

# *Bacillus cereus*에서 유래한 Lactate Dehydrogenase 동질효소 유전자의 대장균 내 발현 및 효소특성 규명

장명운 · 박정미 · 이흥균 · 이소라 · 김태집\*  
충북대학교 식품공학과

## Enzymatic Characterization of *Bacillus cereus* Lactate Dehydrogenase Isozymes Expressed in *Escherichia coli*

Myoung-Uoon Jang, Jung-Mi Park, Hong-Gyun Lee, So-Ra Lee, and Tae-Jip Kim\*

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

(Received May 20, 2010/Accepted June 14, 2010)

Lactate dehydrogenases (LDHs) have been highly focused for long time, due to their important roles in biochemical and metabolic pathways of cells. On the basis of genome-wide searching results, three putative LDH genes from *Bacillus cereus* ATCC 14579 genome have been PCR-amplified, cloned, and well-expressed in *E. coli*. All three *BcLDH* isozymes are supposed to share highly conserved catalytic amino acid residues in common NAD<sup>+</sup>-dependent LDHs. Meanwhile, *BcLDH1* consisting of 314 amino acids shares 86 and 49% of identities with *BcLDH2* and 3, respectively. Interestingly, only *BcLDH1* showed the converting activities between L-lactate and pyruvate in the presence of NAD<sup>+</sup> coenzyme, while the other isozymes are likely to have almost no activity. As a result, it was revealed that *BcLDH1* can be a typical NAD<sup>+</sup>-dependent L-lactate-specific dehydrogenase.

**Keywords:** *B. cereus*, expression, gene cloning, L-lactate dehydrogenase (L-LDH), NAD<sup>+</sup>-dependent activity

Lactic acid (lactate 또는 2-hydroxypropionic acid)는 주로 L(+)-이성질체 형태로 자연계에 존재하는 저분자 화합물로서 유산균 발효에 의해 대량으로 생산될 수 있으며, 식품, 화장품, 의약품 등의 산업분야에 폭넓게 이용된다(7, 22). 특히 최근 환경문제에 대한 세계적 관심이 고조됨에 따라 자연친화적 생분해성 고분자 중합체인 poly lactic acid (PLA)의 산업적 생산 및 활용방안에 대해 다양한 연구가 진행되고 있다(25, 27).

생체 내에서 이러한 lactic acid의 생합성은 lactate dehydrogenase (LDH)에 의해 수행되며, 이들 효소는 혐기적 조건에서 NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H와 같은 조효소의 존재 하에 해당과정 (glycolysis)에 의해 생성된 pyruvate를 lactate로 전환하는 반응 또는 그 역반응을 촉매한다(4, 10). LDH 효소는 입체이성질체인 각 기질에 대한 특이성에 따라 L-lactate를 기질로 이용하는 L-LDH (EC 1.1.1.27) (2, 9, 15, 19)와 D-lactate에 특이적인 D-LDH (EC 1.1.1.28) (3, 19, 26)로 나뉜다. 또한 NAD<sup>+</sup>/NADH 등의 조효소에 의존하지 않는 L-iLDH (EC 1.1.2.3) (8, 20, 28) 및 D-iLDH (EC 1.1.2.4) (13, 29) 효소가 발견된 바 있다. 이 외에도 fructose-1,6-bisphosphate (FBP)에 의해 활

성화되는 allosteric LDH (16, 23)와 조효소의 영향을 받지 않는 non-allosteric LDH (9, 15) 등의 효소가 보고되었다.

이러한 LDH는 세포 내 탄수화물 대사경로에서 매우 중요한 효소이며, 오랜 기간 동안 이들 효소의 기질 특이성, 조효소의 존성 및 조절작용 등에 대한 연구가 진행되었지만(10), 분자생물학 또는 효소공학적인 연구결과는 아직 많지 않다. 특히 최근에 말라리아 등의 질병을 유발하는 각종 병원균 및 기생충 유래의 LDH (4, 14)에 대한 의학적 연구가 진행되어 새로이 주목을 받고 있다. 또한 산업적인 응용을 위해 대사공학적으로 유산균 내의 D-LDH 유전자를 제거하여 발효 중 D-lactate의 생산을 최소화하거나(18), 전분 분해능을 가지는 *Lactobacillus* 균주의 L-LDH 발현을 억제하여 전분으로부터 직접 순수한 D-lactate만을 생산하는 연구 등이 진행되었다(21). 본 연구에 사용된 *Bacillus cereus*는 토양, 물 등 자연계에서 흔히 발견되는 그람양성 세균으로 포자를 형성하며, 유제품, 조리제품, 해산물, 채소, 식육 등 다양한 식품에 오염될 확률이 높다(1). 또한 식중독을 유발하는 독소를 생성하여 위장 질병을 일으키고, 식품의 변질을 초래하여 식품위생적 측면에서 중요한 세균으로 알려져 있다(11).

