

Acinetobacter sp. KL-9에 의한 Indole 분해 및 Indigo 생성의 특성

김진완 · 김진규 · 이수오 · 이 경*
창원대학교 자연과학대학 미생물학과

Degradation of Indole by *Acinetobacter* sp. KL-9 with Production of Indigo. Kim, Jin-Wan, Jin-Kyoo Kim, Soo O Lee, and Kyoung Lee*. Department of Microbiology, Changwon National University, Kyongnam 641-773, Korea – Indole and its derivatives form a class of toxic recalcitrant environmental pollutants. A bacterium, strain KL-9 was isolated from soil with indole as a sole source of carbon and nitrogen. KL-9 was identified as *Acinetobacter* sp. on the basis of 16S rRNA gene sequence, fatty acid and quinone compositions. This identification was also confirmed by the ability of carbon source utilization and other biochemical tests. The growth of *Acinetobacter* sp. KL-9 was fastest with 0.3 mg/ml of indole and was inhibited by higher than 0.5 mg/ml of indole in the medium. KL-9 with indole also produced indigo. The formation of indigo was stimulated in the presence of glucose, which is not a growth-supporting carbon source for KL-9. Additional biotransformation evidence showed that anthranilate is an intermediate for the degradation of indole by KL-9.

Key words: Biotransformation, *Acinetobacter* sp., indole, indigo, anthranilate

대장균을 포함한 많은 미생물들은 tryptophanase에 의해서 tryptophan으로부터 indole을 생산하며 이러한 특징은 미생물의 분류에 이용되고 있다. 하지만 대부분의 이러한 세균들은 tryptophan 분자의 결기지만을 분해할 뿐 heterocyclic ring인 indole을 분해하지는 못해 자연계로 방출되어 널리 분포하고 있지만 실제로 존재하는 양은 그리 많지 않아 환경오염 물질로서의 인식은 높지 않다. Indole은 미생물의 배양 시 발생하는 구린내의 원인이기도 하지만 indole이 매우 낮은 농도에서는 기분 좋은 향기를 내기 때문에 화장품, 향수 또는 아이스크림의 원료로 사용되기도 한다.

현재는 indole과 그 유도체는 담배연기, coal-tar, 그리고 하수 등을 통해서 환경으로 많이 방출되어 오염물질로 분류되고 있다[12,14,30]. 이들은 동물 실험에서 폐기종, hemoglobinuria와 hemolysis 등을 야기한다고 보고되며 특히 methyl 유도체는 돌연 변이성을 나타내기도 한다[15,30].

Alcaligenes sp.[6], *Aspergillus niger*[21], *Pseudomonad*[32], *Bacillus fluorescens*[13]와 동정되지 않은 몇 가지 균주들에 의해서 indole 분해가 보고되고 있으며, crude cell extract를 이용한 산소 소모 측정과 배양액에 축적되는 대사 중간체의 동정으로 분해경로는 제시되고 있으나[6,13,21,32], 생화학 및 분자생물학적 연구는 부족한 상태이며 앞으로 indole 분해경로의 올바른 확립을 위해 많은 연구가 필요하다. 특히 이의 결과는 미생물에 의한 N-heterocyclic 방향

족 화합물의 생분해에 중요한 자료가 될 것이다.

본 연구에서는 indole 분해세균을 토양으로부터 분리하여 이를 동정하였으며 indole 농도에 따른 성장과 indigo의 생성 조건을 검토하여 indole 분해에 관련된 분자 생물학적 연구 및 indigo 생산에 관한 기초를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 배지, 균주, 시약 및 plasmid

창원시 일대에서 분리한 indole 분해 및 indigo 생산균인 KL-9을 시험균으로 사용하였으며 유전자 조작실험을 위해서는 *E. coli* JM109 균주를 사용하였다. PCR product의 cloning과 DNA sequencing을 위해서 pGEM-T easy vector (Promega Co.)를 사용하였다.

Indole 분해균의 분리 및 탄소원 이용능을 알아보기 위한 무기 최소 배지로 ABM 배지[4]를 사용하였으며, indole 분해균의 계대 배양과 유전자조작을 위한 *E. coli* JM109 균주 배양에는 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하였으며 재조합 plasmid의 선별을 위해서 MacCONKEY agar(Difco Co.)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약은 Aldrich, Sigma 또는 Junsei사의 제품으로 일급 시약을 사용하였다.

