

## Rhodococcus sp. RHA1 유래의 Indole Oxygenase의 클로닝 및 발현

강미숙 · 이진호\*  
경성대학교 식품생명공학과

**Cloning and Expression of Indole Oxygenase Gene Derived from *Rhodococcus* sp. RHA1.** Kang, Mi-Suk and Jin-Ho Lee\*. Department of Food Science & Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea – An indole oxygenase originated from *Rhodococcus* sp. RHA1 was cloned into the expression vector, pTrc99A, in *Escherichia coli*, and designated pTCAN1. The pTCAN2 was constructed from pTCAN1 by the deletion of *lacI<sup>q</sup>* for the constitutive expression of indole oxygenase without adding IPTG in the medium. The complete open reading frame of indole oxygenase was 1,224 bp long, which encodes a protein of 407 amino acids. Crude extracts of *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN1 and pTCAN2, respectively, were prepared and subjected to SDS-PAGE analysis. A band corresponding to molecular mass of about 43 kDa was appeared and this result correlated with the predicted molecular mass of cloned indole oxygenase. The *E. coli* harboring pTCAN1 and pTCAN2, respectively, showed blue color colony in LB plate. The pigment showing blue color was prepared from *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN2, and identified as indigo by experiments using spectrophotometer, HPLC, and TLC. The indigo-forming activity of indole oxygenases from the whole cell of *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN1 cultured at LB medium added 1mM of IPTG and that of *E. coli*/pTCAN2 showed about 1.75nmol/min/mg DCW (dry cell weight) and 3.85 nmol/min/mgDCW, respectively. Also, the *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN2 produced about 236  $\mu$ M of indigo after 48 hours incubation in TB medium supplemented with 2.5 mM of tryptophan.

**Key words:** Indole oxygenase, *Rhodococcus*, cloning, indigo

### 서 론

염색에 널리 사용되는 청색 색소인 indigo는 indole을 기질로 사용하여 여러 다양한 형태의 oxygenases 촉매에 의해서 indoxyl로 oxidation된 후 자발적인 반응으로 indoxyl 2 분자의 dimerization에 의해서 indigo가 생합성된다[1, 19]. 이러한 반응에 관여하는 대표적인 효소들은 *Pseudomonas putida* 유래의 naphthalene dioxygenase와 toluene dioxygenase, *Acinetobacter* sp. 유래의 phenol hydroxylase, *Bacillus megaterium* 유래의 변이된 cytochrome P450 monooxygenase, *Burkholderia cepacia* 유래의 toluene monooxygenase 등이 보고 되어있다[2, 3, 5, 6, 11, 14, 16, 19]. 이들은 oxygenase, oxidoreductase, 전자전달 단백질등으로 이루어진 multicomponent system으로 구성된 mono-, di-oxygenase들이다. 일부 FAD-dependent monooxygenase도 indigo를 합성하는 기능이 알려져 있는데, 이는 앞에서 언급한 효소들과는 달리 single component로 구성된 단백질이다 [4]. 한편, metagenome에서 발굴된 uncultured bacterium JEC54, *Rhodococcus* sp. strain T104, *Rhodococcus* strain ATCC21145 유래의 indole oxygenases와 *Bacillus stearo-*

*thermophilus* 유래의 phenol hydroxylase는 single component로서 indigo 생성 효소활성을 나타내며, multicomponent oxygenase system과 FAD-dependent monooxygenase와는 단백질 상동성이 거의 없는 부류에 속하는 효소들로 밝혀져 있다[8, 9, 10, 12, 15].

*Rhodococcus*는 특히 hydrophobic xenobiotics와 같은 특이한 광범위한 범위의 유기화합물을 분해할 수 있는 Gram (+), 호기성 토양미생물이다. *Rhodococcus* sp. RHA1(현재 *R. jostii*라 명명)는 환경오염물질인 polychlorinated biphenyls를 분해할 수 있는 특수한 미생물로 최근 그 유전체의 전체염기서열이 밝혀졌다[17, 21]. 그 중에는 일부 *Rhodococcus* genus에서 실험적으로 그 기능이 확인된 기존의 효소와는 낮은 단백질 identity(25~30%)를 갖는 indole oxygenase로 추정되는 유전자가 확인이 되었다.

본 연구는 *Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 indole oxygenase로 추정되는 유전자를 cloning하고 그 효소의 기능을 규명하여, 향후 보다 더 실용적으로 indigo 생산 생물공정을 확립하기 위한 기초를 마련하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주와 플라스미드

*Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 미확인 indole oxygenase

\*Corresponding author  
Tel: 82-51-633-4716, Fax: 82-51-622-4986  
E-mail: jhlee83@ks.ac.kr

유전자를 함유하고 있는 *Escherichia coli* RF0011 FOZ를 캐나다의 British Columbia 대학의 Lindsay D. Eltis 교수로부터 분양받아 사용하였다. 형질전환 및 발현숙주로는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. 유전자 클로닝 및 발현목적으로 플라스미드 pTrc99A(Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)를 사용하였다.