따라서 본 연구에서는 생물학적인 중요성이 매우 높으면서

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

도 체계적인 유전적, 효소적 연구가 부족하였던 LDH 유전자의 특성을 규명하고자, *B. cereus* ATCC 14579 균주의 genome으로부터 3종의 LDH 추정 유전자를 클로닝하여 대장균에서 대량으로 발현하고, 다른 미생물 유래 LDH와의 비교를 통해 유전자 구조, 서열 상동성 및 효소특성 등의 유용한 정보를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 일반 시약과 효소반응 기질 및 미생물 배지는 각각 Sigma-Aldrich (USA)와 Duchefa Biochemie (Netherlands)로부터 구입하여 사용하였다. 유전자 조작을 위한 T4 DNA ligase 및 각종 제한효소들은 TaKaRa Biomedical (Japan)에서 구입하였으며, 각종 PCR 및 sequencing primer는 Bioneer (Korea)로부터 합성하였다. 또한 agarose와 GENECLAN turbo nucleic acid purification kit는 Qiogene (USA)에서, 단백질 정제에 사용한 Ni-NTA affinity column은 QIAGEN (Germany)에서 구입하여 사용하였다. *Bc*LDH 유전자의 PCR 클로닝에 주형으로 사용한 *B. cereus* 염색체 DNA (ATCC 14579D)는 한국생명공학연구원의 미생물프론티어 사업단으로부터 제공받았다.

### LDH 유전자의 증폭 및 클로닝

*B. cereus*의 염색체 DNA를 주형으로 사용하여 각 LDH 동질효소의 유전자를 선택적으로 증폭하였다. *Bc*LDH1 유전자의 증폭을 위해 *Bc*LDH1N (5'-TGGATCCATGAAAAAGGTATTAACCGTG-3')과 *Bc*LDH1C (5'-TAAGCTTAAGAACCGGAGCCATTGTTTC-3') primer set을 사용하였고, *Bc*LDH2 유전자의 경우에는 *Bc*LDH2N (5'-TGGATCCATGAAAAAGGTATCAATCGTG-3')과 *Bc*LDH2C (5'-TAAGCTTTAGTACTGGTGCCATTGTTTC-3') primer로 증폭하였으며, *Bc*LDH3 유전자는 *Bc*LDH3N (5'-TGAATTCATGAAAAGACATACAAGAAAAATTG-3')과 *Bc*LDH3C (5'-TAAGCTTGTAAACCAATTGTTTTATATAATC-3')를 사용하였다. PCR 증폭은 *Taq* DNA polymerase (Roche Applied Science, Germany)와 P<sub>x</sub>2 thermal cycler (Thermo-Hyaid, UK)를 사용하여 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초로 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 추가로 증폭한 후 종료하였다. 증폭된 각 LDH 유전자는 pMD18-T Easy (TaKaRa Biomedical) 벡터에 클로닝 한 후, 서울대학교 유전체지원센터의 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)로 염기서열의 변이 여부를 검증하였다.

### 효소의 발현 및 정제

*Bc*LDH1과 *Bc*LDH2 유전자는 *Bam*HI과 *Hind*III 제한효소로 각각 처리하고, pET-21a (Novagen, Germany)에 삽입하여 최종 발현벡터인 pET*Bc*LDH1과 pET*Bc*LDH2를 얻었으며, pET*Bc*LDH3의 제조를 위해서는 *Eco*RI과 *Hind*III 제한효소를

이용하였다. 각각의 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)로 형질전환한 후, LBA (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 µg/ml ampicillin) 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 파장 600 nm에서의 흡광도가 0.4-0.6에 도달한 후, 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 LDH 효소의 발현을 유도(induction)하였으며, 이후 16시간이 될 때까지 배양하였다. 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 현탁하여 sonicator (VCX750, Sonics & Materials, USA)로 파쇄하였다. 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)로 세척하고, 최종적으로 elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 7.0)로 회수하였으며, 농축 및 투석하여 이후의 실험에 사용하였다.

### 단백질 정량 및 분자량 측정

정제된 *Bc*LDH 동질효소의 분자량을 SDS-PAGE를 이용하여 측정하였다. 전기영동에는 12% separating gel과 Mini-protean II kit (Bio-Rad, USA)를 사용하였으며, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후, 다시 destaining solution (20% methanol, 10% acetic acid)을 처리하여 단백질 band를 확인하였다. 분자량 비교를 위해 High range protein molecular weight markers (Bio-Rad)를 표준물질로 사용하였으며, 효소 단백질의 농도는 BCA™ protein assay kit (Pierce Biotechnology, USA)를 이용하여 측정하였다.