균주의 배양 및 탄소원 이용 시험

Indole 분해세균의 성장에 대한 indole의 영향을 알아보기 위해서 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 그리고 0.5 mg/ml의 indole을 포함하거나 3.6 mg/ml의 glucose와 각 농도의 indole을 동시에 포함하는 ABM 배지에서의 성장을 측정하였다. 액

*Corresponding author
Tel. 055-279-7466, Fax. 055-279-7460
E-mail: kLee@sarim.changwon.ac.kr

체 배양을 위해 250 ml 삼각 flask에 50 ml의 ABM 배지와 indole 및 glucose를 첨가한 후 28°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 세포가 청색 색소와 결합하여 덩어리를 형성하고 배양액에 녹는 일부의 청색색소는 600 nm 파장의 빛을 흡수하여 흡광도 및 생균수를 측정하여 성장 곡선을 작성하는 것은 본 실험에서는 적합하지 않았다. Indole 분해세균인 KL-9의 탄소원의 이용능력을 알아보기 위해서 다양한 탄소원을 각각 포함하는 ABM 한천 배지에 indole 분해세균을 도말하여 28°C에서 성장을 관찰하였다. 그 외 증발력 또는 승화력이 높은 방향족 탄수화합물은 ABM 한천 배지에 indole 분해세균을 도말한 후 petri dish의 뚜껑에 방향족 탄수화합물을 vapor로 가하여 밀봉한 뒤 petri dish를 뒤집어 28°C에 배양하여 KL-9의 성장을 관찰하였다. 먼저 한천 배지에서 KL-9의 성장을 가능하다고 판단된 탄소원들은 ABM 액체 배지에서 indole 분해세균의 성장능을 다시 시험하였다.

항생제 감수성 조사

Indole 분해세균의 항생제 감수성 조사를 위해서 적당한 농도의 다양한 항생제를 각각 포함하는 LB 한천 배지에서 indole 분해세균의 성장을 관찰하였다. 사용된 항생제는 ampicillin (50 µg/ml), cabenicillin(50 µg/ml), kanamycin(25 µg/ml), gentamycin(20 µg/ml), chloramphenicol(30 µg/ml)과 tetracycline(25 µg/ml)을 사용하였으며 28°C에서 3일간 배양하여 성장이 관찰되면 내성으로 성장이 관찰되지 않으면 감수성으로 판단하였다.

Indigo의 동정

Indole을 포함한 ABM 배지에서 배양된 indole 분해세균을 생성하는 청색 색소가 indigo 임을 확인하기 위해서 청색 색소 형성이 좋은 조건인 0.2 mg/ml 또는 0.3 mg/ml의 indole을 포함하는 ABM 배지에서 4일간 28°C에서 진탕 배양한 KL-9 배양액을 ethyl acetate로 추출하였다. Ethyl acetate에 녹인 합성 indigo 용액과 배양액의 organic phase를 0.2 mm 두께의 silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate(Merck, Darmstadt, Germany)를 이용하여 chloroform:acetone(95:5) 용액으로 전개하여 R_f 값을 비교하였다. 추가적인 분석을 위하여 organic phase와 ethyl acetate에 녹인 합성 indigo 용액을 분광 광도계(Scinco Co, Korea)를 이용하여 파장에 따른 흡광도를 측정하였다.

Indole에 의해 생성되는 중간 대사 산물의 동정

KL-9을 0.25 mg/ml의 indole을 포함하는 LB 액체배지(25 ml)에 접종한 후 28°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 24시간 후 세포를 원심 분리 회수한 후 20 mM Na-pyruvate, 0.1 mg/ml indole, 50 mM Na-phosphate(pH 7.0)을 포함하는 용액 100 ml에 현탁시켜 앞에서 언급한 조건으로 6시

간 반응 시켰다. 다시 배양 상등액을 ethyl acetate로 추출한 후 rotary evaporator로 2000배 농축시킨 후 GC/MS 분석을 실시하였다[5].

FAME 및 Quinone 분석

KL-9의 지방산 조성은 trypticase soy broth agar에 배양한 세포로부터 지방산을 esterification시킨 후 gas chromatography-flame ionization detector로 분석하였다. Quinone은 TLC로 quinone 층을 분리한 후 RP₁₈ Waters column에 methyl alcohol:diisopropyl ether(3:1) 용매를 이용하여 High Performance Liquid Chromatography로 분석하였다. FAME와 quinone 분석은 각각 경상대학교와 생명공학연구소에서 실시하였다.

