

## *Salmonella typhimurium*에서 유래한 Mannitol Dehydrogenase 유전자의 대장균 내 발현 및 효소특성 규명

장명운 · 박정미 · 김민정 · 강정현 · 이소원 · 김태집\*

충북대학교 식품공학과

### Enzymatic Characterization of *Salmonella typhimurium* Mannitol Dehydrogenase Expressed in *Escherichia coli*

Myoung-Uoon Jang, Jung-Mi Park, Min-Jeong Kim, Jung-Hyun Kang,  
So-Won Lee, and Tae-Jip Kim\*

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University,  
Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received June 5, 2012 / Accepted June 25, 2012)

A mannitol dehydrogenase (*StMDH*) gene was cloned from *Salmonella typhimurium* LT2 (KCTC 2421) and overexpressed in *Escherichia coli*. It has a 1,467 bp open reading frame encoding 488 amino acids with deduced molecular mass of 54 kDa, which shares approximately 36% of amino acid identity with known long-chain dehydrogenase/reductase (LDR) family enzymes. The recombinant *StMDH* showed the highest activity at 30 °C, and pH 5.0 and 10.0 for D-fructose reduction and D-mannitol oxidation, respectively. On the contrary, it has no activity on glucose, galactose, xylose, and arabinose. *StMDH* can catalyze the oxidative/reductive reactions between D-fructose and D-mannitol only in the presence of NAD<sup>+</sup>/NADH as coenzymes. These results indicate that *StMDH* is a typical NAD<sup>+</sup>/NADH-dependent mannitol dehydrogenase (E.C. 1.1.1.67).

**Keywords:** *Salmonella typhimurium* LT2, mannitol dehydrogenase, NAD<sup>+</sup>/NADH-dependent activity

당알코올은 당의 aldehyde 혹은 ketone기를 환원하여 얻어지는 다가 알코올을 총칭한다. 그 중에서도 mannitol (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)은 세균, 곰팡이, 조류, 효모 뿐 아니라 과일, 채소를 포함한 대부분의 고등식물에도 널리 분포하는(Lewis and Smith, 1967) hexose (6탄당) 유래 당알코올의 일종으로, 세포기질에 축적되어 대사과정의 불활성화를 방지하는 호환성 용질로서 중요한 역할을 하며(Smirmoff and Cumbes, 1989; Stoop and Pharr, 1994; Kets *et al.*, 1996), 곰팡이에서 삼투압 조절 및 호흡과정에 중요한 기능을 하는 것으로 보고되었다(Clark *et al.*, 2003). 또한 mannitol은 세포 내의 활성산소를 중화하는 자유라디칼 제거활성을 가지고 있어 병원성 미생물에 대한 저항성 인자로 작용할 수 있으며(Delhaes *et al.*, 2010), 병원성 곰팡이의 mannitol 생산에 관여하는 mannitol dehydrogenase (MDH)가 알레르기성 질환을 유발하는 항원으로 작용한다는 연구결과도 있다(Simon-Nobbe *et al.*, 2006).

Mannitol은 인체 내에서 원활하게 대사되기 어려우므로, 식

품, 화장품, 의약품 산업 분야에서 저칼로리 감미료 또는 충치 예방 등의 기능성 소재로 활용 가능하다(Wang and Eys, 1981). 일반적으로 mannitol은 fructose와 glucose를 1:1로 섞은 후, 고온·고압 조건에서 Raney nickel 촉매에 의해 수소화하여 생산되며, 생성된 전환산물은 30% mannitol과 70% sorbitol의 혼합 형태이므로 다시 온도를 낮추고 결정화함으로써 최종적으로 mannitol만을 회수하게 된다(Wisnlak and Simon, 1979). 이러한 화학적 생산법에 비해 생산수율을 높이고 정제비용을 절감하고자 유산균을 이용하여 mannitol만을 생산하는 연구가 진행되었으며(Wisselink *et al.*, 2002; Carvalheiro *et al.*, 2011), 또한 대장균을 이용하여 glucose를 직접 mannitol로 전환하는 기술도 시도되었다(Kaup *et al.*, 2005). 이 외에도 고정화 MDH와 NAD(P)H 조효소의 재순환 방법을 이용하여 fructose를 mannitol로 전환하는 효소생산 기술이 연구되었다(Slatner *et al.*, 1998; Park and Zeikus, 2003). MDH는 NAD(P)<sup>+</sup>를 조효소로 이용하여 mannitol을 fructose로 산화시키거나 반대로 NAD(P)H를 사용하여 fructose를 mannitol로 환원시키는 dehydrogenase/reductase (DR) family에 속하는 효소이다(Slatner *et al.*, 1998, 1999). 이러한 MDH 효소들은 분자량에