### LDH 효소의 활성 측정

각 *Bc*LDH의 효소활성을 측정하기 위해 100 mM의 L-lactate 기질, 5 mM NAD<sup>+</sup> 조효소를 함유한 100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)에 적당량의 정제된 효소를 첨가하여 최종 300 µl로 반응하였다. 25°C에서 10분 동안 효소반응을 진행하면서 PowerWave™ microplate spectrophotometer (BIOTEK, USA)를 이용하여 1분 간격으로 반응액의 흡광도(340 nm) 변화를 연속적으로 측정하였다. LDH 효소의 lactate 산화활성을 나타내기 위해, 1 unit는 1분당 1 µmol의 NAD<sup>+</sup>를 NADH로 전환하는 효소의 양으로 정의하였다. 각 LDH 효소의 입체이성질체 기질에 대한 특이성 및 조효소 의존성을 확인하기 위해 각각 100 mM의 D-lactate 또는 L-lactate 기질 및 5 mM의 NAD<sup>+</sup> 또는 NADP<sup>+</sup>의 서로 다른 조효소를 첨가한 후, 각 조합의 반응 중 효소활성 변화를 연속적으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### LDH 유전자의 클로닝 및 1차 구조 분석

GenBank를 포함한 National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 genome database에 대한 검색을 통해 자연계에 존재하는 다양한 미생

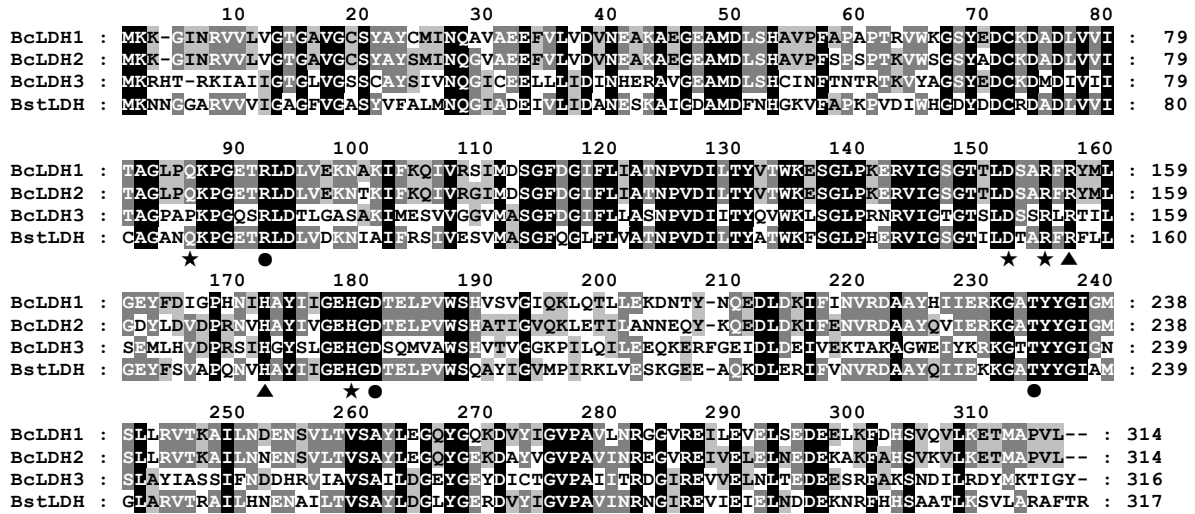


Fig. 1. Amino acid sequence alignment among LDHs from *B. cereus* (BcLDH1, 2, and 3) and *B. stearothermophilus* (BstLDH). Identical residues among all LDHs were shown in black boxes. (★) catalytic amino acid residues; (●) residues involving substrate recognition; (▲) residues for allosteric regulation (5, 6).

물 유래 LDH 유전자의 분포를 확인하였다. *Bacillus stearothermophilus* LDH (BstLDH) 유전자(GenBank accession no. M14788)의 서열을 이용한 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 상동성 검색 결과, *B. cereus* ATCC 14579의 genome으로부터 LDH로 추정되는 3종의 유전자를 발견하였으며, 편의상 각 유전자를 *bclhd1* (GenBank no. AAP08895), *bclhd2* (AAP11769)와 *bclhd3* (AAP11868)로 구별하였다.