DNA 조작

Bacterial cell로부터 plasmid DNA의 분리를 위해서 alkaline lysis 방법을 사용하였으며, 전기영동, *E. coli* JM109 competent 세포 제조, 제한효소 및 ligase 처리는 널리 알려진 방법에 준하여 실행하였다[33]. Agarose gel 조각으로부터의 plasmid DNA의 용출은 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 수행하였다. 세균으로부터 chromosomal DNA는 아래 방법으로 분리하였다. LB 액체 배지에 밤샘 배양한 배양액 1 ml를 14,000 × g, 실온의 조건에서 5분간 집균하였다. 세균 pellet을 1 ml의 saline-EDTA (0.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0)로 두 번 세척하고 -20°C에 10분간 보관하였다. 동결된 세균 pellet을 녹인 후 0.2 ml의 2×Protease K buffer[(20 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 20 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2% SDS)]와 0.1 ml의 멸균 증류수를 가하여 현탁하고, 0.1 ml의 protease K 용액(stock 20 mg/ml)을 가한 후 50°C에서 2시간 동안 반응하였다. 반응액을 0.4 ml의 saturated phenol과 0.4 ml의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(50:49:1) 용액으로 각 한번씩 추출한 후 동량의 iso-propanol을 가하여 조심스럽게 혼합하였다. 14,000 × g로 실온에서 10분간의 원심분리에 의해 chromosomal DNA를 침전시킨 뒤 70% ethanol로 한번 세척하여 37°C에서 10분 동안 ethanol을 증발시켰다. Chromosomal DNA pellet에 100 µl의 TE buffer를 가하여 조심스럽게 녹인 후 RNase 반응에 의해 RNA를 제거하였다.

16S rRNA 유전자의 cloning

KL-9의 16S rRNA 유전자는 진정 세균의 16S rDNA domain 양 말단의 consensus sequence에 상보적인 primer인 16SrF primer(*E. coli* numbering 8~27:5'-AGAGTTTGATCA TGGCTCAG-3')와 16SrR primer (*E. coli* numbering 1492~1510:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 이용하여 증폭하였다[16,34]. PCR반응물의 조성은 전체 부피 50 µl에

5 μ M primer를 각각 5 μ l, 1 unit의 Ex-Taq DNA polymerase(TaKaRa, Tokyo), 2.5 mM dNTP를 4 μ l, 50 ng/ μ l chromosomal DNA를 2 μ l, 10 \times buffer를 5 μ l, 그리고 나머지는 멸균 증류수로 구성되어 있다. PCR 반응조건은 94°C에서 30초간의 denaturation, 55°C에서 30초간의 primer annealing, 그리고 72°C에서 60초간의 DNA polymerization을 30 회 반복하였다.

증폭된 16S rDNA 단편은 agarose gel 전기영동으로 확인하였으며 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit로 agarose gel로부터 분리하였다. 분리된 PCR product는 pGEM-T easy vector에 삽입한 후 competent *E. coli* JM109에 transformation 하여 50 μ g/ml의 ampicillin을 포함한 Mac onkey 한천 배지에 도말한 후 밤샘 배양하여 백색 colony를 선별하였다. 형질 전환된 균주를 다시 50 μ g/ml의 ampicillin이 포함된 LB 액체배지에 밤샘 진탕 배양하여 plasmid DNA를 alkaline lysis 방법으로 분리하였다. 분리된 plasmid는 agarose gel 전기영동으로 확인하였으며 EcoRI 절단 후 agarose gel 전기영동 분석으로 PCR product가 cloning 되었음을 확인하였다.

16S rRNA 유전자의 염기 서열 분석을 위한 plasmid DNA 분리는 Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega, USA)를 이용하였다. Plasmid DNA는 M13 forward primer, M13 reverse primer와 16SrI primer(5'-CACGAGCTG ACGACAGCCAT-3')를 이용하여 ABI PRISM 377 Automatic Sequencer(PE Biosystems)로 DNA 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열 분석은 한국기초과학 지원연구소 부산분소에서 실시하였다.

각각의 primer에 의해서 결정된 KL-9 16S rDNA 염기서열을 NCBI의 Blast 2 program으로 조합하여 하나의 완전한 sequence로 만들었으며, Ribosomal Database Project(RDP) [24]의 Similarity RANK와 NCBI의 GenBank와 EMBL등의 nucleotide database를 검색하여 유사한 rDNA 염기서열과 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

Indole 분해 세균의 분리 및 생리적 특성

창원시 일대에서 채취한 토양 시료로부터 indole을 유일한 탄소 및 에너지원으로 포함하는 ABM 배지에 농화 배양하여 indole 분해 세균을 분리하였다. 분리된 균주들 중에서 indole에서의 성장이 좋으면서 indigo로 보이는 청색 색소의 생성이 풍부한 균주를 선택하여 KL-9 이라 명명하였다. KL-9은 0.25 mg/ml의 indole을 포함하는 ABM 한천 배지에서 백색 콜로니를 형성하였으며 콜로니 주위는 청색 색소가 축적되었다. KL-9은 약한 운동성을 보이는 그람 음성 간균이며, ampicillin, cabenicillin, chloramphenicol과 tetracycline에는 내성을 가졌으나 kanamycin, gentamycin에는

감수성을 가졌다. Catalase는 양성, oxidase는 음성으로 판명되었다.