#### Indole oxygenase 유전자의 클로닝, 발현 및 상동성 분석

*Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 미확인 indole oxygenase 유전자를 클로닝하기 위해 GenBank에 등록되어 있는 염기서열(YP\_709118, NC008271)을 바탕으로 primer를 제작하였다. Forward primer의 5' 말단에는 *Nco*I, reverse primer의 5' 말단에는 *Hind*III 제한효소 인식서열을 삽입하였다 (forward primer: ATCTTCCATGGCTCAGACGCTCGAACCCA, reverse primer: ATCATAAGCTTATACATCCATCGTGAGTG). Pfu-X polymerase(Solgent)를 이용하여 *E. coli* RF0011-FOZ에서 정제한 plasmid를 주형 DNA로 사용하여 95°C 20초, 57°C 40초, 72°C 40초의 조건으로 30 cycle의 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. 획득한 indole oxygenase 유전자 단편과 클로닝 벡터 pTrc99A를 각각 *Nco*I 및 *Hind*III 제한효소로 이중절단하고 ligation하여 재조합 plasmid를 제조하였다. 재조합 plasmid를 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환하여 ampicillin이 첨가된 LB agar plate로부터 형질전환체를 선별하였다. 제한효소절단 및 DNA 염기서열을 확인하여 형질전환체내의 vector 내에 미확인 indole oxygenase 유전자 단편이 삽입되었음을 확인하였다. 한편, 제작된 재조합벡터내의 유전자를 항상 발현시키기 위해서 forward primer(CG GGGTACCTTTTTGCGCCGACATCATAA) 및 reverse primer(CG GGGTACCTAAGGAGAAATACCGCATCAGG)를 사용하여 PCR을 수행한 후 *Kpn*I 제한효소로 절단, 정제 및 self ligation하여 *lacI*<sup>q</sup>가 제거되어 IPTG의 첨가 없이도 indole oxygenase가 항상 발현되는 재조합 plasmid를 제작하였다. 각 과정에서 PCR후 유전자의 서열은 제노텍(주)에 의뢰하여 염기서열분석을 통해 확인하였다. 단백질 발현을 확인하는 과정은 세포배양액 30 mL을 K-Pi Buffer(pH 7.4)로 2회 세척한 후 다시 완충액 5 mL을 첨가한 다음 초음파분쇄기(pulse on 1 sec, pulse off 8 sec, 10 min간)를 사용하여 세포를 파쇄하였다. 4°C, 14000 rpm에서 30분간 원심분리하여 그 상등액을 취하여 Bradford 시약으로 단백질을 정량한 다음 10~30  $\mu$ g의 단백질을 가지고 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하여 단백질 발현을 확인하였다[20]. 단백질의 상동성은 NCBI의 BLAST program을 이용하여 분석하였다.

#### 인디고 확인 및 정량방법

세포배양액에서 생산되는 청색 색소가 indigo임을 확인하기 위해 spectrophotometer를 이용하는 방법, HPLC(high

performance chromatography)법, TLC(thin layer chromatography)법을 이용하였다. *E. coli*pTCAN2을 사용하여 LB 배지에서 밤새 배양한 액을 13,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 후 침전물에 *N,N*-dimethylformamide(DMF)를 첨가하여 침전된 청색색소를 녹인 다음 원심 분리하여 상등액을 취하여 spectrophotometer(HITACHI, U-3010)를 이용하여 400~700 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, Sigma에서 구입한 indigo 시약(50  $\mu$ M)을 DMF에 녹인 표준액을 이용하여 흡광도를 측정하여 비교 분석하였다. HPLC에 의한 분석법(Agilent 1200 HPLC system)의 경우, 청색 색소를 함유한 배양액을 원심분리 및 2회 증류수로 세척한 후 DMF 용매에 녹인 상등액을 초음파 파쇄법으로 분쇄한 다음 PTCKERING column(5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm)을 사용하여 70% methanol 용매로 0.8 mL/min의 유속으로 용출하면서 600 nm에서 측정하여 표준 indigo와 비교하여 그 양을 측정하였다. TLC법의 경우, 0.05% tryptophan을 함유한 LB배지에서 밤새 배양한 배양액 1 mL을 원심 분리한 후 침전물을 2회 증류수로 세척 및 원심분리 후 침전물에 dimethylsulfoxide(DMSO) 200  $\mu$ L를 첨가하여 현탁 시킨 용액과 표준 indigo 용액을 각각 0.2 mm 두께의 silica gel TLC plate(Merck, Germany)를 이용하여 Toluene:Acetone:Choloroform = 2:1:1 용액으로 전개하여 비교하였다.