\*For correspondence. E-mail: tjkim@cbnu.ac.kr; Tel.: +82-43-261-3354; Fax: +82-43-271-4412

따라 3개의 범주로 크게 나뉘는데, 주로 곰팡이에 존재하며 250개 이하의 아미노산으로 이루어진 short-chain DR (SDR)은 촉매활성을 위해 금속이온을 필요로 하지 않으며 (Horer *et al.*, 2001; Nuss *et al.*, 2010), 일부 세균 유래 MDH로 350개 이하의 아미노산으로 이루어진 medium-chain DR (MDR)은 주로  $Zn^{2+}$  이온 의존적인 특성을 나타낸다 (Sasaki *et al.*, 2005; Ceccaroli *et al.*, 2007). 마지막으로 다가 알코올에 특이적이며, 주로 세균에서 유래하는 monomer 형태의 long-chain DR (LDR)도 보고되었다 (Schneider *et al.*, 1993; Slatner *et al.*, 1999).

*Salmonella enterica* serovar typhimurium str. LT2 (KCTC 2421; 이하 *S. typhimurium* LT2)는 사람이나 동물의 티푸스성 질환이나 식중독을 일으키는 병원성균 (Fields *et al.*, 1986)으로 mannitol에 대한 생리적 대사경로를 가지며 (Berkowitz, 1971), MDH 유전자를 가지고 있지만 이에 대한 연구는 아직 충분히 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 *S. typhimurium* LT2 균주의 genome로부터 MDH 추정 유전자를 클로닝하여 대장균에서 대량으로 발현하고, 기존에 보고된 다양한 미생물 유래 MDH와 유전자 구조, 서열 상동성 및 효소특성 등을 비교함으로써 유전적·효소학적으로 유용한 정보를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 연구에 사용된 일반 시약과 효소반응 기질 및 미생물 배지는 각각 Sigma-Aldrich (USA)와 Duchefa Biochemie (Netherlands)로부터 구입하여 사용하였다. 유전자 조작을 위한 제한효소 및 T4 DNA ligase 등은 Roche Applied Science (Germany)에서 구입하였으며, 각종 PCR 및 sequencing primer는 Bioneer (Korea)로부터 합성하였다. 또한 agarose와 GENE CLEAN turbo nucleic acid purification kit는 Qbiogene (USA)에서, 단백질 정제에 사용한 Ni-NTA affinity column은 QIAGEN (Germany)에서 구입하여 사용하였다. *StMDH* 유전자의 PCR 클로닝에 주형으로 사용한 *S. typhimurium* LT2 (KCTC 2421) 균주의 염색체 DNA는 한국생명공학연구원 미생물프론티어사업단으로부터 제공받았다.

### 유전자의 PCR 증폭

*S. typhimurium* LT2 염색체 DNA를 주형으로 사용하여 *StMDH* 유전자를 선택적으로 증폭하였다. *StMDH* 유전자의 증폭을 위해 *StMDH*-N(5'-TGGATCCATGCAAAACAGGCT-TTTATCG-3')과 *StMDH*-C(5'-TAAGCTTTTCAACCGCTC-GGCATA-3') primer set을 사용하였다. PCR 증폭은 *Taq* DNA polymerase (Roche Applied Science)와 P<sub>x</sub>2 thermal cycler (Thermo-Hybaid, UK)를 사용하여 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초로 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 추가로 증폭한 후 반응을 종료하였다.

### 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

증폭한 *StMDH* 유전자는 pMD18-T Easy (TaKaRa Biomedical

Inc., Japan) 벡터에 클로닝한 후, 서울대학교 유전체지원센터의 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 결정하여 변이 여부를 확인하였다. *StMDH* 유전자를 *Bam*HI과 *Hind*III 제한효소로 처리하고, pET-21a (Novagen, Germany) 발현벡터에 삽입하여 pET*StMDH*를 얻었다.

### 유전자의 대장균 내 대량 발현

pET*StMDH*를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하여 재조합체를 얻은 후, LBA (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 µg/ml ampicillin) 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 배양액의 흡광도(600 nm)가 0.4-0.6에 도달한 후, 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 *StMDH* 유전자의 발현을 유도하였으며, 16시간 동안 배양하였다.