Indole 분해세균의 탄소원 이용능력을 알아보기 위해서 다양한 탄소원을 각각 포함하는 ABM 한천 배지에 indole 분해세균을 도말하여 28°C에서의 성장을 관찰한 결과 ethanol(0.1%), benzoate(0.1%), acetate(0.1%), succinate (0.1%), salicylate(2-hydroxybenzoate, 10 mM), anthranilate(2-aminobenzoate, 10 mM), phenol (vapor), pyruvate(10 mM)와 catechol (5 mM)에서 성장이 관찰되었다. Isatin(0.03%), cyclohexane (vapor), benzene(vapor), toluene(vapor), methanol(0.1%), styrene (vapor), cumene(vapor), biphenyl(vapor), anisole(vapor), 2-nitrophenol(vapor), styrene oxide(vapor), ethylbenzene(vapor), naphthalene(vapor), indane(vapor)과 indene(vapor)에서는 성장이 관찰되지 않았다. 또한 육탄당인 glucose(0.1%)와 mannitol(0.1%)에서는 성장이 관찰되지 않았다. 6탄당의 이용능력의 결핍은 Bergey's manual of systematic bacteriology에서 보고한 *Acinetobacter*의 특징이기도하며 [26], *Acinetobacter* 속으로부터 benzoate, anthranilate, salicylate 및 catechol의 분해에 관한 유전자는 이미 보고된 바가 있다 [3, 27, 28].

Indole 분해 세균의 동정

미생물의 세포막의 구성성분은 환경에 적응하기 위해서 변화를 보이지만 동일 조건에서 배양할 경우 한 종의 미생물은 같은 양상을 나타내며 종간의 다양성이 관찰된다. 이러한 특징은 미생물의 화학적 분류 방법으로 사용되고 있다. 그중 세포막의 성분인 지방산의 분석을 통한 미생물의 분류는 비교적 간단한 방법으로 빠르게 수행할 수 있어 biomarker로 널리 이용되고 있다.

KL-9의 동정을 위해서 MIDI 방법에 의한 FAME 분석을 수행한 결과 C₁₀에서 C₂₀범위의 지방산 성분이 나타났으며 많은 양으로 존재하는 것으로는 18:1 ω 9c, 16:0과 16:1 ω 7c/15 iso 2OH이었다 (Table 1). 이러한 결과는 library 검색에서 *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas flectens*와 각각 49%, 47.7%의 지방산 조성의 일치를 보여 KL-9

Table 1. Cellular fatty acid composition of strain KL-9

Fatty acid	Composition (%)
18 : 1 ω 9c	35.6
16 : 0	23.7
16 : 1 ω 7c/15 iso 2OH	16.3
12 : 0	3.0
12 : 0 3OH	2.8
18 : 0	2.5
17 : 1 ω 8c	2.5
18 : 3 ω 6c(6,9,12)	1.7
12 : 0 2OH	1.6

은 *Acinetobacter* 또는 *Pseudomonas* 속에 포함될 가능성이 제시하였다.

Quinone은 지방산과 함께 미생물의 세포막의 구성성분으로 화학분류의 중요한 biomarker로 사용되고 있다. Quinone은 크게 menaquinone과 ubiquinone으로 나누어지며 isoprene unit의 수에 따라서 세부적으로 나누어진다. KL-9의 quinone 분석 결과 isoprene unit을 9개 가지는 Q(ubiquinone)-9이 86.1%로 가장 많은 양을 차지하였으며 Q-8이 10.5%, Q-10이 3.4%로 나타났다. Q-9은 *Acinetobacter* 속에서 지배적으로 나타남이 보고된 바 있으며 *Acinetobacter calcoaceticus*에서 glucose의 산화에 관여하는 quinoprotein의 구성성분으로서 cytochrome b-562의 전자 수용체로 알려져 있다[1,7,14,17,25].

rRNA는 virus를 제외한 모든 생명체에서 존재하며, 진화하는 동안 매우 잘 보존된 반면 일부 부분에서는 다른 부분에 비해 빠른 변화를 나타내어 분류학적인 지표로서 이용되고 있다. 특히, 약 1500개의 염기를 지닌 16S-rRNA는 적당한 양의 진화적 정보를 담고 있어 원핵 미생물의 분류에 많이 이용되고 있다. KL-9의 동정을 위하여 진정세균 16S rRNA 유전자를 증폭하는 primer인 16SrF와 16SrR를 이용하여 KL-9의 chromosomal DNA로부터 약 1.5-kb의 16S rDNA를 PCR에 의해 증폭하였으며 M13 forward primer, M13 reverse primer 그리고 16SrI primer를 이용하여 1459 bp의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과는 NCBI의 GenBank에 수록되어 있으며 accession number는 AF285180이다.

RDP의 Similarity RANK와 NCBI의 Blast 프로그램을 이용하여 염기서열의 상동성을 조사한 결과 *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006의 16S-rRNA 유전자와 99.5%의 상동성을 나타내었으며 그 외의 *Acinetobacter* 속과는 95% 이상의 상동성을 보여[20,31], KL-9은 *Acinetobacter* 속에 속하며 *Acinetobacter calcoaceticus*와 가장 유사함을 알 수 있었다.

