNPEVPT AGDNLSLSPM QKLTALTPADL SDPYLEGWK
BC	882 :	ALPEAGTLQPD GMSASASWQD RGWNPEVPT AGDNLSLSPM QKLTALTPADL SDPYLEGWK
XO	779 :	YKPKVTEUQG KGHNMEERDPF FVWYDQEVKQW HQLWLTSQLP DPSSGTLALVY VSDDHMYNEY
BC	942 :	YKPKVTEUQG KGHNMEERDPF FVWYDQEVKQW HQLWLTSQLP DPSSGTLALVY VSDDHMYNEY
XO	839 :	KGPVLYSRSN RPELGTVLW LPVPLGLD STGKQYKJEN INTHPEXVBN PEANDVGRW
BC	1005 :	KGPVLYSRSN RPELGTVLW LPVPLGLD STGKQYKJEN INTHPEXVBN PEANDVGRW
XO	894 :	EYVYVQIWTB RDWDFKIPD EAPSHQDWD LQVYDQVWQD QKLTALTPADL SDPYLEGWK
BC	1063 :	EYVYVQIWTB RDWDFKIPD EAPSHQDWD LQVYDQVWQD QKLTALTPADL SDPYLEGWK
XO	959 :	EYQSGWMLN SPVLSVSLDP HDKLHIEPIK ELOGSLRGNK WPDPSDNLN ANGLQKVG
BC	1122 :	EYQSGWMLN ALPVASALP HDKLHIEPIK ELOGSLRGNK WPDPSDNLN ANGLQKVG
XO	1019 :	DILEIYMEID PRAEGEGLK VRSEKQZEE TLVYDQKONG TEWVURKTSQ IDPDRVWDG1
BC	1182 :	DILEIYMEID PRAEGEGLK VRSEKQZEE TLVYDQKONG TEWVURKTSQ IDPDRVWDG1
XO	1078 :	GGGVYDILGK NLLLHLRLD SIEVAFANPK KKLITTRVYVQ RYDQVGLQW ADDGIVKSM
BC	1242 :	GGGVYDILGK NLLLHLRLD SIEVAFANPK KKLITTRVYVQ RYDQVGLQW ADDGIVKSM
XO	1133 :	QWMMWALTG KPAAPVYVD KWONSYVKDI TELPMDFEAT GDLOIWTG DAFONVHVN
BC	1302 :	EVWAMMALG PAEAPVYVD WMDNSYVKDI TELPMDFEAT GDLOIWTG DAFONVHVN
XO	1199 :	TOPFMNQIYF NPSQKQHGGY HLWGFNEQDG GNSLTSALBS GMFVFLGGNGK INFPLISQGD
BC	1362 :	AKFMDTIIYF NPSQKQHGGY HLWGFNEQDG GNSLTSALBS GMFVFLGGNGK INFPLISQGD
XO	1259 :	IDRLYVALVR ASIDGKELPK TATNEYEYQR KWDASDWTG ELYLKVVQD SKGGFGHINV
BC	1422 :	IDRLYVALVR ASIDGKELPK TATNEYEYQR KWDASDWTG ELYLKVVQD SKGGFGHINV
XO	1319 :	DIFNVYPOV— —KKCTIN —
BC	1482 :	DIFNVYPOVW RTDERSNSRM RS*

Fig. 3. Comparison of amino acid sequence of endo-inulinase with cyclooligo-oligosaccharide fructanotransferase.
XO, *X. oryzae* endo-inulinase; BC, *B. circulans* CFTase.