### 재조합 효소의 정제

원심분리로 회수한 균체는 lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.0)에 현탁하고, ultrasonicator (VCX750, Sonics & Materials Inc., USA)로 파쇄하였다. 원심분리(4°C, 13,000 rpm, 15분)을 통해 불용성 침전물을 제거하고 얻은 상층액을 Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) column에 결합시킨 후, wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.0)으로 세척하고, 최종적으로 elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 7.0)으로 회수하였으며, 정제된 효소는 농축 후 최적 buffer로 투석하여 이후의 실험에 사용하였다.

### 단백질 정량 및 분자량 분석

정제된 *StMDH*의 대략적인 분자량은 SDS-PAGE를 이용하여 측정하였다. 전기영동에는 12% separating gel과 Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, USA) 전기영동 kit를 사용하였으며, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후, 다시 destaining solution (20% methanol, 10% acetic acid)를 처리하여 효소 단백질을 확인하였다. 분자량 비교를 위해 molecular weight markers (M.W. 30,000-200,000; Sigma-Aldrich)를 표준물질로 사용하였고, 효소 단백질의 농도는 BCA™ protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., USA)를 이용하여 측정하였다.

### 효소 활성 측정

*StMDH*의 산화활성을 측정하기 위해 200 mM의 D-mannitol 기질과 0.5 mM NAD(P)<sup>+</sup>를 조효소로 함유한 50 mM sodium carbonate buffer (pH 10.0)를 사용하였고, 환원활성 측정에는 200 mM의 D-fructose 기질과 0.5 mM NAD(P)H를 첨가한 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)의 조건에서 적당량의 정제된 효소를 첨가하여 최종 300 µl로 반응하였다. 30°C에서 10분 동안 효소반응을 진행하면서 PowerWave™ microplate spectrophotometer (BIOTEK Instrument Inc., USA)를 이용하여 340 nm에서 1분 간격으로 반응액의 흡광도 변화를 연속 측정하였다. *StMDH* 효소의 활성 1 unit는 1분당 1 µmol의 NAD<sup>+</sup>를 NADH로 전환

**Table 1.** Comparison of amino acid sequence identity among microbial mannitol dehydrogenases (MDHs)

MDH <sup>a</sup>	Amino acid sequence identity (%)					
	LDR <sup>b</sup>		MDR		SDR	
	<i>Rs</i> MDH	<i>Pf</i> MDH	<i>Lr</i> MDH	<i>Tb</i> MDH	<i>Ab</i> MDH	<i>Ch</i> MDH
<i>St</i> MDH	36.7	36.6	10.4	9.0	7.4	5.9
<i>Rs</i> MDH		42.6	10.3	11.5	8.7	6.3
<i>Pf</i> MDH			9.7	9.9	5.3	6.9
<i>Lr</i> MDH				27.8	10.1	10.7
<i>Tb</i> MDH					10.0	12.6
<i>Ab</i> MDH						32.4

<sup>a</sup> The abbreviations of various microbial MDHs: *St*MDH, MDH from *Salmonella typhimurium* (GenBank accession of NP460468; this study); *Rs*MDH, from *Rhodobacter sphaeroides* (YP353172; Schneider et al., 1993); *Pf*MDH, from *Pseudomonas fluorescens* (AF007800; Slatner et al., 1999); *Lr*MDH, *Lactobacillus reuteri* (AY485531; Sasaki et al., 2005); *Tb*MDH, from *Tuber borchii* (DQ223686; Ceccaroli et al., 2007); *Ab*MDH, from *Agaricus bisporus* (AF053764; Horer et al., 2001) *Ch*MDH, from *Cladosporium herbarum* (AY191816; Nuss et al., 2010).

<sup>b</sup> The classification of dehydrogenase/reductase (DR) family: SDR, short-chain DR; MDR, medium-chain DR; LDR, long-chain DR.

(mannitol 산화반응) 또는 NADH를 NAD<sup>+</sup>로 전환(fructose 환원반응)하는 효소의 양으로 정의하였다.

