Selection of L-arabinase gene to degrade Corn fiber

Mi-Sun Ahn, Hyoung-Joo Lee and Yeon Woo, Ryu*

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University Suwon

Tel. (031) 219-2455, Fax. (031) 219-8777

Abstract

L- arabinose residues are widely distributed in plant cell walls, where they are present in polymers such as arabinans, arabinoxylans, arabinogalactans and arabinogalactan proteins. L-arabinose suppress intestinal sucrase and decrease the adsorption of sugar in the small intestine, consequently, weight loss and fatness prevent. Now, xylose be used replacement sugar and arabinose be utilized fatness prevent of our time.

Various Agricultural surplus like corn fiber, contain 20 ~ 40% of hemicellulose. Corn fiber from Agricultural Renewable Biomass was chosen the best suitable material for arabinose production.

In this work, we searched about for L-arabinose gene in compost, metagenome pool and indonesian soil. So, the B1029 TS2-8 of L-arabinase gene in compost was selected by YNB media(5% yeast nitrogen base, 5% arabinogalactan). After enzyme reaction with corn fiver, B1029 TS2-8 produced 2.15 g/L of L-arabonose.

Introduction

L-arabinose는 식물의 세포벽을 구성하는 구성분이며, 또한 식물의 kingdom에 널리 분포되어져 있다. 이러한 L-arabinose는 corn, wheat 그리고 rice 등 cereal의 hemicellulose를 이루는 주성분이다. 이번 연구의 목적은 농산폐자원인 corn fiber로부터 L-arabinose를 생산하는 것이다. 지금까지의 농산폐자원은 동물들의 사료나 퇴비 등으로 사용되었으며, 생산량에 비해서 버려지는 것이 대부분이었다. 이에 급증하고 있는 농산폐자원을 고부가가치의 물질을 생산하고자 하는 노력이 급증하고 있는데, 섬유성 물질의 주요 탄수화물 구성성분인 cellulose, hemicellulose에는 고부가가치의 유용한 기능성물질의 생산에 중요한 원료인 xylose 및 arabinose 등이 포함되어 있다. arabinose는 설탕과 함께 섭취할 경우 소장에서의 설탕 흡수를 감소시켜 체중감량과 비만 방지효과를 기대할 수 있는 물질로서 α-glucosidase 저해 효과에 의한 과 혈당 수반 질환의 예방 및 치료제로서의 유용성이 알려져 있다. 현재 설탕 대체 감미료로

서 다방면에 활용되고 있는 xylitol을 경제적으로 생산하고 식생활 향상에 따른 비만을 방지할 수 있는 물질인 arabinose를 대량 생산함으로서 식품 및 의약품의 원료확보에 따른 경제적 이익 뿐 만 아니라 국민복지의 증진 이라는 사회적 기대에 부흥할 수 있을 것이다. 이번 연구에서는 corn fiber를 이용하여 L-arabinase gene을 가지는 있는 gene을 자연계로부터 얻기 위해 퇴비, Metagenome pool 그리고 Indonesian soil에서 선별하였다.

Materials and Methods

2.1. Search and isolation of L-arabinose gene

L-arabinase gene을 선별하기 위해서 여러 가지 gene을 target으로 하여 test하였다. 사용된 균주들은 Metagenome pool, Indonesian soil, compost soil로부터 유래한 균주들을 agar plate에 spreading하여 자라는지 유무를 통해서 선별하였다. 사용된 배지로는 YNB agar media(0.5% Yeast Nitrogen Base, 0.5% arabinogalactan, 1.5% bacto agar)를 사용하였다.

2.2. Enzyme assay

2.2.1 Artificial substrate(ρ-Nitrophenyl arabinofuranoside)

YNB media에서 자란 colony를 LB 또는 NB media에서 10 ml 배양하여, Artificial substrate인 ρ-Nitrophenyl arabinofuranoside와 반응시켜 arabinase activity를 test했다. ρ-Nitrophenyl arabinofuranoside는 0.5 g/L를 사용하였으며, pH 7.0 150 mM citrate buffer를 사용하여, Metagenome pool에 있는 gene은 37℃, compost soil gene과 Indonesian soil gene은 50℃에서 30 min 동안 반응시켰으며, 흡광도는 405 nm에서 측정하였다. 흡광도의 변화에 따라 enzyme activity를 측정하였다. stop solution은 0.5 M Na2CO3·10H2O을 200 μl 넣고 반응을 멈추었다. 1 unit은 1 min 동안 1 μmol의 ρ-Nitrophenol을 생산하는 enzyme의 양으로 정의한다.

2.2.2. Arabinoxylan/ corn fiber

Artificial substrate에서 선별한 균주를 200 ml 배양하여, 10 g/L의 Arabinoxylan과 corn fiber와 50℃에서 72 hrs enzyme reaction을 통해 선별된 균주가 L-arabinase gene을 가지고 있는지 여부는 HPLC를 통해 분석하였다.

2.3. Protein assay

Bradford method를 사용하였으며, Bradford solution은 BIORED제품을 사용하였으며, standard는 BSA(Bovine serum albumin) 2 mg/ml로 하여 standard curve로 정량하였다. Absorbance는 595 nm에서 측정하였다.