#### 인디고 생산촉매 효소활성 측정방법

유도발현 재조합 plasmid인 pTCAN1을 함유한 대장균에서 indole oxygenase를 발현할 경우, colony 1개를 37°C에서 ampicillin이 첨가된 LB 배지(LBap, 3 mL)에서 밤새 배양한 후, 2%를 새로운 30 mL의 LBap 배지에 접종한 다음 OD 0.7~0.8 정도되면 IPTG를 1 mM 첨가하여 청색 indigo 화합물이 생성되기 시작하는 시점까지 배양하였다. 항상 발현 재조합 plasmid pTCAN2를 함유한 대장균에서 indole oxygenase를 발현할 경우, colony 1개를 37°C에서 LBap(3 mL)에서 밤새 배양한 후, 2%를 새로운 30 mL의 LBap 배지에 접종한 다음 청색 indigo 화합물이 생성되기 시작하는 시점까지 배양하였다. 세포배양액 30 mL 모두를 각각 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 3차 증류수로 세척하면서 침전된 indigo 색소를 최대한 많이 제거하였다. 이러한 세척과정을 3회 반복하면서 indigo 색소가 거의 완전히 제거된 세포 침전물에 5배 희석된 LB배지를 8 mL 첨가하였다. 먼저 1.5 mL tube에 0.1 M indole 2  $\mu$ L와 LB배지 80  $\mu$ L를 함유한 0.1 M K-Pi buffer(pH 7.4)를 400  $\mu$ L를 첨가한 다음 10분간 37°C에서 예열시킨 후, 세척된 세포현탁액 100  $\mu$ L를 첨가하여 37°C shaking incubator에서 호기적인 조건에서 반응을 진행하였다. Indole oxygenase 효소를 함유한 세포의 indigo 색소 형성능력을 측정하기 위해서 시간 별로 각각의 tube를 꺼내서 원심분리 한 다음 침전물에 DMF를 1.5 mL 첨가하여 녹인 후 다시 원심분리한 다음 그 상등

액을 취하여 610 nm에서 흡광도를 측정하여 indigo 생성량을 정량하였다. Indole로부터 indigo 색소를 만드는 세포의 활성도는 37°C에서 반응 시작 후 30분에서 1시간 사이의 구간에서, 1분간 1 nmol의 indigo 형성을 촉매하는 건조세포중량(dry cell weight)으로 정의하였다. 본 실험은 각 sample당 3회 반복, 동일한 실험을 총 5회 반복하여 그 평균치를 표시하였다.

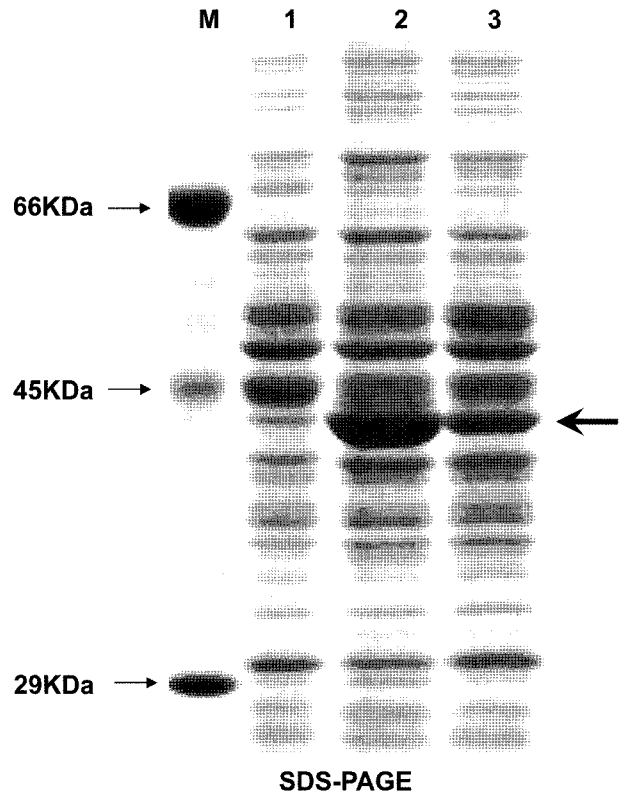
**인디고 생산 배지 및 배양**

재조합 대장균에서 indigo가 생성되는 양을 측정하기 위해서 37°C, 호기적인 조건에서 LB(Luria-Bertani) 배지, TB(Terrific Broth) 배지, M9최소배지[20]를 각각 사용하여 위의 효소활성도 측정법에서 기술한 내용과 같이 세포를 배양하면서 48시간까지 세포를 배양하면서 sample을 중간에 취하여 원심분리 및 2회 세척 후 적절히 희석하여 DMF에 녹인 다음 그 상등액을 이용하여 HPLC법으로 indigo 농도를 정량하였다[18]. 트립토판을 첨가할 경우, 배양시간 15시간 후에 2.5 mM을 첨가하였다.