Indole 분해 및 indigo 생성의 특성

Indole 농도에 따른 성장 특성과 청색 색소의 생성특성을 알아보기 위하여 여러 농도의 indole을 포함하는 최소 무기 배지에서 KL-9의 성장을 측정하였으나, 세포가 청색 색소와 뭉쳐 자라기 때문에 성장 곡선의 작성을 위한 흡광도의 측정은 불가능하였다. 그러한 성장 및 청색 색소의 형성을 육안으로 관찰하였으며, flask에서 자란 현탁액을 시험관에 옮겨 보여주는 사진은 Fig. 1과 같다. 결과에 의하면 glucose의 첨가와 무관하게 0.3 mg/ml의 indole 농도에서 가장 빠른 성장을 보였으며, 청색 색소의 형성도 가장 많은 것으로 관찰되었다. 다음으로 0.2 mg/ml의 indole 농도에서 성장이 빠른 것으로 나타났으며 청색 색소의 형성도 비교적 많은 것으로 관찰되었으며 0.1 mg/ml의 indole 농도에서 느린 성

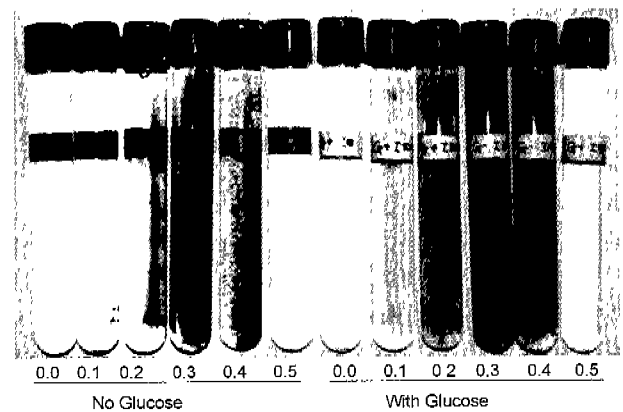


Fig. 1. Effect of indole concentration on the growth of *Acinetobacter* sp. KL-9 and indigo formation.

Indole was added in the ABM at the concentration (mg/ml) shown at the bottom in the absence or presence (3.6 mg/ml) of glucose.

장을 보였다. Indole을 0.4 mg/ml 농도로 포함한 배지에서 초기의 성장 속도는 indole의 독성에 의해 느렸지만 약 12시간 이후부터 빠른 성장이 관찰되었는데 이것은 indole이 증발되어 배지내의 농도가 낮아짐에 따라 일정 시간의 경과 후 성장속도가 빨라지는 것으로 추정되었다. 0.5 mg/ml의 indole 농도에서는 세균이 성장할 수 없었으며 이는 indole 자체의 독성 때문이라고 추정되었다. 0.5 mg/ml의 indole 농도를 제외한 모든 농도에서 KL-9은 glucose를 포함한 배지들에서 빠른 성장을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 *Acinetobacter* 속 미생물이 glucose를 탄소원으로는 이용하지 못하나 glucose를 Q-9을 통해 산화하여 에너지원으로써 사용할 가능성이 있는 것으로 추정되었다[1,8,25]. KL-9이 성장을 보이는 배지에서 세포들이 녹색 또는 푸른색의 작은 입자로 뭉쳐지는 현상은 성장이 빠른 조건일수록 활발히 나타났으며 이는 indole의 분해 과정에서 생성되는 것으로 보이는 indigo와 KL-9 세포가 뭉쳐 나타나는 현상으로 추정되었다.

Indole을 포함한 ABM 배지에서 생성된 청색 색소가 indigo임을 확인하기 위해 0.2 mg/ml 또는 0.3 mg/ml의 indole을 포함하는 ABM 배지에서 4일 동안 배양한 KL-9 배양액을 ethyl acetate로 추출하여 합성 indigo 용액과 TLC에서의 R_f값과 파장에 따른 흡광도를 비교하였다. 기질인 indole은 배양 기간 동안 완전히 소모된 것을 TLC 분석으로 확인할 수 있었다. R_f=0.5의 위치에 합성 indigo와 함께 청색 spot을 나타내었으며, 0.16 위치에는 isatin과 함께 노란색을, R_f=0.4에서는 purple 색이 형성되어 이 물질은 indirubin으로 추정되었다. 가시 영역 중에서는 600 nm에서 최대 흡광치를 나타냄으로서 KL-9이 생산하는 blue 색의 주요 물질은 indigo임을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 600 nm에서 흡광도 값을 비교해 볼 때 기질의 indigo로 전환 효율은 약 1/20~1/30 정도임을 알 수 있었다. 합성 indigo와는 달리 270 및 390