*B. cereus* genomic DNA (ATCC 14579D) 주형과 각 유전자에 특이적인 PCR primer 조합을 사용하여 LDH 유전자를 증폭하였다. PCR 단편을 pMD-18T 벡터에 각각 삽입하고 pMDBcLDH1, pMDBcLDH2, pMDBcLDH3로 명명하였으며, M13 forward 및 reverse sequencing primer를 사용하여 BcLDH 추정 유전자들의 염기서열을 확인한 결과, 증폭된 유전자들의 염기서열은 database에서 발견된 서열과 정확히 일치함을 확인하였다.

각각의 BcLDH 유전자로부터 유추한 아미노산 서열의 상동성 비교 결과(Table 1), BcLDH1과 2의 상동성은 86.0%로 매우 높은 편이나, BcLDH3와의 상동성은 49.1%와 50.6%로 비

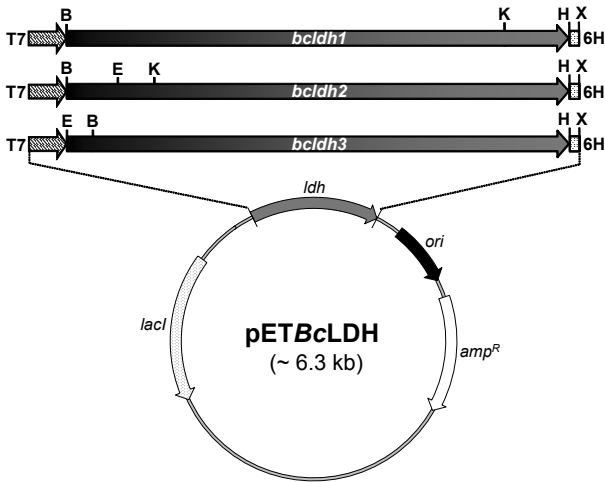
교적 낮았다. 또한 다른 *Bacillus* 속 유래 LDH와 비교하였을 경우, *B. halodurans* LDH (17)와는 46.7-59.5%, *B. stearothermophilus* LDH (2)와는 42.8-62.1%, *B. subtilis* LDH (12)와는 45.8-62.8%, *B. psychrosaccharolyticus* LDH (24)와는 45.1-65.1%의 아미노산 서열 상동성을 보였다. 이 경우에서도 역시 BcLDH1과 2는 60% 내외의 비교적 높은 상동성을 보였으나, BcLDH3은 40% 정도로 낮았다. 그 외에도 *Pediococcus acidilactici* (9)와는 40.5-52.0%, *Streptococcus thermophilus* (15)와는 43.0-51.7%의 상동성을 나타냈으며, 이를 고려할 때, 본 연구에서 클로닝한 유전자들이 LDH 관련 효소의 유전자일 것으로 추측하였다.

BcLDH 추정 유전자들의 1차 구조를 분석하기 위하여, 이미 입체구조가 알려진 BstLDH의 구조와 상호 비교하였다(Fig. 1). 기존 연구(5, 6, 23)를 통해 제안된 활성 부위와 기질결합 부위 등을 포함하는 LDH의 상동부위 아미노산 잔기들이 대부분 BcLDH 추정 유전자 상에서도 동일한 위치에 존재함을 확인하였다. 특히 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Gln85 (BcLDH3의 경우 Pro85에 해당), Asp151, Arg154, His178

Table 1. Amino acid sequence identities among LDHs originated from *Bacillus* species

LDH <sup>a</sup>	Amino acid sequence identity (%)					
	BcLDH2	BcLDH3	BhLDH	BstLDH	BsuLDH	BpLDH
BcLDH1	86.0	49.1	57.0	61.5	62.8	64.8
BcLDH2		50.6	59.5	62.1	61.9	65.1
BcLDH3			46.7	42.8	45.8	45.1
BhLDH				61.5	50.7	60.4
BstLDH					65.1	69.8
BsuLDH						72.9

<sup>a</sup> The abbreviations of various microbial LDHs: BcLDH1-3, LDH isozymes from *B. cereus* (this study); BhLDH, from *B. halodurans* C-125 (17); BsuLDH, from *B. subtilis* (GenBank accession of P13714) (12); BstLDH, from *B. stearothermophilus* (M14788) (2); BpLDH, from *B. psychrosaccharolyticus* (X55118) (24).



**Fig. 2.** Plasmid map of the expression vector derivatives constructed for the overexpression of *BcLDH* isozymes in *E. coli*. Gene abbreviations are as follow; *amp<sup>R</sup>*, ampicillin-resistant gene; *lacI*, lac repressor gene; *ori*, replication origin; T7, T7 RNA polymerase promoter; 6H, 6-histidines tag. Restriction endonucleases are simply shown; *Bam*HI(B), *Eco*RI(E), *Hind*III(H), *Kpn*I(K), and *Xho*I(X).

