

# **Biosynthesis, purification and characterization of $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1**

Marzena Jedrzejczak-Krzepkowska\*, Karolina L. Tkaczuk, Stanislaw Bielecki

Institute of Technical Biochemistry, Technical University of Lodz

Stefanowskiego Street 4/10, 90-924 Lodz, Poland

## **Abstract**

*Bifidobacterium longum* KN29.1 exhibits greater  $\beta$ -fructofuranosidase activity than two *Bifidobacterium animalis* strains with highest activity observed when *B. longum* KN29.1 was grown on fructose. Properties of the native  $\beta$ -fructofuranosidase from *B. longum* KN29.1 and recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase were identical. The molecular mass of the purified  $\beta$ -fructofuranosidase was approximately 67 kDa as determined by SDS-PAGE. Its isoelectric point was 4.6. The enzyme was stable at pH 5.7-9.1 and the temperature up to 45 °C. It was optimally active in Actilight 950P and sucrose hydrolysis at pH 6.0-6.2 while the optimum temperature of these processes was 50 °C and 37-45 °C, respectively. In the presence of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$  ions and p-chloromercuribenzoic acid (1 mM) *B. longum* KN29.1  $\beta$ -fructofuranosidase activity was completely inhibited, its slight stimulation was observed in solutions containing  $\text{Mn}^{2+}$  (1 mM). This enzyme showed higher affinity for nystose ( $K_m$  1.2 $\pm$ 0.15 mM) and 1-kestose ( $K_m$  4.6 $\pm$ 0.2 mM) than for sucrose ( $K_m$  29.4 $\pm$ 1.5 mM). It catalyzed the hydrolysis of sucrose, 1-kestose and inulin at the relative activities of 100, 251.7 $\pm$ 7.36 and 62.2 $\pm$ 1.15%, respectively. TLC and HPLC analysis demonstrated that the enzyme released  $\beta$ -fructofuranose from the non-reducing end of inulin and fructooligosaccharides. The comparative analysis of known crystallographic structures from the glycoside hydrolase family 32 (GH32) available in databases was performed and a three-dimensional model of *B. longum* KN29.1  $\beta$ -fructofuranosidase was proposed. The modeled structure was compared to the structure of *B. longum* KN29.1  $\beta$ -fructofuranosidase which was solved by X-ray crystallography and published after the first version of this manuscript had been submitted. The described *B. longum* KN29.1 enzyme is a monomeric protein consisting of 2 domains: 5-bladed  $\beta$ -propeller catalytic domain and  $\beta$ -sandwich domain.

*Keywords:  $\beta$ -fructofuranosidase, invertase, Bifidobacterium, fructooligosaccharides, purification, homology model*

## **Biosynteza, oczyszczanie i charakterystyka $\beta$ -fruktofuranazy z *Bifidobacterium longum* KN29.1**

$\beta$ -fruktofuranazydaza z *Bifidobacterium longum* KN29.1 wykazuje większą aktywność w porównaniu z tym samym białkiem pochodzącym z dwóch badanych szczepów *Bifidobacterium animalis*. Największą aktywność tego enzymu zaobserwowano, gdy *B. longum* KN29.1 hodowano w pożywce z dodatkiem fruktozy. Właściwości zarówno natywnej  $\beta$ -fruktofuranazydazy z *B. longum* KN29.1 jak i tej rekombinowanej były identyczne. Masa molekularna  $\beta$ -fruktofuranazydazy, wyznaczona metodą SDS-PAGE, wyniosła około 67 kDa. Punkt izoelektryczny był równy 4.6. Enzym ten charakteryzował się stabilnością w pH 5.7-9.1 i w temperaturze do 45 °C. Wykazywał optymalną aktywność w reakcji z Actilight 950P oraz w hydrolizie sacharozy w pH 6.0-6.2 i w temperaturze odpowiednio 50 °C i 37-45 °C.  $\beta$ -fruktofuranazydaza z *B. longum* KN29.1 była całkowicie inaktywowana w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Hg}^{+}$  oraz p-chlorortęciobenzoesanu (1 mM), natomiast w roztworach zawierających jony  $\text{Mn}^{2+}$  (1 mM) zaobserwowano nieznacznie zwiększoną jej aktywność. Enzym ten wykazywał wyższe powinowactwo do nystozy ( $K_m$  1.2±0.15 mM) i 1-kestozy ( $K_m$  4.6±0.2 mM) niż do sacharozy ( $K_m$  29.4±1.5 mM). W hydrolizie sacharozy, 1-kestozy i inuliny wyznaczono aktywność względną o wartości odpowiednio 100, 251.7±7.36 i 62.2±1.15%. Analizy TLC i HPLC pokazały, że enzym katalizuje odszczepienie reszty  $\beta$ -fruktofuranazydazowej od nie redukującego końca inuliny i fruktooligosacharydów.

Ponadto, zaproponowano model struktury  $\beta$ -fruktofuranazydazy z *B. longum* KN29.1 wykonany za pomocą modelowania porównawczego, jako szablonów użyto znanych struktur krystalicznych z 32 rodziny hydrolaz glikozydowych (GH32) dostępnych w bazach danych.

Model ten porównano ze strukturą  $\beta$ -fruktofuranazydazy z *B. longum* KN29.1 rozwiązaną metodą krystalografii rentgenowskiej. Opisany enzym z *B. longum* KN29.1 to monomeryczne białko składające się z dwóch domen: 5-cio łopatego  $\beta$ -śmigła i  $\beta$ -kanapki.

*Słowa kluczowe:  $\beta$ -fruktofuranazydaza, invertaza, Bifidobacterium, fruktooligosacharydy, oczyszczanie, model homologiczny*