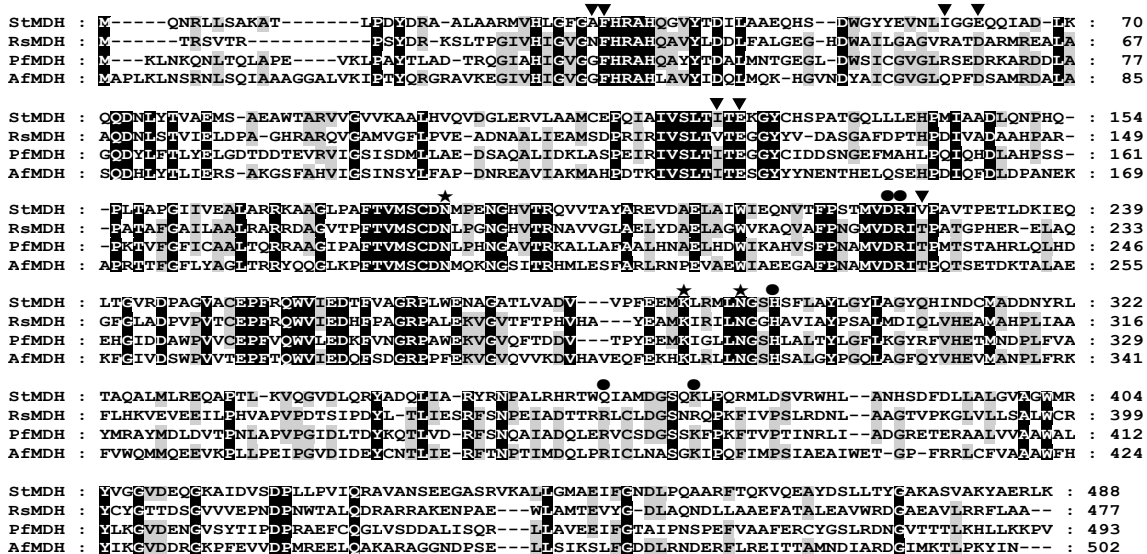
**결과 및 고찰**

***S*MDH 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석**

다양한 미생물 유래 MDH 유전자의 분포를 확인하기 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov)의 유전체 데이터베이스를 검색하였다. *S. typhimurium* LT2 genome에서 MDH로 추정되는

유전자(*St*MDH; GenBank accession No. NP460468)을 발굴하고, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 검색을 통해, 해당 유전자가 다양한 미생물 유래 MDH 유전자와 상동성을 나타냄을 확인하였다.

*S. typhimurium* 염색체 DNA를 주형으로 PCR하여 *St*MDH 유전자를 선택적으로 증폭하였고, 생성된 단편을 pMD-18T 벡터에 삽입한 후 pMD*St*MDH로 명명하였다. M13 forward 및 reverse sequencing primer를 사용하여 유전자의 염기서열을 확인한 결과, 얻어진 유전자의 염기서열이 데이터베이스 상의 서열과 일치함을 확인하였다.



**Fig. 1.** Amino acid sequence alignment of microbial mannitol dehydrogenases. *Salmonella typhimurium* MDH (*St*MDH), *Rhodobacter sphaeroides* MDH (*Rs*MDH), *Pseudomonas fluorescens* MDH (*Pf*MDH), and *Aspergillus fumigatus* MDH (*Af*MDH). Identical residues among all MDHs were shown in black boxes. (★) catalytic amino acid residues, (●) residues involving substrate recognition, (▼) residues for NAD<sup>+</sup>-binding (Horer et al., 2001).

### SMDH의 1차 구조 분석

MDH를 포함하는 dehydrogenase/reductase (DR) 계열의 효소는 서열 상동성, 단백질의 크기, 조효소 결합부위의 motif 서열을 토대로 SDR, MDR, LDR의 3종류로 나누어진다. SDR 계열 효소의 경우, 전형적인 YXXK 활성부위와 GXXXGXXG 형태의 조효소 결합부위가 존재한다(Horer *et al.*, 2001; Nuss *et al.*, 2010). MDR 계열의 효소는 Zn<sup>2+</sup> 이온 의존적 활성을 나타내며, N-말단에 GXGXXG의 조효소 결합부위 motif를 가진다(Sasaki *et al.*, 2005; Ceccaroli *et al.*, 2007). 가장 긴 1차 구조를 가진 LDR 계열의 경우, KXXXXNXXH의 활성부위를 가지는 것으로 보고되었다(Schneider *et al.*, 1993; Slatner *et al.*, 1999).

기존에 보고된 다양한 미생물 유래의 MDH와 *StMDH*의 아미노산 서열 상동성을 비교한 결과, LDR 계열에 속하는 *Rhodobacter sphaeroides* (Schneider *et al.*, 1993) 및 *Pseudomonas fluorescens* (Slatner *et al.*, 1999) 유래 MDH와 각각 36.7%와 36.6%의 상동성을 보였으나, MDR 계열인 *Lactobacillus reuteri* (Sasaki *et al.*, 2005), *Tuber borchii* (Ceccaroli *et al.*, 2007) 유래 MDH와는 10% 내외의 상동성을 나타내었으며, *Agaricus bisporus* (Horer *et al.*, 2001) 및 *Cladosporium herbarum* (Nuss *et al.*, 2010) 유래의 SDR 계열 효소와는 5-7%의 매우 낮은 서열 상동성을 보였다(Table 1).

