

## *Corynebacterium lactofermentum*에서 *Bacillus subtilis*의 Mannanase 유전자 발현

윤기홍\*

우송대학교 식품생물학과

**Expression of a *Bacillus subtilis* Mannanase Gene in *Corynebacterium lactofermentum*. Yoon, Ki-Hong\*.**  
*Department of Food Science & Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea* – A *Bacillus subtilis* mannanase gene was subcloned into an *Escherichia coli* - *Corynebacterium lactofermentum* shuttle vector pHE83, and the resultant plasmid pHE83M was transferred into an endogenous plasmid-free strain of *C. lactofermentum*. Mannanase produced by the recombinant *C. lactofermentum* (pHE83M) was secreted extracellularly at the level of 86%, and the remaining activity of mannanase was detected in the cell-free extract. The maximum mannanase productivity of the recombinant strain reached 8.1 unit/mL in the culture filtrate of LB medium. According to the zymogram of mannanase on SDS-PAGE, it was found that the mannanase produced by the recombinant *C. lactofermentum* could be maintained stably with a migration identical to the mannanase produced by the parental strain, *B. subtilis* WL-3.

**Key words:** *Bacillus subtilis* WL-3, *Corynebacterium lactofermentum*, expression, mannanase

*Corynebacterium glutamicum*과 함께 아미노산 생산균으로 사용되는 *C. lactofermentum*은 주로 포도당, 과당, 자당, 엿당등과 같은 단당류와 이당류를 탄소원으로 이용하며, 고분자 탄수화물의 분해능을 지니고 있지 않다. 이들 균주의 아미노산 생산성을 높이기 위해 대사과정이 조절된 유전자 재조합 균주가 다수 개발되었으나 바이오매스 자원을 탄소원으로 사용하고자 하는 시도는 매우 적은 형편이다. 최근 들어 전분을 탄소원으로 사용하고자 *Bacillus amyloliquefaciens*[8], *Geobacillus stearothermophilus*[11], *Streptococcus bovis*[9, 10]와 *Streptomyces griseus*[7] 유래의  $\alpha$ -amylase 유전자들을 *C. glutamicum*과 *C. lactofermentum*에서 발현시켰으며, 생전분을 탄소원으로 하여 lysine을 생산한 예가 보고 되었다. Smith 등은 원형질 융합을 통해 xylan의 분해효소인 xylanase를 생산하는 *B. subtilis*와 lysine 생산균인 *C. acetacidophilum*간의 융합균주를 제조하고 이들이 xylanase와 lysine을 동시에 생산하는 것을 확인하였다[3]. 또한 phytase 유전자가 도입된 재조합 *C. glutamicum* 균주는 phytate를 인 공급원으로 직접 이용하는 것으로 알려졌다[5].

Mannan 다당류는 xylan과 함께 목재의 hemicellulose를 이루는 주요 구성물질이며, 구성하는 당 사이에  $\beta$ -1,4 결합이 직쇄결격을 이루는데 당 성분에 따라 순수 mannan,

glucomannan, galactomannan과 galactoglucomannan으로 구분된다. Endo-1,4- $\beta$ -mannanase (mannanase)는 mannan 다당류의  $\beta$ -D-1,4-mannosyl 결합을 가수분해하는 효소로 mannan의 효소적 분해에 가장 중요한 역할을 한다. 이러한 mannanase는 바이오매스 자원의 효소적 분해, 사료첨가용 효소, 펄프가공효소, 세정효소 등으로 활용가치가 있어 이에 대한 관심이 높아지고 있다. 본 연구에서는 *C. lactofermentum*의 헤미셀룰로즈 바이오매스 이용성 향상과 mannanase 생산균으로 개발 가능성을 조사하기 위한 일환으로 mannanase 유전자를 도입하고 그 발현여부를 조사하였다.