**결과 및 고찰**

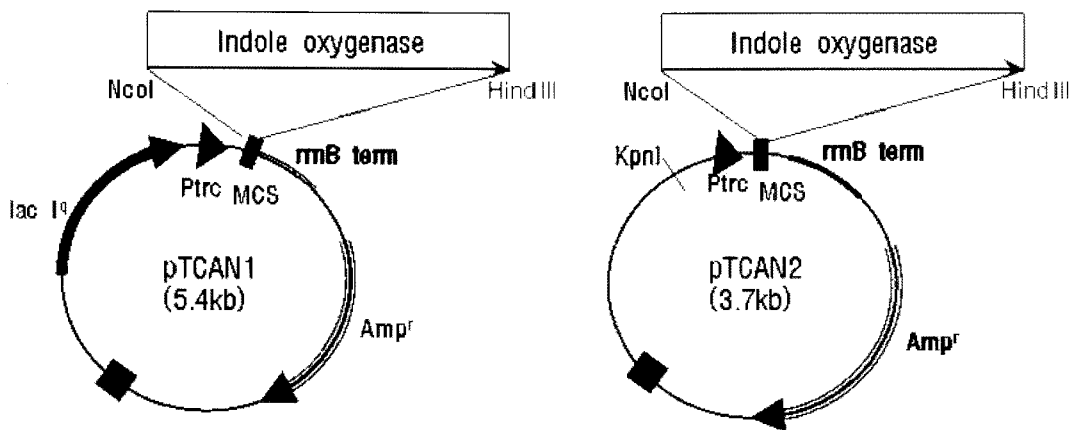
**Indole oxygenase 유전자의 클로닝 및 발현**

*Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 미확인 indole oxygenase 유전자를 함유한 plasmid RF0011FOZ를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 얻은 1.2 kb DNA 단편과 발현벡터 pTrc99A를 제한효소 *Nco*I과 *Hind*III로 이중 절단한 후 ligation 하여 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환하여 청색을 나타내는 colony를 선별한 후 제한효소 절단 및 DNA 염기서열을 확인하여 미확인 indole oxygenase를 함유하고 있는 재조합 plasmid pTCAN1을 제작하였다. 유전자의 open reading frame은 1,224 bp로 구성되어 있으며, 단백질은 407개의 아미노산으로 이루어져 있었다. 한편, pTCAN1에서 *lacI<sup>q</sup>*가 제거되어 IPTG의 첨가 없이도 indole oxygenase가 항상 발현



**Fig. 2. Expression of indole oxygenase in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Proteins were separated by 10% SDS-PAGE. The bold arrow indicates the protein bands corresponding to the cloned indole oxygenase. Lanes: 1, DH5 $\alpha$ /pTrc99A; 2, DH5 $\alpha$ /pTCAN1; 3, DH5 $\alpha$ /pTCAN2; M, molecular size marker.**

되는 재조합 plasmid를 제작하여 pTCAN2라 명명하였으며, 재조합 plasmid pTCAN1과 pTCAN2의 구조는 Fig. 1에 표시하였다. *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN1과 pTCAN2의 단백질 추출액을 이용하여 SDS-PAGE를 분석한 결과, Fig. 2에서 보는 것과 같이 45kDa 아래에 위치한 indole oxygenase로 추정되는 단백질이 잘 발현되는 것을 확인하였으며, 이 결과는 이론적으로 추정되는 indole oxygenase의 분자량 44 kD

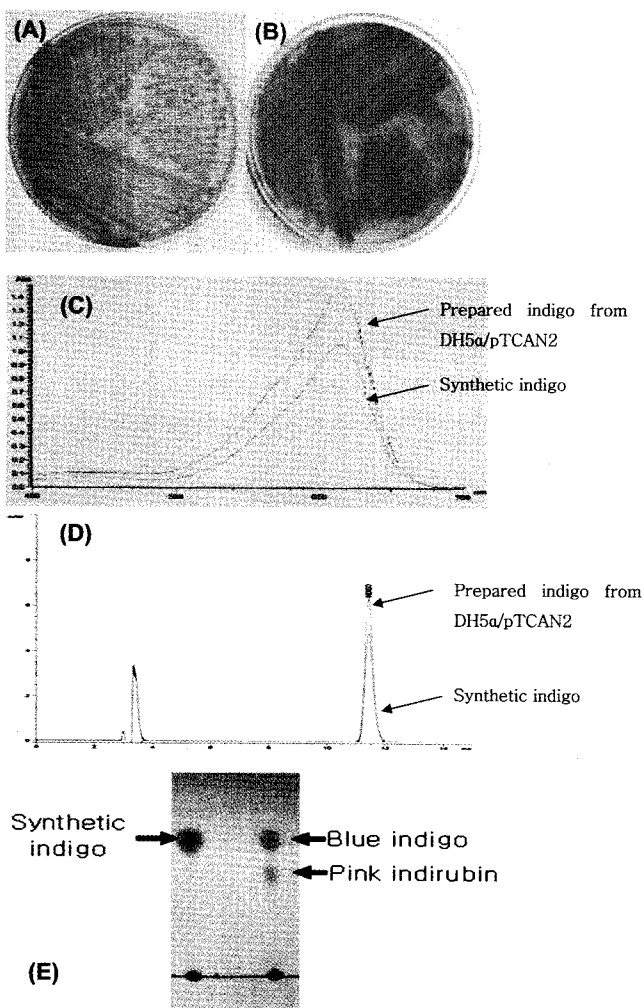


**Fig. 1. Schematic representation of recombinant plasmids. pTrc99A was used for cloning and expression of indole oxygenase of *Rhodococcus* sp. RHA1.**

과 잘 일치함을 알 수 있었다.