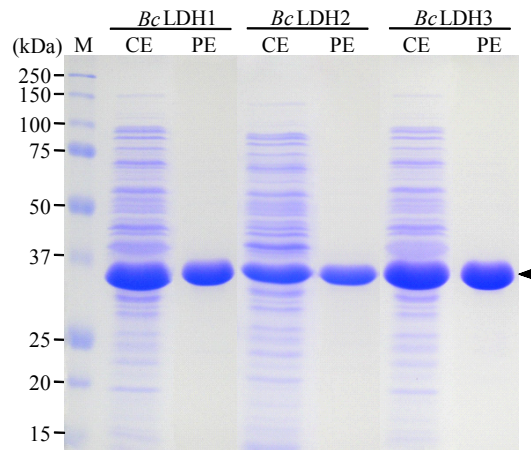
잔기 외에도, 기질결합에 관여하는 Arg91, Asp180, Thr232 잔기 또한 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. 한편 fructose-1,6-bisphosphate (FBP)와 결합하여 allosteric 조절작용에 영향을 미치는 Arg156과 His171 잔기(5, 6) 또한 이들 유전자에서 동일하게 발견되었다. 따라서 본 연구에서 클로닝한 3종의 *BcLDH* 유전자들은 모두 LDH계열의 효소 유전자일 것으로 예상할 수 있었다.

**LDH 효소의 대장균 내 발현 및 정제**

대장균에서 대량 발현하기 위하여 *B. cereus*에서 유래한 3종의 LDH 추정 유전자들을 각각 발현벡터로 클로닝하였다. 우선, pMDBcLDH1과 2의 경우, 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단하고 pET-21a 발현벡터에 삽입하여 재조합 플라스미드인 pETBcLDH1과 pETBcLDH2를 얻었으며, pETBcLDH3의 제조에는 *Eco*RI과 *Hind*III 제한효소를 사용하였다(Fig. 2). 이들 LDH 유전자는 IPTG의 첨가로 T7 RNA polymerase promoter에 의해 유도 발현되며, 효율적인 효소 정제를 위하여 6개의 연속적인 histidine 아미노산 잔기가 C-말단에 결합된 형태로 발현되도록 고안하였다. 각 플라스미드를 *E. coli* BL21 (DE3)으로 형질전환하여 재조합 대장균을 얻은 후, 다시 LBA 액체배지에서 배양하여 효소를 생산하였으며, 조효소액을 Ni-NTA column에 통과시켜 최종적으로 정제된 *BcLDH* 동질효소들을 얻었다. 결과적으로 예상한 분자량과 일치하는 재조합 *BcLDH*1 (34.8 kDa), *BcLDH*2 (34.6 kDa) 및 *BcLDH*3 (34.7 kDa) 효소가 대장균 내에서 성공적으로 대량 발현되었으며, 높은 순도와 효율로 신속하게 정제됨을 확인하였다(Fig. 3).

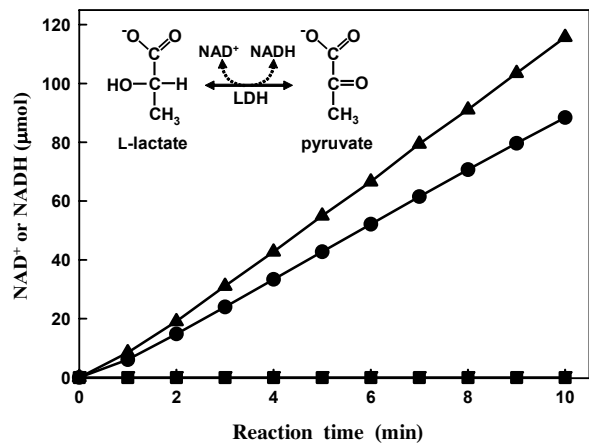
**LDH 효소의 특성 규명**

정제된 재조합 *BcLDH* 동질효소의 활성을 확인하기 위해 100 mM의 L-lactate를 기질로 포함한 100 mM Tris-HCl (pH

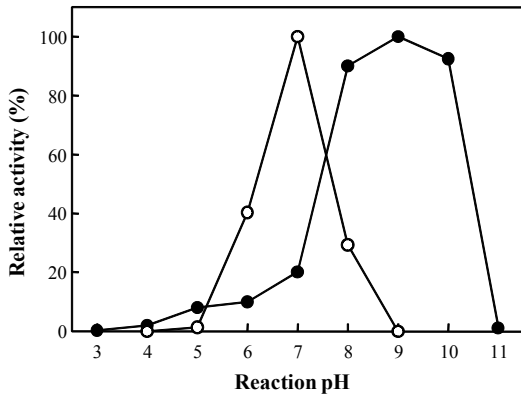


**Fig. 3.** Purification of *BcLDH* isozymes expressed from *E. coli* BL21 (DE3) harboring pETBcLDHs using Ni-NTA column chromatography. M, protein molecular weight markers (Bio-Rad); CE, cell extract of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pETBcLDH; PE, Purified *BcLDH* isozyme. Arrow head indicates *BcLDH*s with an approximate molecular mass of 35 kDa.