또한 단백질의 3차구조가 이미 알려진 LDR 계열 MDH (Schneider *et al.*, 1993; Slatner *et al.*, 1999; Krahulec *et al.*, 2011)와의 아미노산 서열 비교를 통해, 아미노(N)-말단 domain에 Rossmann fold 형태의 조효소 결합부위를 구성하는 Phe33, Ile125, Glu127 아미노산 잔기와 카르복시(C)-말단

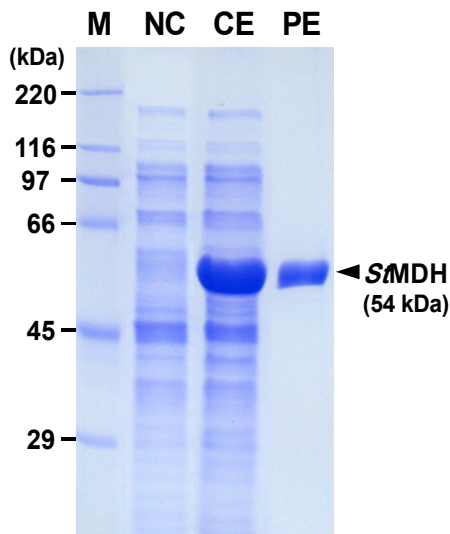
domain의  $\alpha$ -helix 구조로 이루어진 기질 결합부위를 구성하는 Asp224, Arg225, Lys374 잔기, 효소의 활성부위를 구성하는 Asn185, Lys289, Asn294, His297잔기 (Kavanagh *et al.*, 2002) 등이 *StMDH*의 서열에서도 잘 보존되어 있음을 확인하였다 (Fig. 1). 따라서 본 연구에서 클로닝한 *StMDH* 유전자는 488 개의 아미노산으로 이루어진 LDR 계열의 MDH 유전자일 것으로 예상하였다.

### SMDH의 대장균 내 발현 및 재조합 효소의 정제

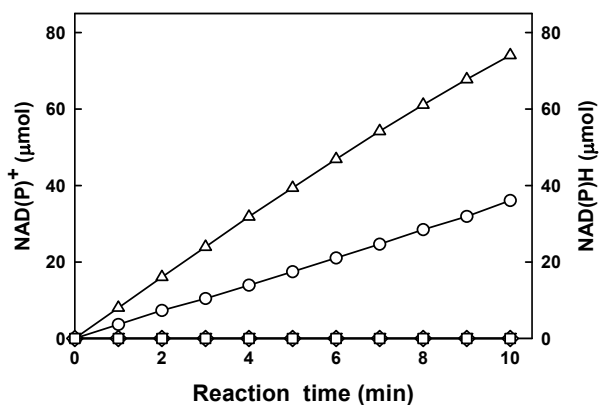
pMDSMDH를 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리하고, pET-21a 발현벡터에 삽입하여 재조합 플라스미드인 pETSMDH를 제조하였다. 재조합 *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 IPTG 첨가 조건에서 LBA 액체배지에 배양하였으며, 6개의 histidine 잔기가 카르복시-말단에 결합된 형태로 유도발현된 *StMDH*는 Ni-NTA column을 통해 쉽게 정제되었다. 결과적으로 아미노산 서열로부터 예상한 분자량(54 kDa)과 유사한 크기의 재조합 *StMDH*가 대장균 내에서 성공적으로 대량 발현되었으며, 정제도(purification fold)는 4.2, 회수율(recovery yield)는 15% 수준이었다(Fig. 2).

### SMDH의 효소특성 규명

정제된 재조합 *StMDH*의 효소활성을 확인하기 위하여 D-mannitol 또는 D-fructose의 산화·환원 과정에서 전환되는 조효소 NAD(P)<sup>+</sup> 또는 NAD(P)H의 흡광도(340 nm) 변화를 연속적으로 측정하였으며, 1 unit는 1분당 1  $\mu$ mol의 NAD<sup>+</sup>를 NADH로 전환(mannitol 산화반응) 또는 NADH를 NAD<sup>+</sup>로 전환(fructose 환원반응)하는 효소의 양으로 정의하였다. *StMDH*는 200 mM D-mannitol 기질과 함께 0.5 mM의 NAD<sup>+</sup>를 조효소로 사용한 반응에서 D-fructose로의 전환을 촉매하는 활성을 나타내었으며, D-fructose와 NADH를 각각 기질 및 조효소로 사용한 역반응의 경우에도 활성을 확인할 수 있었으나,



**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of recombinant 6xHis-tagged *StMDH* purified by Ni-NTA column chromatography. M, protein molecular weight markers (Sigma-Aldrich); NC, cell extract from *E. coli* BL21 (DE3) with pET-21a as a negative control; CE, cell extract from *E. coli* BL21 (DE3) harboring pETSMDH; PE, purified 6xHis-tagged *StMDH*.