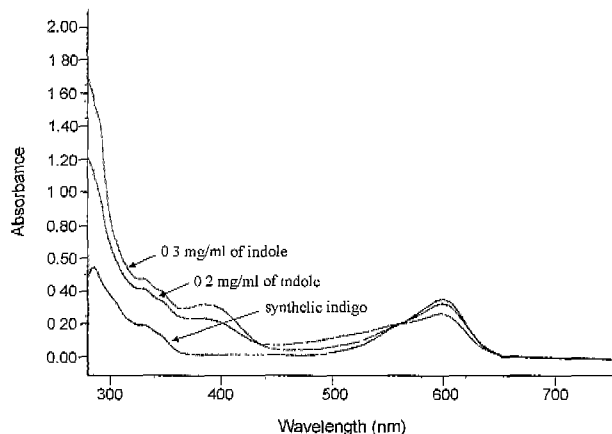


Fig. 2. Absorption spectra of solutions of indigo in ethyl acetate.

The synthetic indigo contained 10 mg/l. Others were extracts of culture broths containing the indicated concentration of indole for growth.

nm 위치에서도 흡광 최대치가 관찰되었는데 이것은 indole 분해 과정에서 생산되는 다른 종류의 대사 산물에 의한 것으로 추정되었다. 다른 실험에 의하면 indigo는 KL-9에 의해서 다른 물질로 전환이 되지 않았고, isatin은 노란색에서 isatic acid로 추정되는 무색으로 전환되는 것을 확인 할 수 있었다. Indigo와 isatin은 KL-9의 성장을 유도하지 못하기 때문에 이들 대사 산물은 세균의 indole의 성장에 필요한 대사과정에서 생성되는 부산물임을 추정할 수 있었다.

미생물의 방향족 화합물의 분해 과정에 존재하는 대사 산물은 보통 배지에 축적되지 않아 중간 대사 산물을 동정하기 쉽지 않다. 위 4일간의 배양액의 ethyl acetate 농축액의 GC/MS 분석에서는 indole 대사의 중간체로 추정될 수 있는 catechol, 2-nitrophenol, salicylate, anthranilate는 동정되지 않았다. 이를 극복하기 위하여 재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 에너지원인 pyruvate만 있는 조건에서 indole의 bio-transformation을 짧은 시간 동안 실시하였다. Ethyl acetate 추출 농축액의 GC/MS 분석 결과 retention time 14.8분대에 authentic anthranilate와 retention time 및 fragmentation pattern이 같은 물질이 동정되었다(Fig. 3). 그러나 catechol (retention time=11.9 min; M^+ =110), 2-nitrophenol(retention time=10.6 min; M^+ =139), salicylate(retention time=13.6 min; M^+ =138)는 동정되지 않았다. 본 결과로부터 KL-9은 indole을 anthranilate로 전환시키는 분해 경로를 갖는다는 것을 보여주었다. 지금까지의 KL-9에 의한 biotransformation 결과를 종합하여 보면 Fig. 4와 같이 indole에서 indigo 및 anthranilate 형성과정을 도식화 할 수 있다.

Indole을 탄소원으로 이용하는 미생물인 *Aspergillus niger* [21]와 *Alcaligenes* sp. In3[6], *Pseudomonas* sp. ST-200[9]에서 indigo가 형성된다고 보고하고 있다. 또한, 방향족 화합물에서 호기적으로 성장하는 미생물은 indole을 indigo로 전환시키는 oxygenase를 갖고 있는 것이 잘 알려져 있다 [23]. 대표적인 것은 toluene dioxygenase[35], naphthalene dioxygenase[2,11,23], toluene monooxygenase[22], dimethyl