2.4. High-performance liquid chromatograph (HPLC)

HPLC 분석에 사용된 pump는 Waters 515 HPLC Pump이며, column은 phenomenex^{R} 300 mm× 7.80 mm이며, detector는 Waters 410 differential Refractometer detector이다. flow rate는 0.6 ml/min이며, injector는 Manual injector이고, injection volume은 50 $\mu\ell$이며, 85℃에서 분석하였다.

Results and discussion

3.1. Selection media and strain

YNB agar media는 yeast nitrogen base 5 g/L, arabinogalactan 5 g/L 그리고 bacto agar 1.5%로 구성되어져 있다. Micro bank에서 분양받은 Metagenome pool genes에 있는 균주들로부터 선별하였다. 37℃에서 24 hrs 배양하였다. Indonesian soil genes은 50℃에서 24 hrs 또는 48 hrs 배양하였다. 그리고 the compost genes은 50℃에서 24 hrs 동안 배양하여, colony 형성을 통해 L-arabinase gene 여부를 확인하였다. 기존에 사용하던 ACS agar media(0.5% arabinogalactan, 0.5% casamino acid, 0.5% sodium chloride , 1.5% bacto agar)에서 선별한 균주들을 YNB media에서 다시 선별하였다. ACS media에서 자랐던 균주들이 YNB media에서 대부분 자라지 않은 것으로 선별하였다. (Figure. 1)

3.2. Artificial substrate

YNB media에서 선별된 3가지 균주들을 가지고 p-Nitrophenyl arabinofuranoside하고의 enzyme reaction을 통해 균주들의 spacific acivity를 확인하는 실험을 실시하였다. (Table. 1)

3.3. High performance liquid chromatograph (HPLC) analysis

Artificial substrate인 p-Nitrophenyl arabinofuranoside와 enzyme reaction을 통해서 선별한 최종 B1029 TS2-8을 corn fiber와 10 g/L로 반응시켰다. Fig. 2는 72hrs 동안 반응

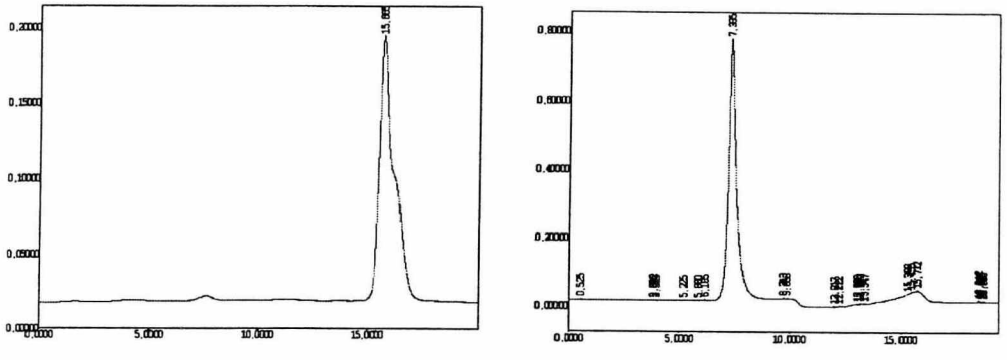
시킨 후, 상등액을 HPLC로 분석하였다. standard인 10 g/L의 arabinose의 분석 시 retention time이 15,666 min이며, sample인 B1029 TS2-8은 15,772 min으로 L-arabinose를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Table.1. Activity of L-arabinase gene in Metagenome pool, compost, indonesian soil.

Strain	Specific activity(U/mg)
B1029 TS2-8	1.11
J55	0.19

(a) (b) (c) (d)

Figure 1. Comparison of YNB media and ACS media. (a)and(c) YNB media, (b)and(d) ACS media. (M: Metagenome pool gene, B: Compost gene, J: Indonesian soil gene).



(a) (b)

Figure 2. HPLC analysis of B1029 TS2-8. (a): 10 g/L of arabinose (b) B1029 TS2-8.

Reference

1. Tatsuji SAKAMOTO, Molecular cloning and nucleotide sequence of an endo -1,5-α -L-arabinase gene from *Bacillus subtilis*, Eur.J.Biochem,245,708-714 (1997).
2. Yoon, Hyang-Sik, Novel Functional Sugar L-Arabinos: Its Functionality, Uses and Production Methods, KOREA J. FOOD SCI. TECHNOL vol. 35. No. 5, pp. 757 ~ 763 (2003).
3. Maria Paiva Raposo, Transcriptional Regulation of Genes Encoding Arabinan-Degrading Enzymes in *Bacillus subilis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. Mar. 2004.p.1287-1296.
4. Badal C. Saha. α-L-arabinofuranosidases :biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. Biotechnology Advances 18(2000)403-423.
5. Makoto TAKAO, Molecular Cloning of the Gene Encoding Thermostable Endo-1,5-α -L-arabinase of Bacillus thermodenitrificans TS-3 and Its Expression in *Bacillus subtillis Biosci, Biotechnol. Biochem.*, 66(2),403-433, 2002.