**Fig. 3.** Time-course evaluation of *StMDH* oxidative/reductive activities and coenzyme dependency. Enzyme activity of 6xHis-tagged *StMDH* was measured under the reaction conditions of 200 mM D-mannitol substrate with NAD<sup>+</sup> (○) or NADP<sup>+</sup> (◇), and D-fructose with NADH (△) or NADPH (□) as coenzymes, respectively.

NADP<sup>+</sup> 또는 NADPH를 조효소로 사용한 경우에는 활성이 검출되지 않았다(Fig. 3). 따라서 *StMDH*는 D-mannitol 산화반응 및 D-fructose 환원반응에 대하여 각각 0.79 및 1.61 unit/mg의 비활성값(specific activity)를 가지는 NAD<sup>+</sup>/NADH-의존적인 MDH의 일종임을 확인하였다.

기질에 대한 특이성을 확인하기 위하여 다양한 당알콜을 (D-mannitol, D-sorbitol, D-xylitol)과 육탄당(D-glucose, D-fructose, D-galactose) 및 오탄당(D-arabinose, D-xylose)을 기질로 반응시킨 결과, D-mannitol과 D-fructose 사이에서만 전환반응이 관찰되었으며, 다른 기질에 대한 활성은 검출되지 않았다(Fig. 4). 이상의 결과로부터 *StMDH* 효소는 D-mannitol과 D-fructose에 특이적으로 작용하는 NAD<sup>+</sup>/NADH-의존형 MDH (EC 1.1.1.67) 형태의 효소인 것으로 판단하였다. *StMDH*의 최적 반응온도를 결정하기 위하여 20-45°C의 다양한 온도조건에서 MDH 활성을 측정된 결과 30°C에서 가장 높은 활성을 보였고, 각각의 온도에서 30분간 방치 후 잔존활성을 측정된 결과, 30°C까지는 열안정성을 가지나, 40°C에서 26%, 45°C에서는 11%로 잔존활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다(Fig. 5A). 한편, *StMDH*에 의한 D-mannitol 산화반응의 경우 pH 10.0에서 가장 높은 활성을 보인 반면, D-fructose 환원반응의 경우에는 pH 5.0이 최적조건인 것으로 나타났으며, pH 5.0-10.0의 넓은 pH 범위에서 80% 이상의 높은 효소안정성을 보였다(Fig. 5B). 이처럼 산화·환원반응의 최적 pH 조건이 상이한 결과는 다양한 MDH 효소에서 보고되었으며, *StMDH*의 경우, 다른 미생물 유래 MDH와 비교하여 우수한 효소적 안정성을 나타내었다(Table 2). 또한, 다양한 금속이온 및 유기화합물에 의한 영향을 확인하기 위하여 10 mM 농도 조건에서 D-fructose 환원 활성을 측정된 결과, 대부분의 경우 활성이 저해되는 것으로

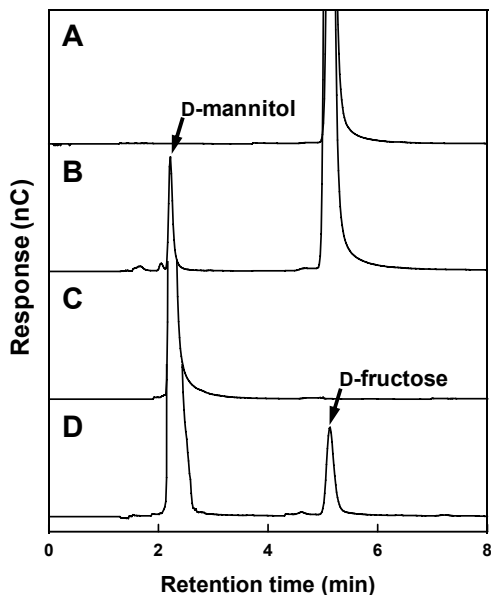


Fig. 4. HPAEC analysis of reaction products incubated with *StMDH*. (A) Before and (B) after the reduction of D-fructose, (C) before and (D) after the oxidation of D-mannitol at 30°C for 9 h.

나타났으며, 일부 금속이온(Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) 및 SDS는 90% 이상의 강한 저해활성을 보였다(Table 3).