### 인디고 색소의 확인

LB한천 평판배지에서 균락의 색깔을 비교해보면, *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN2(Fig. 3B)는 대조군인 *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTrc99A(Fig. 3A)와는 다른 청색의 균락을 형성하였다. 이 재조합 균주를 LB 액체배지에서 배양 후 추출/정제된 청색색소와 Sigma사에서 구입한 합성 indigo를 표준품으로 하여 각각 DMF 용매에 녹인 다음 분광광도계를 이용하여 400~700 nm 까지 scan한 결과, 두 sample 모두 610~611 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 scanning profile이 동일한 형태임을 확인하였다(Fig. 3C). 동일한 2가지 sample을 HPLC에 주입하여 분석한 결과, 두 sample 모두 체류시간 12분대에 main peak을 보여주었다(Fig. 3D). 또한, 청색색소를 고농도로 농

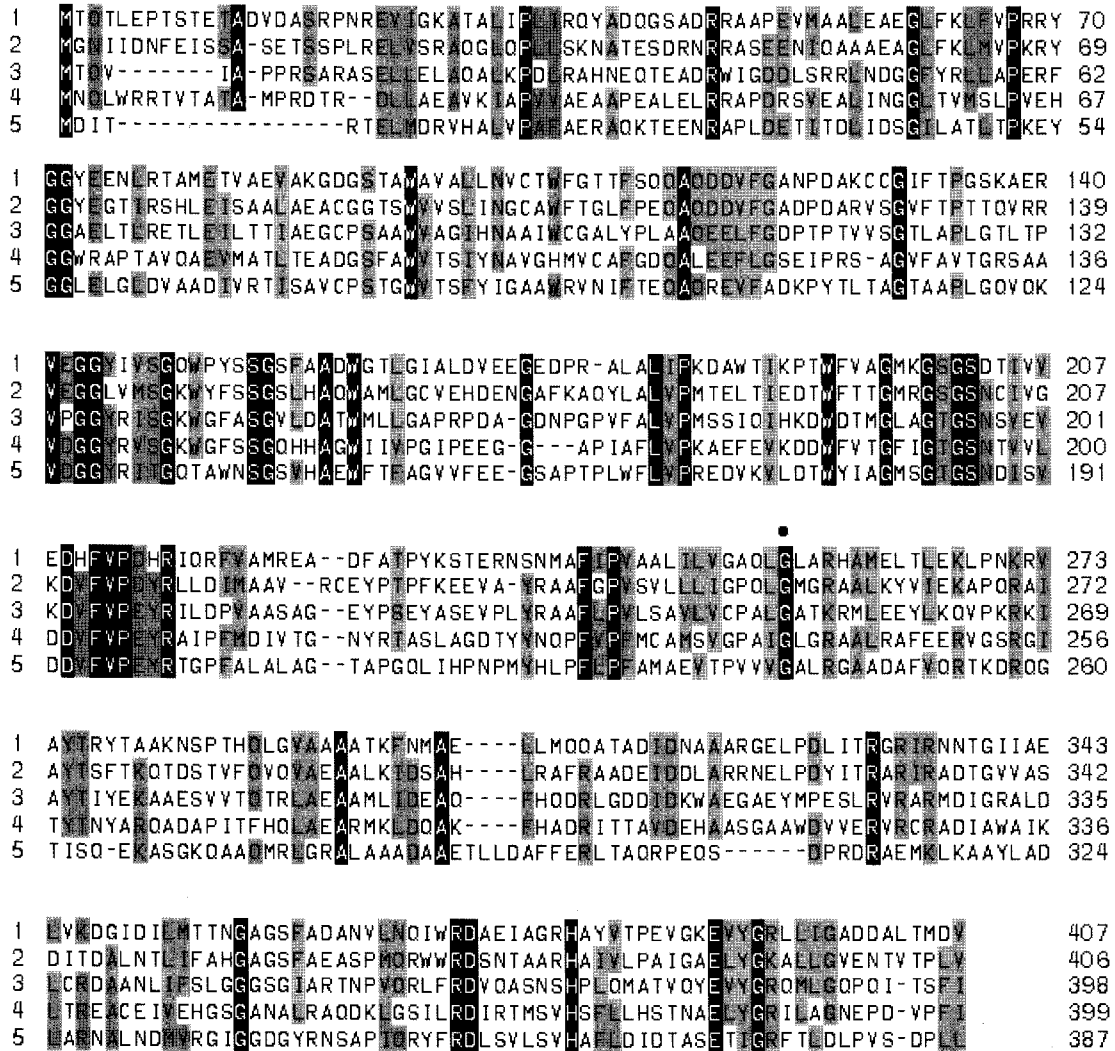


**Fig. 3. Analysis of blue pigment.** (A) Agar plate of *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTrc99A. (B) Agar plate of *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN2. (C) Absorbance profile of blue pigment and synthetic indigo between 400 nm and 700 nm. (D) HPLC elution profile of blue pigment and synthetic indigo. (E) Thin layer chromatography of bacterial blue pigment and synthetic indigo dissolved in DMSO solvent.