9.0) 완충용액에서 효소반응을 실시하였다. 일반적으로 LDH 효소가 lactate를 pyruvate로 전환하는 과정에서 조효소인 NAD<sup>+</sup>가 NADH로 환원됨에 따라 340 nm에서의 흡광도 값이 증가하므로, 본 연구에서는 시간의 경과에 따른 효소 반응액의 흡광도 증가 정도를 측정하여 효소의 활성을 측정하였다. *BcLDH*1의 경우, L-lactate 기질과 함께 5 mM의 NAD<sup>+</sup>를 조효소로 사용한 반응에서 pyruvate로의 전환을 촉매하는 활성을 나타내었으며(Fig. 4), pyruvate와 NADH를 각각 기질 및 조효소로 사용한 역반응의 경우에도 역시 효소활성을 확인할 수 있었다. 그러나 D-lactate를 기질로 반응시킨 경우에는 조효소의 존재 여부에 상관 없이 효소활성이 검출되지 않았다. 또한 NADP<sup>+</sup> 또는 NADPH를 조효소로 사용한 경우에도 효소활성



**Fig. 4.** Time-course evaluation of *BcLDH*1 activities against stereoisomeric substrates. Enzyme activity of 6xHis-tagged *BcLDH*1 was measured under the reaction conditions of 100 mM L-lactate (●), D-lactate (■), or pyruvate (▲) with 5 mM NAD<sup>+</sup> or NADH as coenzymes.



**Fig. 5.** Effect of reaction pH on the enzyme activity of *BcLDH1*. The activities in oxidation of L-lactate (●) and reduction of pyruvate (○) were separately determined at various ranges of pH.

을 확인할 수 없었다. 이상의 결과로부터 *BcLDH1* 효소는 L-lactate에 특이적으로 작용하는 전형적인  $NAD^+$ -의존형 L-LDH 형태의 효소인 것으로 판단하였다. 특히 대부분의 LDH는 pH의 변화에 따른 효소활성의 차이가 비교적 큰 것으로 알려져 있으며(10), Huang 등(14)은 lactate에서 pyruvate로의 전환반응과 그 역반응의 최적 pH 조건이 상이한 것으로 보고한 바 있다. 따라서 서로 다른 pH 조건에서 *BcLDH1*의 효소활성을 비교한 결과, L-lactate 산화반응의 경우 pH 9.0에서 가장 높은 효소활성을 보인 반면, pyruvate 환원반응의 경우에는 pH 7.0이 최적인 것으로 나타났다(Fig. 5). *B. subtilis* 유래의 L-LDH (10)에 대한 연구결과에 의하면, lactate 산화반응은 pH 7.2에서 최적이었고, pyruvate 환원반응의 경우 pH 6.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 유산균인 *Lactobacillus acidophilus* L-LDH가 촉매하는 lactate 산화반응의 최적 pH는 약 7.8로 보고되었으나, 일반적인 미생물 유래 L-LDH 산화반응의 최적 pH는 약 7.2-8.5인 것으로 보고되었다(10). *BcLDH1*은 특이하게 9.0의 상대적으로 높은 알칼리 pH 조건에서 최대의 lactate 산화활성을 나타내는 것을 알 수 있었으며, D-lactate를 기질로 한 경우에는 모든 pH 영역에서 활성이 검출되지 않았다. 결론적으로  $NAD^+$ -의존형 L-LDH인 *BcLDH1*의 L-lactate 산화반응 및 pyruvate 환원반응의 비활성값(specific activity; 1분간 1

mg의 효소에 의해 전환된 lactate 또는 pyruvate의  $\mu\text{mole}$ 로 정의)은 각각 1.86 및 2.46 unit/mg로 측정되어, 최근 보고된 *B. halodurans* (17) 유래 L-LDH의 효소활성(0.3 U/mg)과 비교하여 상대적으로 높은 lactate 산화활성을 가짐을 확인하였다.

이러한 결과는 *BcLDH1*이 대표적인  $NAD^+$ -의존형 L-LDH인 *BstLDH*와 60% 이상의 아미노산 서열 상동성을 보일 뿐만 아니라, 주요 활성 잔기 및 기질결합 잔기를 공유한다는 1차 구조의 분석 결과와도 일치한다. 또한 서로 다른 작용 기작에 의해 구별되는 다양한 LDH 효소의 종류 및 상동성을 서로 비교한 Table 2의 자료에 의하면, *BcLDH1*은  $NAD^+$ -의존형 D-LDH 효소군과 약 11% 내외의 매우 낮은 상동성을 나타내는 반면 L-LDH 계열의 효소들과는 50% 이상의 상대적으로 높은 상동성을 보여 효소활성 비교 결과와 일치함을 알 수 있다.