이상의 결과를 종합하여 병원균인 *Salmonella typhimurium* LT2에서 유래한 *StMDH*는 전형적인 LDR 계열의 NAD<sup>+</sup>/NADH-의존형 MDH임을 확인하였으며, 향후 병원성균의 탄수화물 대사경로 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

적요

*Salmonella typhimurium* LT2 (KCTC 2421)로부터 mannitol dehydrogenase (*StMDH*)로 추정되는 유전자를 클로닝하고, 대장균에서 대량 발현하였다. 이 유전자는 488개의 아미노산 서열(약 54 kDa)을 암호화하는 1,467 bp의 염기로 구성되며, 이미 보고된 long-chain dehydrogenase/ reductase (LDR) 계열 효소들과 약 36%의 아미노산 서열 상동성을 나타내었다. 재조합 *StMDH*의 최적 반응온도는 30°C이며, pH 5.0의 조건에서 최대의 D-fructose 환원활성, 그리고 pH 10.0에서 최대의 D-mannitol 산화활성을 보인다. 반면에 glucose, galactose, xylose, arabinose 등의 기질에 대해서는 활성을 보이지 않았다. 이 효소는 NAD<sup>+</sup>/NADH 존재 하에서만 산화·환원 활성을 가지며, NADP<sup>+</sup>/NADPH는 조효소로 이용하지 못하였다.

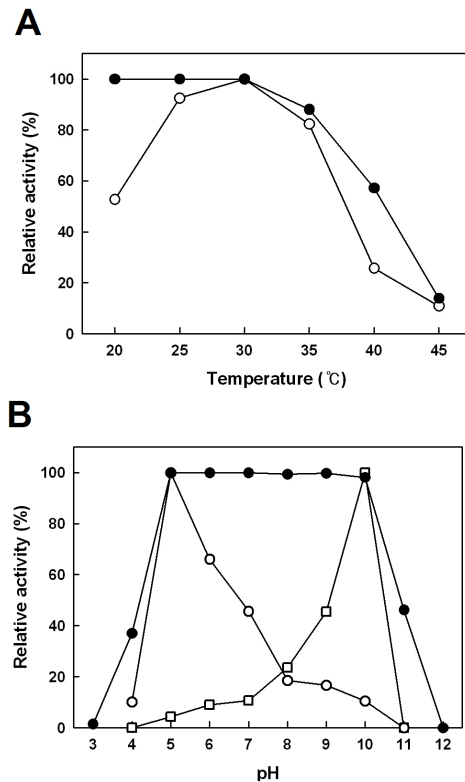


Fig. 5. Effect of temperature (A) and pH (B) on the *StMDH* activity and stability. The activities in D-fructose reduction (○), D-mannitol oxidation (□), and enzyme stability (●) were determined at various temperatures and pH conditions, respectively.



**Table 2.** Enzymatic properties of microbial NAD<sup>+</sup>-dependent mannitol dehydrogenases (LDRs)

Microbial origin	M.W. (kDa)	Oligomeric state	Optimal pH		Optimal temp. (°C)	Reference
			Oxidation	Reduction		
<i>Salmonella typhimurium</i>	54	ND <sup>a</sup>	10.0	5.0	30	This work
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	54	Monomer	ND	7.0	25	Slatner <i>et al.</i> (1999)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	51	Monomer	9.0	6.5	30	Schneider <i>et al.</i> (1993)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	Dimer	9.0	7.5	25	Perfect <i>et al.</i> (1996)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	58	ND	ND	7.1	25	Krahulec <i>et al.</i> (2011)

<sup>a</sup>ND, not determined**Table 3.** Effect of metal ions and organic compounds on *StMDH* activity

Effector <sup>a</sup>	Relative activity (%) <sup>b</sup>
None	100.0
CaCl <sub>2</sub>	49.0
CoCl <sub>2</sub>	55.6
CuSO <sub>4</sub>	6.2
FeSO <sub>4</sub>	8.8
LiCl	35.6
MgSO <sub>4</sub>	9.8
MnCl <sub>2</sub>	51.0
NaCl	71.1
NiCl <sub>2</sub>	33.0
ZnSO <sub>4</sub>	6.7
EDTA	75.2
SDS	7.2

<sup>a</sup> 10 mM final effector concentration<sup>b</sup> Fructose reduction activity

결론적으로 *StMDH*는 전형적인 NAD<sup>+</sup>/NADH 의존형의 mannitol dehydrogenase (EC 1.1.1.67)임을 확인하였다.