### Mannanase 유전자의 도입

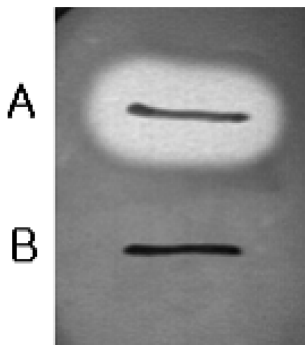
된장에서 분리된 *B. subtilis* WL-3의 mannanase는 그 유전자가 크로닝되고 염기서열이 결정된 바 있으며[12], 재조합 대장균에서 정제되어 그 특성이 조사되었다[13]. 이러한 mannanase 유전자를 *C. lactofermentum*에 도입하기 위해서 우선적으로 mannanase 유전자와 주변지역을 충분한 크기로 함유하며 *Pst*I로 절단된 WL-3의 유전체 단편 (7.0 kb)을 *C. lactofermentum*의 내재형 플라스미드 pBL1과 suicide vector이며 kanamycin 내성유전자를 함유한 pEM1로 제조된 pHE83[4]의 *Pst*I 위치에 삽입하여 재조합 플라스미드 pHE83M을 제조하였다. 재조합 플라스미드 pHE83M을 electroporation 방법으로, *C. lactofermentum*에 형질전환 하였는데 이때 pHE83M의 안정성을 유지하기 위해 pBL1의 제거된 *C. lactofermentum* RF1이 숙주균으로 사용되었다[4].

\*Corresponding author

Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676

E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

형질전환주가 mannanase 활성을 보이는지 확인하기 위해 pHE83과 pHE83M를 각각 함유한 *C. lactofermentum*을 kanamycin(50 µg/mL)과 0.3% locust bean gum(LBG)이 첨가된 LB 평판배지에 접종하고 약 24시간 배양한 후 congo red (0.2%)로 염색하여 관찰한 결과 mannanase 유전자가 도입되지 않은 pHE83의 형질전환주의 주변에는 분해환이 형성되지 않았으나 mannanase 유전자가 도입된 pHE83M의 형질전환주의 주변에는 LBG의 분해환이 형성되었다. 이로 보아 *B. subtilis* WL-3 mannanase 유전자는 *C. lactofermentum*에서 자신의 promoter를 사용하여 발현되며 생산된 mannanase가 활성을 갖는 형태로 존재함을 알 수 있는데, 이러한 결과는 mannanase 유전자가 *C. lactofermentum*에서 발현된 처음 예이다. 또한 *C. lactofermentum* 형질전환주로부터 플라스미드를 분리하여 제한효소로 절단하고 전기영동으로 분석한 결과 도입된 재조합 플라스미드는 구조적 변화가 없는 것으로 확인되었다(결과 미제시).



**Fig. 1.** Locust bean gum degradation of *C. lactofermentum* transformed with pHE83M carrying a mannanase gene (A), and with vector pHE83 only (B) on LB agar plate containing 0.3% locust bean gum and kanamycin. After incubation at 30°C for 24 h, the plate was stained with congo red solution.

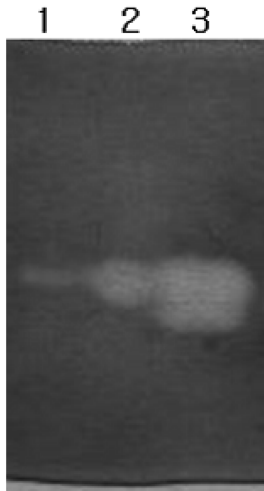
*C. lactofermentum* 형질전환주로부터 생산된 mannanase가 균체외로 분비 되는가를 조사하기 위해 LB 액체 배지에 형질전환주를 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양하고 배양상등액과 균체를 분리하였다. 분리된 균체는 lysozyme을 처리하고 초음파로 파쇄한 후 원심분리하여 균체파쇄상등액을 회수하였다. 이렇게 제조된 배양상등액과 균체파쇄상등액을 효소액으로 사용하여 mannanase 활성을 조사하기 위해 LBG를 기질로 하고 pH 6.0, 50°C 조건에서 반응을 실시하였다. 배양액 부피기준으로 배양상등액과 균체파쇄상등액에서 mannanase 활성이 각각 4.3 U/mL와 0.7 U/mL로 나타났으며, 이로 보아 *C. lactofermentum*에서 생산된 mannanase는 자체의 signal peptide가 작용하여 대부분 균체외로 분비되지만 균체내에도 14% 정도 존재함을 알 수 있다. *C. glutamicum*에서 단백질의 분비생산력은 signal peptides에 의해 크게 영향을 받는다. Watanabe 등은 *C.*