XO	359 :	KISWKVQDPIYVNNKLYVKKVUDMSNEAST AVRSPOASGKGTTPHL NLDEGAGKAKLVEYRNW
BC	522 :	QISWKVQDPIYVNNKLYVKKVUDMSNEAST AVRSPOASGKGTTPHL NLDEGAGKAKLVEYRNW
Pendo	—	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	419 :	RHDWVYVFSNARVMSADPFRWIKGALIPDQGYSNYIIEVNANDTVPVSALTEITEAM
BC	682 :	EHDVVYVFDARVAMPKDFRWTIPRWTQVKGALIPDQGYSNYIIEVNANDTVPVSALTEITEAM
Pendo	3 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	479 :	APPSYERKTRKSLAUNQNSKAKMFPSLHNWVTEKINNSPQVIGQGQDQGKPLEX
BC	841 :	APPSYERKTRKSLAUNQNSKAKMFPSLHNWVTEKINNSPQVIGQGQDQGKPLEX
Pendo	90 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	539 :	KYNNWVYAAATP2KEDKIKI KIYLNQEEVAASQATPVNPVTPSTESLILLQGNNKP
BC	702 :	YKNNWVYAAATP2KEDKIKI KIYLNQEEVAASQATPVNPVTPSTESLILLQGNNKP
Pendo	150 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	593 :	YKNNWVYAAATP2KEDKIKI KIYLNQEEVAASQATPVNPVTPSTESLILLQGNNKP
BC	753 :	YKNNWVYAAATP2KEDKIKI KIYLNQEEVAASQATPVNPVTPSTESLILLQGNNKP
Pendo	210 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	59 :	VELAGVSEPHQFHLLVLEKVLKAKLNGEETLWVFWAHLCS ITPLIHLAEEHRRV
BC	116 :	VELAGVSEPHQFHLLVLEKVLKAKLNGEETLWVFWAHLCS ITPLIHLAEEHRRV
Pendo	210 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	594 :	MEVAVSLLPLAIVNQASVYIENVYKAKLNGEETLWVFWAHLCS ITPLIHLAEEHRRV
BC	654 :	MEVAVSLLPLAIVNQASVYIENVYKAKLNGEETLWVFWAHLCS ITPLIHLAEEHRRV
Pendo	210 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	614 :	FDZDQHGRPYOHAMPFQHDFP— —IY-YNG— —KPFPMH-QHNGKHMVNSD
BC	814 :	FDZDQHGRPYOHAMPFQHDFP— —IY-YNG— —KPFPMH-QHNGKHMVNSD
Pendo	210 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	708 :	HVMWPNVPAIAPSAAR-TLD-PDX-TD— —RNGHPVPLVTTA— —GN
BC	751 :	HVMWPNVPAIAPSAAR-TLD-PDX-TD— —RNGHPVPLVTTA— —GN
Pendo	322 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	752 :	UDSLSPRQGTLGL— —TQ-AUQHLEKLYK— —VTEQV— —K— —DK
BC	804 :	UDSLSPRQGTLGL— —TQ-AUQHLEKLYK— —VTEQV— —K— —DK
Pendo	371 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	719 :	ASDPAKGLPQD ALPEAPW— —D-HIGGI— —LDMQDTSQGPFGNQ-GAGNVAL-FTHDKXP
BC	765 :	ASDPAKGLPQD ALPEAPW— —D-HIGGI— —LDMQDTSQGPFGNQ-GAGNVAL-FTHDKXP
Pendo	113 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	720 :	HVMWPNVPAIAPSAAR-TLD-PDX-TD— —RNGHPVPLVTTA— —GN
BC	791 :	HVMWPNVPAIAPSAAR-TLD-PDX-TD— —RNGHPVPLVTTA— —GN
Pendo	322 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	754 :	UDSLSPRQGTLGL— —TQ-AUQHLEKLYK— —VTEQV— —K— —DK
BC	804 :	UDSLSPRQGTLGL— —TQ-AUQHLEKLYK— —VTEQV— —K— —DK
Pendo	371 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	908 :	EVQDNVGLVLTGQFPPGSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	968 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	422 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	914 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	970 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	915 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	976 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	916 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	982 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	917 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	988 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	918 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	994 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	919 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1000 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	920 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1006 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	921 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1012 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	922 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1018 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	923 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1024 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	924 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1030 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	925 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1036 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	926 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1042 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	927 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1048 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	928 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1054 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	929 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1060 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	930 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1066 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	931 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1072 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	932 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1078 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	933 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1084 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	934 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1089 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	935 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1095 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	936 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1101 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	937 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1107 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	938 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1113 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	—
KMWX1	—	—
BSLEV	—	—
XO	939 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
BC	1119 :	FTDZKHYGLV1SLGPZLQSSGTALV— —YVSDYDQHMEYKGLVYSDRSL
Pendo	424 :	—
Pexo	—	

요약

토양에서 분리한 endo-inulinase 생산 균주인 *Xanthomonas oryzae* #5로 부터 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 β -fructouranosidase motif를 포함한 6개의 유사부위를 확인하였다.

참고문헌

1. Kushibe, S., K. Mitsui, M. Yamagishi, K. Yamada, and Y. Morimoto. "Purification and characterization of cycloinulooligosaccharide fructano-transferase(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. Biotechol, 10(2), 238-243.
4. Laloux, O., J. P. Cassart, J. Delcour, J. van Beeumen, and J. Vandenhante. "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.