### 감사의 말

이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

### 참고문헌

- Berkowitz, D.** 1971. D-Mannitol utilization in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **105**, 232–240.
- Carvalho, F., Moniz, P., Duarte, L., Esteves, M., and Gírio, F.** 2011. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 221–227.
- Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guescini, M., Polidori, E., Buffalini, M., Menotta, M., Pierleoni, R., Barbieri, E., and Stocchi, V.** 2007. Identification and characterization of the *Tuber borchii* D-mannitol dehydrogenase which defines a new subfamily within the polyol-specific medium chain dehydrogenases. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 965–978.
- Clark, A., Blissett, K., and Oliver, R.** 2003. Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyper-osmotic

- stress and in planta. *Planta* **216**, 614–619.
- Delhaes, L., Frealle, E., and Pinel, C.** 2010. Serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: State of the art and further challenges. *Med. Mycol.* **48**, S77–S87.
- Fields, P.L., Swanson, R.V., Haidaris, C.G., and Heffron, F.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5189–5193.
- Horst, S., Stoop, J., Mooibroek, H., Baumann, U., and Sassoon, J.** 2001. The crystallographic structure of the mannitol 2-dehydrogenase NADP<sup>+</sup> binary complex from *Agaricus bisporus*. *J. Biol. Chem.* **276**, 27555–27561.
- Kaup, B., Bringer-Meyer, S., and Sahn, H.** 2005. D-Mannitol formation from D-glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 397–403.
- Kavanagh, K.L., Klimacek, M., Nidetzky, B., and Wilson, D.K.** 2002. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase binary and ternary complexes. *J. Biol. Chem.* **277**, 43433–43442.
- Kets, E.P., Galinski, E.A., de Wit, M., de Bont, J.A., and Heipieper, H.J.** 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* **178**, 6665–6670.
- Krahulec, S., Armao, G.C., Klimacek, M., and Nidetzky, B.** 2011. Enzymes of mannitol metabolism in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*-kinetic properties of mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase and mannitol 2-dehydrogenase, and their physiological implications. *FEBS J.* **278**, 1264–1276.
- Lewis, D.H. and Smith, D.C.** 1967. Sugar alcohol (polyols) in fungi green plants. *New Phytol.* **66**, 143–184.
- Nuss, D., Goettig, P., Magler, I., Denk, U., Breitenbach, M., Schneider, P.B., Brandstetter, H., and Simon-Nobbe, B.** 2010. Crystal structure of the NADP-dependent mannitol dehydrogenase from *Cladosporium herbarum*: Implications for oligomerisation and catalysis. *Biochimie* **92**, 985–993.
- Park, D.H. and Zeikus, J.G.** 2003. Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 348–355.
- Perfect, J.R., Rude, T.H., Wong, B., Flynn, T., Chaturvedi, V., and Niehaus, W.** 1996. Identification of a *Cryptococcus neoformans* gene that directs expression of the cryptic *Saccharomyces cerevisiae* mannitol dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.* **178**, 5257–5262.
- Sasaki, Y., Laivenieks, M., and Zeikus, J.G.** 2005. *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 *mdh* gene cloning and recombinant mannitol dehydrogenase characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 36–41.
- Schneider, K.H., Giffhorn, F., and Kaplan, S.** 1993. Cloning, nucleotide sequence and characterization of the mannitol dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2475–2484.

- Simon-Nobbe, B., Denk, U., Schneider, P.B., Radauer, C., Teige, M., Cramer, R., Hawranek, T., Lang, R., Richter, K., Schmid-Grendelmeier, P., and *et al.*** 2006. NADP-dependent mannitol dehydrogenase, a major allergen of *Cladosporium herbarum*. *J. Biol. Chem.* **281**, 16354–16360.
- Slatner, M., Nagl, G., Haltrich, D., Kulbe, K.D., and Nidetzky, B.** 1998. Enzymatic synthesis of mannitol: reaction engineering for a recombinant mannitol dehydrogenase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **864**, 450–453.
- Slatner, M., Nidetzky, B., and Kulbe, K.D.** 1999. Kinetic study of the catalytic mechanism of mannitol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochemistry* **38**, 10489–10498.
- Smirnov, N. and Cumbes, Q.J.** 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057–1060.
- Stoop, J. and Pharr, D.M.** 1994. Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients. *Plant Physiol.* **106**, 503–511.
- Wang, Y.M. and Eys, J.** 1981. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. *Annu. Rev. Nutr.* **1**, 437–475.
- Wisnlak, J. and Simon, R.** 1979. Hydrogenation of glucose, fructose, and their mixtures. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **18**, 50–57.
- Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., and Grobbee, G.J.** 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int. Dairy J.* **12**, 151–161.