*glutamicum* R의 총염색체 정보에 근거하여 유추한 405개의 signal peptides를 사용하여 *G. stearothermophilus* 유래 mature  $\alpha$ -amylase의 분비생산능이 *C. glutamicum*에서 잘 알려진 분비단백질 PS2보다 약 50-150배 정도 증가시킨 signal peptides를 보고한 바 있다[11].

### *C. lactofermentum* 형질전환주로부터 mannanase 생산

재조합 *B. subtilis* 168 균주에서 생산된 WL-3의 mannanase는 SDS-PAGE 후 활성염색을 하였을 때 단일한 활성 band만이 관찰된 바 있으며[12], 그 크기가 38 kDa로 보고되었다[13]. *C. lactofermentum*에서 생산된 mannanase의 물리적 변화여부를 확인하기 위해 배양상등액과 균체파쇄상등액을 각각 SDS-PAGE한 후 polyacrylamide gel을 renaturation 완충용액(25% propanol, 50 mM sodium citrate(pH 6.0))으로 15분씩 3회 세척하여 SDS를 제거하였다. 이를 다시 50 mM sodium citrate(pH 6.0)로 15분씩 3회 세척한 후 polyacrylamide gel 위에 mannanase의 기질로 LBG(0.3%)와 효소 반응 완충용액 50 mM sodium citrate(pH 6.0)를 함유한 agarose gel을 중층하여 50°C에서 2시간 반응하였다[6]. 반응이 끝난 후 중층한 agarose gel을 congo red 용액에 담구어 15분 염색한 후 1 M NaCl 용액으로 탈색하여 mannanase 활성 염색을 수행하였다. 그 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 배양상등액과 균체파쇄상등액에서 전기영동상 동일한 위치에 mannanase 활성을 보이는 단일한 band가 관찰되었다. 한편 *B. subtilis* WL-3에서 생산된 mannanase가 과량으로 존재하여 활성 band가 넓게 퍼져 있지만 이와 *C. lactofermentum*에서 생산된 mannanase는 동일한 위치로 보여지므로 *C. lactofermentum*에서 생산된 mannanase는 분해되거나 변형되지 않고 WL-3에서 생산된 효소와 동일한 분자량을 유지하는 것으로 판단된다. 따라서 *C. lactofermentum*에서 생산된 효소도 아미노 말단의 24개 아미노산 잔기로 구성된 signal peptide가 제거된 것으로 추정된다. 그러나 WL-3의 mannanase가 한 개의 활성영역만을 함유하고 cellulose binding domain과 같이 부가적 기능의 영역을 지니고 있지 않은 단백질이므로 형질전환주에서 생산된 mannanase가 파괴되었을 경우 대부분이 활성을 상실하여 활성 단백질 band가 단일하게 관찰되었을 가능성도 있다. 실제, 여러 기능영역으로 구성된 효소는 SDS-PAGE 상에서 활성염색시 여러위치에서 활성 bands가 관찰되는 것으로 보고된 사례가 많다[2].