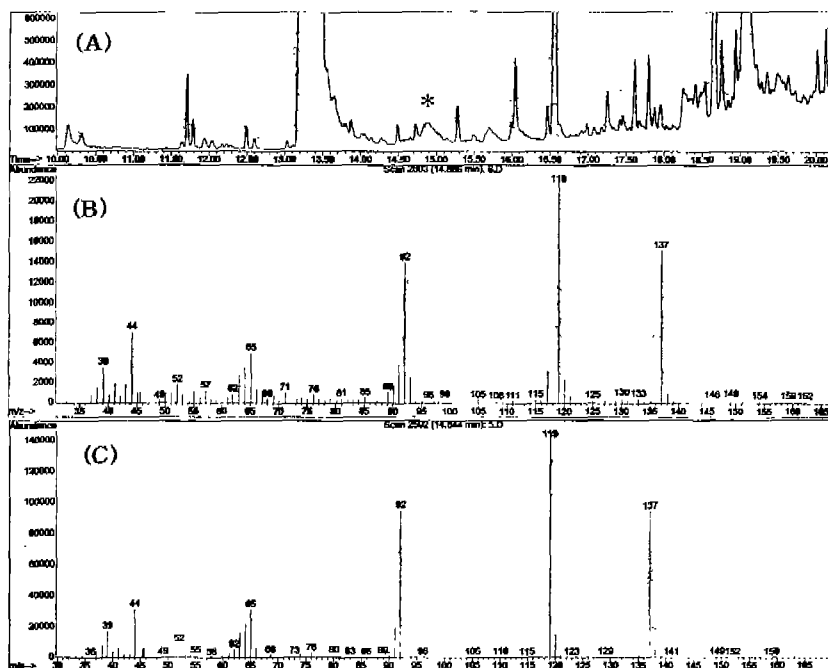


Fig. 3. GC/MS analysis of ethyl acetate extract of indole biotransformation by *Acinetobacter* sp. KL-9. (A) GC chromatogram of ethyl acetate extract. The mark * is for the anthranilate peak, the major peak at 13.4 min for the substrate indole. (B) Fragmentation pattern of anthranilate formed by biotransformation. (C) Fragmentation pattern of authentic anthranilate.

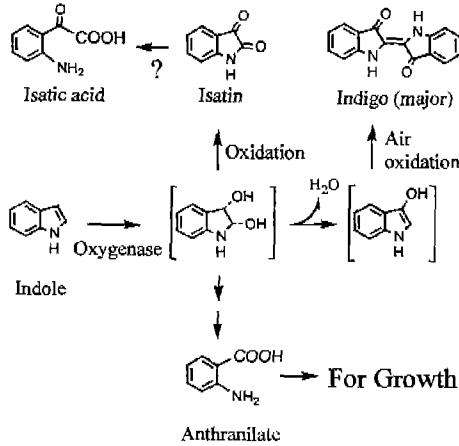


Fig. 4. Biotransformation routes of indole by *Acinetobacter* sp. KL-9. The unidentified intermediates were bracketed.

sulfide monooxygenase[19], styrene monooxygenase[29]과 *p*-cymene monooxygenase[10] 등이 있으며, 이러한 특징은 미생물로부터 oxygenase 유전자의 cloning marker로 사용되고 있다[10,11,19]. 그 외 종류가 알려지지 않은 oxygenase를 갖는 많은 미생물로부터 indigo의 생산도 보고되고 있다. 또한 대장균에 cloning된 naphthalene dioxygenase를 이용한 indigo의 대량 생산은 일련의 복잡한 과정을 거치며 환경 오염 물질을 많이 배출하는 화학적 합성을 대체할 가능성을 제시하고 있다[2]. 그리고 indole에 의한 indigo 생성 시 pink 또는 purple 색으로 부과적으로 생성되는 indirubin(indigo red)은 한약제에 존재하는 주요 항암 성분으로 미생물적 생산이 크게 기대되는 대사 산물이다[18].

요 약

Indole 및 그 유도체는 독성을 가지며 난분해성이다. 미생물에 의한 indole 분해 연구를 수행하기 위하여 indole에서 성장하며 청색 색소를 생산하는 균을 분리하였으며, 그 균을 KL-9이라고 명명하였다. KL-9은 여러 생화학적 특성, quinone, 지방산 분석 및 16S-rRNA의 유전자 염기서열 분석 결과 *Acinetobacter* 속으로 동정이 되었다. *Acinetobacter* 속 미생물에 의한 indole 이용균은 보고된 바가 없다. *Acinetobacter* sp. KL-9은 0.5 mg/ml의 indole 농도에서는 성장하지 못하였으며 저 농도의 indole에서는 indigo를 주요 부산물로 생산하였다. Indigo의 생성은 KL-9의 성장 탄소원이 되지 못하는 glucose의 존재 하에서 더욱 증가되었다. 또한, KL-9은 indole을 anthranilate로 전환시키는 분해 경로를 이용하는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2000년도 창원대학교 교내연구비에 의하여 연

