

고농도 Indole 내성 *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106에 의한 Indigo 및 Indirubin의 생산

최리나, 차문정, 박정욱¹, 주우홍[@]

창원대학교 생물학과, 창원대학교 유전공학 연구소¹

전화 (0551)279-7443, 팩스 (0551)279-7440

Since the biosynthetic production of indigo and indirubin normally reflects a difficult process including the toxicity of indole to microorganisms, only several bacterial strains have been exploited to produce indigo and indirubin from indole or its derivatives. *P. savastanoi* BCNU 106, which was a gram negative bacterium, was isolated and tolerant to 10% (v/v) toluene. The indole tolerance level of *P. savastanoi* BCNU 106 was as high as 160 mg/ml when toluene or *p*-xylene was added to the medium to 20% by volume. *P. savastanoi* BCNU 106 grown in a two-phase culture system containing indole(100 mg/ml) and *p*-xylene (0.2 ml/ml) produced *p*-xylene-soluble pigments, blue indigo and purple indirubin. Of the conditions tried, the production of indigo and indirubin was found only when *P. savastanoi* BCNU 106 was grown in the two-phase system overlaid with the organic solvents with appropriate polarity. This study may illustrate that the isolated extremophile *P. savastanoi* could be used in the microbial conversion process of the industrial potentials.

서론

Indigo는 세계적으로 가장 잘 알려진 직물염색제 중의 하나로 우수한 면이나 모직물의 생산에 응용된다. 몇몇 *Pseudomonas* 균주는 indole이나 유도체로부터 Indigo를 생산하는 것으로 보고되었다^{1,2}. Indigo의 생합성을 방해하는 한가지 어려움은 indole의 독성으로 indole을 포함한 방향족 탄화수소 화합물은 미생물의 생육을 저해한다^{3,4}. 물과 유기용매로 구성된 2상(two phase)의 생물전환 시스템은 물에 낮은 용해성을 가진 몇몇 화합물의 전환에 이용되어 왔다. *P. savastanoi* BCNU 106를 분리하여 indole로부터 산업적 이용 가능성을 가지고 있는 indigo 및 indirubin의 생산에 응용하고자 한다.

재료 및 방법

indole 내성 *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106의 최적배지 조성은 0.2% Bacto yeast extract, 1% sodium chloride, 0.05% ammonium sulfate 그리고 10 mM

magnesium sulfate로 30℃에서 호기적으로 18시간 배양시켜 사용되었다. Indole 내성측정을 위해 배지 10 ml당 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 80, 100, 120, 160 그리고 200 mg의 indole을 첨가하여 수행하였으며, 유기용매는 배지의 20%로 증충한 후 30℃, 150 rpm에서 배양하여 72시간 후에 OD₆₆₀의 조건에서 측정하였다.

결과 및 고찰

2상에 첨가된 indole의 양에 따른 효과를 보기 위해, indole 농도별로 toluene, *p*-xylene 그리고 *n*-hexane에서의 indole 및 indirubin 생산의 유무를 확인하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 toluene 상에서의 indole의 미생물학적 전환은 indole이 2-100 mg이 공급될 때 indigo 및 indirubin의 생산이 확인되었으며 *p*-xylene의 경우 1-100 mg의 indole이 사용되었을 때 이들 산물의 생산이 관찰되었다. 그러나 *n*-Hexane의 경우 4 mg 이상의 indole이 첨가될 때는 indole 및 indirubin이 생산되지 않았다. 효율적인 생물학적 전환을 위해, 분리된 indole 내성 *P. savastanoi*의 유기용매하에서의 성장률을 조사하였다 (Table 2). 이 균주는 10% toluene, *p*-xylene 그리고 *n*-hexane하에서 이 세균의 성장저해는 거의 일어나지 않았으며 특히 toluene 상에서 특이적으로 높은 내성을 보여주었다. 이 연구결과를 요약하면, 분리된 *P. savastanoi*는 유기용매 toluene과 *p*-xylene하에서 indole을 기질로 하여 indigo 및 indirubin의 미생물학적 전환이 이루어졌으며, 유기용매하에서의 산업적 유용물질을 생산하기 위한 이 극한세균의 응용가능성이 기대된다.

요약

Indole은 미생물에 강한 독성을 가지고 있으므로 indole의 생물학적 전환이 어려우므로 단지 소수의 미생물들이 Indole이나 그것의 연관물질들로부터 Indigo와 Indirubin을 생산하는데 응용되어 왔다. 본 연구실에서 분리된 *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106은 toluene에 강한 내성을 가졌으며 *P. savastanoi* BCNU 106의 Indole 내성 정도는 *p*-xylene이나 toluene이 배지 부피의 20%로 첨가되었을 때 160 mg/ml로 매우 높은 내성 정도를 나타내었다. Indole (100 mg/ml) 과 *p*-xylene (0.2 ml/ml)을 포함한 two-phase culture system에서 자란 *P. savastanoi* BCNU 106은 indole로부터 푸른색 indigo나 보라색 indirubin의 미생물학적 전환을 보여주었다. indigo와 indirubin의 생산은, *P. savastanoi* BCNU 106가 적절한 농도의 유기용매가 증충된 two-phase system에서 자랐을 경우에만 형성되었다. 그러므로 본 연구는, 분리된 indole 내성 세균이 유기용매하에서 indirubin과 같은 산업적 가치를 가진 유용물질을 생산하는데 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Doukyu, N., Arai, T., and Aono, R., "Effects of organic solvents on indigo formation by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 grown high levels of indole"(1998), Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(6), 1075-1080.
2. O'Connor, K. E., Dobson, A. D. W., and Hartmans, S., "Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity"(1997), Applied and Environmental Microbiology, 63, 4287-4291.
3. Strand, S. E., M. D. Bjelland, and H. D. Stensel. "Kinetics of chlorinated hydrocarbons degradation by suspended cultures of membrane-oxidizing bacteria"(1990), Res. J. Water Pollut. Control. Fed. 62, 124-129.
4. Wiesel, I., S. M. Wubker, and H. J. Rehm. "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture"(1993), Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 110-116.

Table 1. Production of indigo and indirubin by *P. savastanoi* BCNU 106 under the presence of indole and the organic solvents

Solvent	log P_{ow}	Indole added to 10ml medium (mg)									
		0	1	2	4	8	16	32	64	80	100
색소형성 (Indigo and Indirubin)											
Toluene	2.8	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++
<i>p</i> -Xylene	3.1	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
<i>n</i> -Hexane	3.9	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

(-: not producing, +: producing a small amount, ++: producing highly)

Table 2. Growth of *P. savastanoi* BCNU 106 in the presence of indole and the organic solvents

Solvent	log P_{ow}	Indole added to 10ml medium (mg)									
		0	1	2	4	8	16	32	64	80	100
		Growth(OD ₆₆₀)									
Toluene	2.8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>p</i> -Xylene	3.1	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>n</i> -Hexane	3.9	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++

(+: growing very poorly, ++: growing poorly, +++: growing well, ++++: growing very well)