축한 추출물을 이용하여 TLC로 분석한 결과, Fig. 3E와 같이 합성된 표준품 indigo와 같은 위치에서 청색을 나타내는 spot을 확인하였다. 이러한 결과는, 재조합 대장균에서 생산된 청색색소는 indigo임을 보여주며, *Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 미확인 indole oxygenase는 기능적으로 활성을 갖는 indole을 산화하여 indigo를 생성하는 효소임을 나타내는 것이다. 한편, TLC상에서 청색 indigo 뿐만 아니라 pink색의 indirubin으로 추정되는 색소를 생성하는 것으로 확인이 되었으며, 이는 본 연구에서 cloning한 indole oxygenase가 indole을 기질로 하여 product로 indigo 뿐만 아니라 indirubin을 생성할 수 있음을 보여주었다.

### 단백질 상동성 분석

*Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 indole oxygenase와 상동성을 갖는 단백질을 탐색하기 위해 BLAST 프로그램을 이용하여 GenBank database를 비교 분석한 결과, 실험적으로 확인된 uncultured bacterium JEC54의 indole oxygenase (AAY54299)와 가장 높은 상동성을 나타내었다(44% identity 및 64% similarity)[15]. 그 외에 실험적으로 미확인된 *Rhodococcus opacus* B4(YP\_002782537, 45% identity, 62% similarity), *Renibacterium salmoninarum* ATCC 33209(YP\_001623775, 44% identity, 60% similarity) 유래의 putative oxidoreductase 및 *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672 (ZP\_04691100, 34% identity, 54% similarity), *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338(YP\_001105703, 32% identity, 53% similarity), *Streptosporangium roseum* DSM 43021(ZP\_04475636, 33% identity, 51% similarity) 유래의 acyl-CoA dehydrogenase와 높은 상동성을 보여주었다. 그러나, 실험적으로 확인된 *Methylophaga* sp. 유래의 flavin-containing monooxygenase(AF494423), *Burkholderia cepacia* G4 유래의 toluene *ortho*-monooxygenase(AF349675), *Streptomyces venezuelae* 유래의 cytochrome P450 monooxygenase(AAC68886), *Pseudomonas putida* 유래의 naphthalene dioxygenase(NP\_863072) 등과는 상동성이 매우 낮으므로 확인이 되었다[4, 6, 13, 19]. 한편, 본 연구에 사용된 *Rhodococcus*와 같은 genus에 속하는 실험적으로 증명된 또는 추정되는 indole oxygenase로는 *Rhodococcus* sp. strain T104(AY575969), *R. opacus*(CAA06672) 및 *Rhodococcus* strain ATCC 21145(M55641) 유래의 효소가 알려져 있는데, 이들과의 identity/similarity는 비교적 낮았다(각각, 30%/48%, 29%/49%, 25%/47%)[8, 12]. Fig. 4는 본 실험의 indole oxygenase와 uncultured bacterium JEC54, *Rhodococcus* sp. strain T104, *R. opacus* 및 *Rhodococcus* strain ATCC 21145 유래의 indole oxygenases와의 상동성을 비교하여 정렬하였다. FAD-dependent monooxygenase의 특징적인 서열인 FAD binding domain(GXGXXG), NADPH binding domain(GXGXX(A/G)), 그리고 FMO-identifying sequence



**Fig. 4.** Alignment of the indole oxygenase from *Rhodococcus* sp. RHA1 with the indole oxygenases from different microorganisms. Sources of sequence are as follows: 1, *Rhodococcus* sp. RHA1; 2, uncultured bacterium JEC54; 3, *Rhodococcus* sp. strain T104; 4, *Rhodococcus opacus*; 5, *Rhodococcus* strain ATCC 21145. The identical and similar residues in all of the proteins are shown as white letters on a dark background and black letters on a gray background, respectively. The symbol ● indicates the functionally important amino acid residues in *Rhodococcus* sp. strain T104.

motif(FXGXXXHXXX(Y/F))은 확인되지 않았으며[4, 7], P450 monooxygenase와 상동성이 있는 conserved region도 보이지 않았다[6, 13]. 특이적인 것은 *Rhodococcus* sp. strain T104 유래의 *ipoA*를 이용하여 기능적으로 중요한 아미노산을 확인한 실험에 의하면, 58번째 아미노산인 alanine, 59번째 proline, 251번째 glycine의 변이에 의해서 효소의 기능을 잃는 변이를 얻었으며, 특히 59번 P 및 251번 G가 기능적으로 매우 중요하며, 또한 58번의 A가 V, D, F, I, K, N, P, R, W, Y으로의 변이에 의해서 효소의 indigo 생성기능이 소실되며, A를 S, G, M, C, H, L, E, Q, T로의 변이에 의해서는 indigo 생성활성이 변화되는 것으로 보고를 하였다[12]. 본 연구의 효소의 경우, 이에 상응하는 아미노산 서열 중에서 66번 위치의 P, 255번 G는 잘 보존되어 있지만, 58번 A에 해당하는 위치인 65번에 위에서 언급된 효소

의 활성을 상실하는 V가 존재하며, 또 다른 indole oxygenase 활성을 갖는 uncultured bacterium JEC54에서도 V가 존재하고 있다. 한편 *R. opacus* 및 *Rhodococcus* strain ATCC 21145의 경우 각각 indigo 생성활성이 약간 저하되는 L 및 T가 존재한다. 이는 효소원에 따라 A→V 변이가 효소의 기능에 크게 영향을 나타내는 경우와 그렇지 않은 경우가 존재하는 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구자가 확인한 *Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 indole oxygenase의 65번째 V를 다시 A또는 다른 아미노산으로의 변이 및 효소활성 확인실험을 통해서 그 아미노산의 기능적인 역할을 재확인을 하여야 할 것으로 생각된다.