구되었으며 염기서열 분석은 1999년 기초과학연구원(KBSI) 연구기자재 공동활용사업에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Beardmore-Gray, M. and C. Anthony. 1986. The oxidation of glucose by *Acinetobacter calcoaceticus*: interaction of the quinoprotein glucose dehydrogenase with the electron transport chain. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1257-1268.
2. Bialy, H. 1997. Biotechnology, bioremediation, and blue genes. *Nature Biotechnol.* **15**: 110.
3. Bundy, B. M., A. L. Campbell, and E. L. Neidle. 1998. Similarities between the *antiABC*-encoded anthranilate dioxygenase and the *benABC*-encoded benzoate dioxygenase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **180**: 4466-4474.
4. Chilton, M. -D., T. C. Currier, S. K. Farrand, A. J. Bendich, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 3672-3676.
5. Cho, M. C., D. -O. Kang, B. D. Yoon, and K. Lee. 2000. Toluene degradation pathway from *Pseudomonas putida* F1: substrate specificity and gene induction by 1-substituted benzenes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 163-170.
6. Claus, G. and H. J. Kutzner. 1983. Degradation of Indole by *Alcaligenes spec. System. Appl. Microbiol.* **4**: 169-180.
7. Denis, F. A., P. A. D'Oultremont, J. J. Debacq, J. M. Chereil, and J. Brisou. 1975. Distribution of ubiquinones (coenzyme Q) in Gram negative bacillae. *C R Seances Soc Biol Fil* **169**: 380-383.
8. Dokter, P., J. E. van Wielink, M. A. van Kleef, and J. A. Duine. 1988. Cytochrome *b*-562 from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D.79.41. Its characteristics and role as electron acceptor for quinoprotein glucose dehydrogenase. *Biochem. J.* **254**: 131-138.
9. Doukyu, N., T. Arai, and R. Aono. 1998. Effects of organic solvents on indigo formation by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 grown with high levels of indole. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1075-1080.
10. Eaton, R. W. and P. J. Chapman. 1995. Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria: chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids. *J. Bacteriol.* **177**: 6983-6988.
11. Ensley, B., D. B. J. Ratzkin, T. D. Ossland, M. J. Simon, L. P. Wackett, and D. T. Gibson. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* **222**: 167.
12. Florin, I., L. Rutberg, M. Curvall, and C. R. Enzell. 1980. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. *Toxicology* **18**: 219-232.
13. Fujioka, M. and H. Wada. 1968. The bacterial oxidation of indole. *Biochem. Biophys. Acta.* **158**: 70-78.
14. Grob, K. and J. A. Voellmin. 1970. GC-MS analysis of the

- semi-volatiles of cigarette smoke. *J. Chromatogr. Sci.* **8**: 218-220.
15. Hammond, A. C., J. R. Carlson, and R. C. Breeze. 1980. Indole toxicity in cattle. *Vet. Rec.* **107**: 344-346.
 16. Han, S. -K., I. -G. Lee, and T. -Y. Ahn. 1998. Bacterial diversity of the Han River as determined by 16S rRNA gene analysis. *Kor. J. Microbiol.* **34**: 194-199.
 17. Hiraishi, A., K. Masamune, and H. Kitamura. 1989. Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 897-901.
 18. Hoessel, R., S. Leclerc, J. A. Endicott, M. E. M. Nobel, A. Lawrie, P. Tunnah, M. Leost, E. Damiens, D. Marie, D. Marko, E. Niederberger, W. Tang, G. Eisenbrand, and L. Meijer. 1997. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1**: 60-67.
 19. Horinouchi, M., K. Kasuga, H. Nojiri, and T. Omori. 1997. Cloning and characterization of gene encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**: 99-105.
 20. Ibrahim, A., P. Gerner-Smidt, and W. Liesack. 1997. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 837-841.
 21. Kamath, A. V. and C. S. Vaidyanathan. 1990. New pathway for the biodegradation of indole in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 275-280.
 22. Keil, H., C. M. Saint, and P. A. Williams. 1987. Gene organization of the first catabolic operon of TOL plasmid pWW53: production of indigo by the *xylA* gene product. *J. Bacteriol.* **169**: 764-770.
 23. Lee, K. 1997. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase produced by *Pseudomonas* and three-dimensional structure of its crystal. *Bioindustry News.* **10**: 16-22.
 24. Maidak, B. L., M. J. McCaughey, R. Overbeek, G. J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy, and C. R. Woese. 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3485-3487.
 25. Matsushita K., E. Shinagawa, O. Adachi, and M. Ameyama. 1989. Quinoprotein D-glucose dehydrogenase of the *Acinetobacter calcoaceticus* respiratory chain: membrane-bound and soluble forms are different molecular species. *Biochemistry* **28**: 6276-6280.
 26. Murray, R. G. E., 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Inc.
 27. Neidle, E. L., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik, and S. Harayama. 1991. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multi-component oxygenases. *J. Bacteriol.* **173**: 5385-5395.
 28. Neidle, E. L. and L. N. Ornston. 1986. Cloning and expression of *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase structural gene *cata* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**: 815-820.
 29. O'Connor, K. E., A. D. Dobson, and S. Hartmans. 1997. Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 4287-91.
 30. Ochiai, M., K. Wakabayashi, T. Sugimura, and M. Nagao. 1986. Mutagenicities of indole and 30 derivatives after nitrite treatment. *Mutat. Res.* **172**: 189-197.
 31. Rainey, F. A., E. Lang, and E. Stackebrandt. 1994. The phylogenetic structure of the genus *Acinetobacter*. *Microbiology Lett.* **124**: 349-354.
 32. Sakamoto, Y., M. Uchida, and K. Ichihara. 1953. The bacterial decomposition of indole. *Medical J. Osaka Univ.* **3**: 477-486.
 33. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 34. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
 35. Zylstra, G. J. and D. T. Gibson. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: nucleotide sequence of the *todCIC2BADE* genes and their expression in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1494-14946.

(Received Jan. 15, 2001/ Accepted Mar. 7, 2001)