한편, *BcLDH1*과 달리 다른 동질효소 *BcLDH2*와 *BcLDH3*의 경우는 모든 조건의 효소반응에서 활성이 검출되지 않았다. *BcLDH3*의 경우 *BcLDH1*과의 아미노산 상동성이 50% 미만일 뿐 아니라, 효소활성에 중요한 역할을 하는 *BcLDH1*의 85번째 glutamine 잔기가 proline으로 치환되어 활성을 나타내지 못하는 것으로 추정하였다. 그러나, *BcLDH1*과 86%에 달하는 높은 서열 상동성을 가지며, 주요 활성 부위의 아미노산 잔기를 대부분 공유하는 *BcLDH2*에서 LDH 활성이 전혀 검출되지 않은 것은 의외의 결과이다. 따라서 향후 이들 효소의 아미노산 서열에 대한 보다 체계적인 비교 및 단백질공학 기술을 이용한 아미노산 잔기의 상호 치환을 통해 *BcLDH2*의 효소활성을 증가시키는 등의 다양한 연구가 가능할 것이며, 최종적으로 L-LDH 효소의 구조와 기능의 상관관계를 규명하는 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

### 적요

Lactate dehydrogenases (LDHs)는 세포 내의 생화학적 대사경로에서 중요한 역할을 담당하는 효소로서 오랜 동안 많은 관심을 받았다. 본 연구에서는 다양한 미생물 genome database의 탐색을 통해 *Bacillus cereus* ATCC 14579 genome으로부터 LDH로 추정되는 3종의 유전자를 발견하고, 대장균에서 클로닝 및 대량 발현하였다. 모든 *BcLDH* 동질효소들의 상동부

**Table 2.** Classification of various types of LDHs found from microbes in nature

Coenzyme	Substrate	Microbial source	Amino acid identity (%)	Reference
$NAD^+$ -dependent LDH	L-(+) lactate	<i>Bacillus cereus</i>	100.0	This study
		<i>Bacillus stearothermophilus</i>	61.5	2
		<i>Pediococcus acidilactici</i>	50.5	9
		<i>Streptococcus thermophilus</i>	48.9	15
	D-(-) lactate	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	11.7	3
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	10.4	26
$NAD^+$ -independent LDH	L-(+) lactate	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NR <sup>a</sup>	8
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NR	20
		<i>Staphylococcus aureus</i>	NR	28
	D-(-) lactate	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	NR	13
<i>Paracoccus denitrificans</i>		NR	29	

<sup>a</sup> NR, not reported

위 아미노산 잔기 대부분이 기존의  $\text{NAD}^+$ -의존형 LDH와 높은 상동성을 보였다. 한편 314개의 아미노산으로 이루어진 BcLDH1과 2는 86%의 서열 상동성을 보였으나, BcLDH3와는 49%의 상동성을 나타냈다. 흥미롭게도 BcLDH1만이  $\text{NAD}^+$  조효소 존재 하에서 L-lactate와 pyruvate 간의 상호전환 활성을 나타냈으며, 그 외의 동질효소들은 거의 활성을 보이지 않았다. 결론적으로 BcLDH1은 전형적인  $\text{NAD}^+$ -의존형이며, L-lactate에 특이적인 dehydrogenase 효소임을 확인하였다.