**인디고생성 재조합 대장균 활성도**

Indole oxygenase 유전자를 함유한 재조합 대장균 농축액

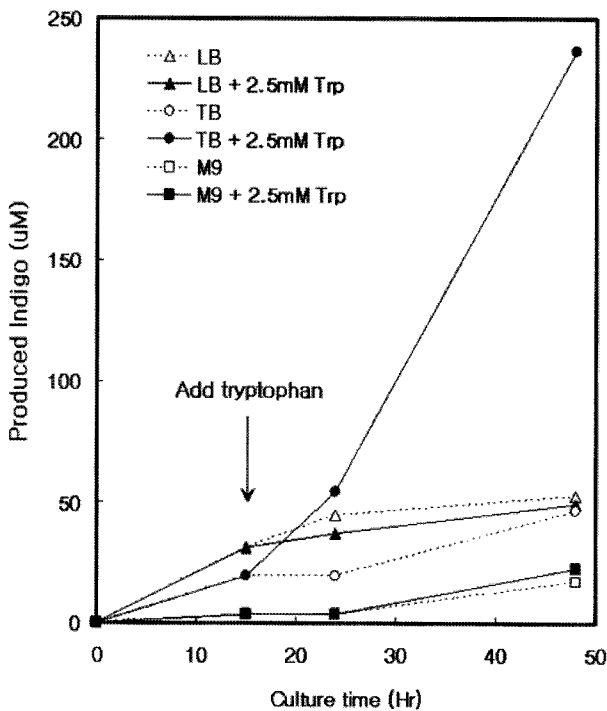
**Table 1. Indigo-forming activity of the recombinant strains.**

Strain/plasmid	Indigo-forming Activity (nmol/min/mgDCW)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pTrc99a	-
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pTCAN1	1.75 $\pm$ 0.54
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pTCAN2	3.85 $\pm$ 0.60

을 이용하여 indole을 기질로 사용하여 indigo 생성 효소활성도를 간접적으로 측정된 결과, IPTG를 이용하여 발현시킨 *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN1의 경우 약 1.75 nmol/min/mgDCW, IPTG를 첨가하지 않고 배양시킨 *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN2의 경우 약 3.85 nmol/min/mgDCW의 활성을 갖는 것으로 확인되었다(Table 1). 이는 styrene monooxygenase를 발현시킨 *Pseudomonas putida* 재조합미생물에서 측정된 활성도 4.2~12.1 nmol/min/mgDCW 보다 최대 약 3배 낮은 활성을 보여주었다[18]. 따라서, 향후 효소개량을 통한 효소활성도의 향상이 필요한 것으로 사료된다.

#### 인디고의 생산

*E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN2를 이용하여 LB, TB 및 M9배지에서 트립토판 첨가유무에 따른 indigo 생산량을 측정된 결과, LB배지의 경우 트립토판 첨가유무에 큰 차이 없이 48시간 배양 후 약 50  $\mu$ M의 indigo가 측정되었으며, TB배지의 경우 15시간 배양 후 트립토판을 첨가하면 무첨가보다 약 5



**Fig. 5. Production of indigo in *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTCAN2.** Recombinant strain was cultured in LB, TB, or M9 medium for 48 hrs at 37°C. Indigo concentration was determined by HPLC analysis.

배 높은 약 236  $\mu$ M의 인디고가 생산되었으며, 최소배지인 M9배지의 경우, 트립토판의 첨가유무에 차이 없이 약 17~23  $\mu$ M의 indigo가 생성되었다(Fig. 5). 이는 TB배지의 경우 LB배지 및 M9최소배지보다 복합영양성분이 많아 단위부피당 세포가 많이 자라서 indole oxygenase 효소활성이 높아져서, 트립토판을 첨가한 TB배지에서 특히 indigo가 많이 축적되는 것으로 생각된다.