*C. lactofermentum* 형질전환주의 효소 생산성을 조사하기 위해 LB 배지에서 3일간 진탕배양하면서 배양상등액의 mannanase 활성을 조사한 결과 배양 3일째 8.1 U/mL로 최대활성을 나타내었다. 이러한 수준의 생산성은 LB 배지에서 *B. subtilis* WL-3의 mannanase 생산성(0.5 U/mL) 보다는



**Fig. 2. Activity staining of mannanase produced by recombinant *C. lactofermentum*.** *C. lactofermentum* carrying pHE83M was grown for 24 h at 30°C in LB medium. The cell-free extract (lane 1) and culture filtrate (lane 2) were applied to 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel, respectively. Protein exhibiting mannanase activity was analyzed by activity staining. The culture filtrate of *B. subtilis* WL-3 (lane 3) was used as a control.

높았지만[6], 재조합 *B. subtilis* 168의 생산성(300 U/mL) 보다는 낮았다[12]. 실제 재조합 *B. subtilis* 168의 생산성이 높은 것은 mannanase 유전자에 강력한 promoter를 도입하여 발현시킨 때문으로 *C. lactofermentum*에서도 강력한 promoter와 함께 분비효율을 향상시키기 위한 signal peptide를 사용할 경우 재조합 균주의 mannanase 생산성을 증가시킬 수 있을 것이다[1, 10, 11]. 또한 *C. lactofermentum*의 경우 *B. subtilis* 보다 고농도로 균체 배양이 가능하므로 재조합 균주의 mannanase 생산성을 극대화하는데 장점이 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부와 농림수산식품기술기획평가원의 농림개발사업의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Adham, S. A., S. Rodriguez, A. Ramos, R. I. Santamara, and J. A. Gil. 2003. Improved vectors for transcriptional/translational signal screening in corynebacteria using the *melC* operon from *Streptomyces glaucescens* as reporter. *Arch. Microbiol.* **180**: 53-59.
- Bischoff, K. M., S. Liu, and S. R. Hughes. 2007. Cloning and characterization of a recombinant family 5 endoglucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361. *Proc. Biochem.* **42**: 1150-1154.
- Deb, J. K., S. Malik, V. K. Ghosh, S. Mathai, and R. Sethi. 1990. Intergeneric protoplast fusion between xylanase producing *Bacillus subtilis* LYT and *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 21476. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 287-292.
- Lee, K. -N., B. -H. Min, and K. -H. Yoon. 1995. Construction and transformation of an endogenous plasmid pBL1-free *Brevibacterium lactofermentum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 164-169.
- Mladen, V., Tzvetkov, M. V. and W. Liebl 2008. Phytate utilization by genetically engineered lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **134**: 211-217.
- Oh, Y. P., J. M. Lee, K. H. Cho, and K. H. Yoon. 2002. Isolation and enzyme production of a mannanase-producing strain, *Bacillus* sp. WL-3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 247-252.
- Seibold, G., M. Auchter, S. Berens, J. Kalinowski, and B. J. Eikmanns. 2006. Utilization of soluble starch by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain: growth and lysine production. *J. Biotechnol.* **124**: 381-391.
- Smith, M. D., J. L. Flickinger, D. W. Lineberger, and B. Schmidt. 1986. Protoplast transformation in coryneform bacteria and introduction of an  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* into *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 634-639.
- Tateno, T., H. Fukuda, and A. Kondo. 2007. Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying  $\alpha$ -amylase on its cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1213-1220.
- Tateno, T., H. Fukuda, and A. Kondo. 2007. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis*  $\alpha$ -amylase using *cspB* promoter and signal sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 533-541.
- Watanabe, K., Y. Tsuchida, N. Okibe, H. Teramoto, N. Suzuki, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences. *Microbiol.* **155**: 741-750.
- Yoon, K. -H. and B. -L. Lim. 2007. Cloning and strong expression of a *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase gene in *B. subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1688-1694.
- Yoon, K. -H., S. Chung, and B. -L. Lim. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* W-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **46**: 344-349.

(Received Aug. 28, 2009/Accepted Dec. 7, 2009)