## 감사의 말

이 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

## 참고문헌

- Ankolekar, C., T. Rahmati, and R.G. Labbé. 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 460-466.
- Barstow, D.D., A.R. Clarck, W.N. Chia, D. Wigley, A.F. Sharman, J.J. Holbrook, T. Arkinson, and N.P. Minton. 1986. Cloning, expression and complete nucleotide sequence of *Bacillus stearothermophilus* L-lactate dehydrogenase gene. *Gene* 46, 47-55.
- Bernard, N., T. Ferain, D. Garmyn, P. Hols, and J. Delcour. 1991. Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 290, 61-64.
- Berwal, R., N. Gopalan, K. Chandel, G.B. Prasad, and S. Prakash. 2008. *Plasmodium falciparum*: enhanced soluble expression, purification and biochemical characterization of lactate dehydrogenase. *Exp. Parasitol.* 120, 135-141.
- Clarke, A.R., T. Atkinson, and J.J. Holbrook. 1989. From analysis to synthesis: New ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part I. *Trends Biochem. Sci.* 14, 101-105.
- Clarke, A.R., T. Atkinson, and J.J. Holbrook. 1989. From analysis to synthesis: New ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part II. *Trends Biochem. Sci.* 14, 145-148.
- Datta, R., S.P. Tsai, P. Bonsignore, S.H. Moon, and J.R. Frank. 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 221-231.
- Diez-Gonzalez, F., J.B. Russell, and J.B. Hunter. 1997. NAD-independent lactate and butyryl-CoA dehydrogenases of *Clostridium acetobutylicum* P262. *Curr. Microbiol.* 34, 162-166.
- Garmyn, D., T. Ferain, N. Bernard, P. Hols, and J. Delcour. 1995. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 266-272.
- Gavie, E.I. 1980. Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* 44, 106-139.
- Granum, P.E. 2001. *Bacillus cereus*, pp. 373-381. In Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers, 2<sup>nd</sup> Ed. In M.P. Doyle, L.P. Beuchat, and T.J. Montville (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Hediger, M.A., G. Frank, and H. Zuber. 1986. Structure and function of L-lactate dehydrogenases from thermophilic and mesophilic bacteria, IV. The primary structure of the mesophilic lactate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 367, 891-903.
- Horikiri, S., Y. Aizawa, T. Kai, S. Amachi, H. Shinoyama, and T. Fujii. 2004. Electron acquisition system constructed from an NAD-independent D-lactate dehydrogenase and cytochrome c2 in *Rhodospseudomonas palustris* No. 7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 516-522.
- Huang, J., Y. Huang, X. Wu, W. Du, X. Yu, and X. Hu. 2009. Identification, expression, characterization, and immunolocalization of lactate dehydrogenase from *Taenia asiatica*. *Parasitol. Res.* 104, 287-293.
- Ito, Y. and T. Sasaki. 1994. Cloning and nucleotide sequencing of L-lactate dehydrogenase gene from *Streptococcus thermophilus* M-192. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1569-1573.
- Iwata, S. and T. Ohta. 1993. Molecular basis of allosteric activation of bacterial L-lactate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 230, 21-27.
- Jang, M.U. and T.J. Kim. 2008. Molecular cloning and overexpression of L-lactate dehydrogenase gene from *Bacillus halodurans*. *J. Agr. Sci. Chungbuk Nat'l. Univ.* 24, 95-104.
- Jin, Q., J.Y. Jung, Y.J. Kim, H.J. Eom, S.Y. Kim, T.J. Kim, and N.S. Han. 2009. Production of L-lactate in *Leuconostoc citreum* via heterologous expression of L-lactate dehydrogenase gene. *J. Biotechnol.* 144, 160-164.
- Lee, J.H., M.H. Choi, J.Y. Park, H.K. Kang, H.W. Ryu, C.S. Sunwo, Y.J. Wee, K.D. Park, D.W. Kim, and D. Kim. 2004. Cloning and characterization of the lactate dehydrogenase genes from *Lactobacillus* sp. RKY2. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 9, 318-322.
- Ma, C., C. Gao, J. Qiu, J. Hao, W. Liu, A. Wang, Y. Zhang, M. Wang, and P. Xu. 2007. Membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities of a newly isolated *Pseudomonas stutzeri* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 91-98.
- Okano, K., Q. Zhang, S. Shinkawa, S. Yoshida, T. Tanaka, H. Fukuda, and A. Kondo. 2009. Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using a genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and alpha-amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 462-467.
- Richter, K. and C. Berthold. 1998. Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. *J. Agric. Eng. Res.* 71, 181-191.
- Sakowicz, R., K.W. Kallwass, W. Parris, C.M. Kay, J.B. Jones, and M. Gold. 1993. Threonine 246 at the active site of the L-lactate dehydrogenase of *Bacillus stearothermophilus* is important for catalysis but not for substrate binding. *Biochemistry* 32, 12730-12735.
- Schlatter, D., O. Kriech, F. Suter, and H. Zuber. 1987. The primary structure of the psychrophilic lactate dehydrogenase from *Bacillus psychrosaccharolyticus*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 368, 1435-1446.
- Södergård, A. and M. Stolt. 2002. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog. Polym. Sci.* 27, 1123-1163.
- Taguchi, H. and T. Ohta. 1991. D-Lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* 266, 12588-12594.
- Tokiwa, Y. and B.P. Calabia. 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 244-251.
- Tynecka, Z. and A. Malm. 1996. Cadmium-sensitive targets in the aerobic respiratory metabolism of *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* 36, 447-452.
- Zboril, P. and V. Wernerová. 1996. The isolation and some properties of the membrane-bound lactate dehydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 595-605.