#### 요 약

indigo는 염색산업에서 매우 중요한 색소로, 현재는 고가의 식물에서 추출된 indigo 대신에 합성 indigo가 주로 사용된다. 최근 미생물을 이용한 생물학적 방법으로 indigo를 생산하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있으며, 여러 미생물 원으로부터 다양한 형태의 indole oxygenase를 탐색, 특성의 규명, 효소의 특성 개량, indigo 생산등의 연구가 진행되고 있다. 본 연구는 *Rhodococcus* sp. RHA1 유래의 indole oxygenase로 추정되는 유전자를 클로닝하여 대장균에서 발현시킨 결과, 청색 색소가 축적되었으며, 분광광도계, HPLC 및 TLC분석을 통해서 그 청색 색소가 indigo임을 확인하였으며, 또한 전세포를 이용하여 indole 첨가시 indigo가 생성됨을 측정하여, 본 연구의 효소가 indole을 indigo로 전환을 촉매하는 indole oxygenase임을 확인하였고, 트립토판을 첨가한 TB배지에서 약 236  $\mu$ M의 인디고가 생산됨을 알았다. 본 연구를 통해 조사된 특성 이외에 효소 활성의 개량, 적절한 생산용 균주의 선정, 경제적이며 안정적인 대량 발현, 배지 및 배양 공정의 최적화 과정등을 거칠 경우, 보다 더 실용적인 indigo 생산 생물공정의 확립이 가능할 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

본 논문은 2009학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었습니다. 또한, 미생물을 분양해 주신 캐나다 British Columbia 대학의 Lindsay D. Eltis 교수께 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Berry, A., TC. Dodge, M. Pepsin, and W. Weyler. 2002. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *J. Indust. Microbiol. Biotech.* **28**: 127-133.
- Canada, K. A., S. Iwashita, H. Shim, and T. K. Wood. 2002. Directed evolution of toluene *ortho*-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation. *J. Bacteriol.* **184**: 344-349.
- Cafaro, V., V. Izzo, R. Scognamiglio, E. Notomista, P.

- Capasso, A. Casbarra, P. Pucci, and A. D. Donato. 2004. Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2211-2219.
4. Choi, H. S., J. K. Kim, E. H. Cho, Y. C. Kim, J. I. Kim, and S. W. Kim. 2003. A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **306**: 930-936.
  5. Doukyu, N., K. Toyoda, and R. Aono. 2003. Indigo production by *Escherichia coli* carrying the phenol hydroxylase gene from *Acinetobacter* sp. strain ST-550 in a water-organic solvent two-phase system. *Appl Microbiol Biotechnol.* **60**: 720-725.
  6. Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, 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**: 167-169.
  7. Fraaije, M. W., N. M. Kamerbeek, W. J. H. Berkel, and D. B. Janssen. 2002. Identification of a Baeyer-Viliger monooxygenase sequence motif. *FEBS Letters* **518**: 43-47.
  8. Hart, S., R. Kirby, and D. R. Woods. 1990. Structure of a *Rhodococcus* gene encoding pigment production in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1357-1363.
  9. Kim, I. C. and P. J. Oriol. 1995. Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 phenol hydroxylase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1252-1256.
  10. Kim, I. C., H. C. Chang, and P. J. Oriol. 1997. Production of indigo and indirubin by *Escherichia coli* containing a phenol hydroxylase gene of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 197-199.
  11. Kim, J. Y., K. Lee, Y. Kim, C. K. Kim, and K. Lee. 2003. Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 343-348.
  12. Kwon, N. R., J. C. Chae, K. Y. Choi, M. Yoo, G. J. Zylstra, Y. M. Kim, B. S. Kang, and E. Kim. 2008. Identification of functionally important amino acids in a novel indigo-producing oxygenase from *Rhodococcus* sp. strain T104. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**: 417-422.
  13. Lee, S. K., J. W. Park, S. R. Park, J. S. Ahn, C. Y. Choi, and Y. J. Yoon. 2006. Hydroxylation of indole by PikC cytochrome P450 from *Streptomyces venezuelae* and engineering its catalytic activity by site-directed mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 974-978.
  14. Li, Q. S., U. Schwaneberg, P. Fischer, and R. D. Schmid. 2000. Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chem. Eur. J.* **6**: 1531-1636.
  15. Lim, H., K., E. J. Chung, J. C. Kim, G. J. Choi, K. S. Jang, Y. R. Chung, K. Y. Cho, and S. W. Lee. 2005. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7768-7777
  16. McClay, K., C. Boss, I. Keresztes, and R. J. Steffan. 2005. Mutations of toluene-4-monooxygenase that alter regioselectivity of indole oxidation and lead to production of novel indigoid pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5476-5483.
  17. McLeod, M. P., R. L. Warren, W. W. Hsiao, N. Araki, M. Myhre, C. Fernandes, D. Miyazawa, W. Wong, A. L. Lillquist, et al. 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 15582-15587
  18. O'connor, K. E., A. D. W. Dobson, and S. Hartmans. 1997. Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 4287-4291.
  19. Rui, L., K. F. Reardon, and T. K. Wood. 2005. Protein engineering of toluene *ortho*-monooxygenase of *Burkholderia cepacia* G4 for regioselective hydroxylation of indole to form various indigoid compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 422-429.
  20. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  21. Warren, R., W. W. Hsiao, H. Kudo, M. Myhre, M. Dosanjh, A. Petrescu, H. Kobayashi, S. Shimizu, K. Miyauchi, et al. 2004. Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated-biphenyl-degrading *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Bacteriol.* **186**: 7783-7795.

(Received July 24, 2009/Accepted Sep. 10, 2009)