

## *Agrobacterium tumefaciens* 유래 인디칸 분해활성을 갖는 $\beta$ -glucosidase의 분리와 특성분석

황창선, 이진영, 김근중\*

### Purification and Characterization of an Indican-hydrolyzing $\beta$ -glucosidase from *Agrobacterium tumefaciens*

Chang-Sun Hwang, Jin-Young Lee, and Geun-Joong Kim\*

접수: 2012년 12월 5일 / 게재승인: 2012년 12월 24일  
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Indican (indoxyl- $\beta$ -D-glucoside) is a colorless natural compound and can be used as a precursor for the production of indigo. This production step only require an enzyme,  $\beta$ -glucosidase, that readily screened from microbial resource by using selective media supplemented with indican as a sole carbon source. *Agrobacterium tumefaciens* was well grown in this media and thus presumed to produce a related enzyme. The corresponding gene, encoding a protein with a calculated molecular mass of 51 kDa, was cloned and overexpressed as MBP fusion proteins. The purified enzyme was determined to be a dimer and showed the maximum activity for indican at pH 7.0 and 40°C. The kinetic parameters for indican, Km and Vmax, were determined to be 1.4 mM and 373.8  $\mu$ M/min/mg, respectively. The conversion yield of indican into indigo using this enzyme was about 1.7-1.8 folds higher than that of previously isolated enzyme from *Sinorhizobium meliloti*. Additionally, this enzyme was able to hydrolyze various  $\beta$ -1,4 glycoside substrates.

**Keywords:** Indican, Glucosidase, Purification, *Agrobacterium*, Indigo

#### 1. 서론

진핵세포는 물론, 효모에서 곰팡이까지 다양한 미생물에 존재하는  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase; EC 3.2.1.21)는 이당체 또는 배당체의  $\beta$ -1,4 glycosidic bond를 가수분해하여 glucose를 생성하는 중요한 효소이다 [1]. 이와 같은 활성으로 에너지원 (포도당)을 얻는 특성으로 인해 동물, 식물, 박테리아의 세포생리를 측정하는데 중요한 지표 효소로 알려져 있다. 실용용의 관점에서도 다양한 기질 특이성을 지닌  $\beta$ -glucosidase가 발굴되어 여러 분야에서 활용되고 있다. 특히 당화과정이 중요한 바이오에너지 생산공정에 반드시 필요한 효소로 알려져 있다 [2-4]. 최근에는 쪽 식물에 흔히 존재하는 배당체인 인디칸에 높은 활성을 지닌  $\beta$ -glucosidase가 발굴되었으며 [5], 이를 이용하면 단일 공정으로 순도와 생산성이 높은 천연 인디고의 생산이 가능한 것으로 보고되었다 [6].

배당체의 한 종류인 인디칸은 옅은 노란 빛의 화합물로 인디고 식물 (쪽이나 대청)들에서 흔히 발견되는 천연물이다. 쪽 잎에는 약 12-25 g/kg의 인디칸이 포함되어 있는 것으로 보고되고 있으며 [7], 동남아나 유럽에서 천연 발효 과정을 통해 인디고 생산에 흔히 이용되고 있다. 천연 발효 과정에서는 인디칸이  $\beta$ -glucosidase에 의해 가수분해되어 glucose와 인독실이 각각 한 분자씩 생성되며, 두 분자의 인독실이 자발적인 dimerization을 통해 인디고가 된다 [8-10]. 이러한 과정에서 자연 산화 혹은 효소 작용에 의해 부산물로 인디루빈이 일부 생성되는 것으로 알려져 있다. 생성된 glucose는 발효 균주의 에너지원으로 사용되어 환원력을 제공하는 수단이 되기도 한다. 따라서 천연발효 과정에 이용되는  $\beta$ -

전남대학교 자연과학대학 생물학과  
Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences,  
Chonnam National University, Yong-Bong Dong, Buk-Gu, Gwangju  
500-757, Republic of Korea  
Tel: +82-62-530-3403, Fax: +82-62-530-3409  
e-mail: gjkim@chonnam.ac.kr

glucosidase와 유사한 기질특이성을 지니며 높은 활성을 지닌 효소원을 발굴하여 인디칸과 반응을 유도하면, 단일공정으로 높은 순도를 지닌 천연 인디고를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있다 [5]. 이러한 공정은 최근에 *Sinorhizobium meliloti* 유래  $\beta$ -glucosidase (Smglu)를 발굴하여 인디칸에 적용함으로써 가능성을 인정받고 있다 [6]. 효소 전환법에 의한 인디고 생산은 기존의 전형적인 화학합성 공정이 지닌 단점, 즉 복잡한 공정이거나 환경 오염물의 생성과 같은 문제를 해결함은 물론, 인 (생)체 적용 시 불순물로 인한 알려지나 면역 반응 유발과 같은 부작용을 줄일 수 있는 장점이 있다. 인디고류는 염료나 염액으로 주로 사용되나, 화장품이나 식품 첨가제는 물론 항균활성 물질의 원료로도 이용되기 때문이다 [11,12]. 또한 다양한 유도체 제작을 통해 치료 목적의 의약품 개발에도 전구체로 연구되고 있어 [13], 생물공정에 의한 생산 방법이 유리한 것으로 알려져 있다. 이러한 점에서 인돌이나 트립토판을 전구체로 이용해 전세포를 이용하는 생물전환 혹은 발효법이 여전히 주목 받고 있으나, 산화효소의 기질특이성과 세포독성에 따른 전환율의 한계는 극복해야 하는 난제임이 일반적으로 알려져 있다.

상기 문제를 극복할 수 있는 방법으로  $\beta$ -glucosidase와 식물 유래 인디칸을 이용한 단일공정이 제안되었고, 다양한 미생물이 이러한 특성을 지닌 효소원을 지니고 있음이 보고되었다 [5]. 기 발굴된 효소 Smglu의 실적용을 위한 예비실험 과정에서, 비용 절감과 높은 전환율을 보장받기 위해서는 좀 더 높은 수준의 활성과 안정성을 지닌 효소로의 개량이 필요함이 확인되었다 [6]. 이를 가장 효과적으로 달성하기 위한 접근법으로는 단백질 공학법에 의한 개량, 특히 다양한 유전자원의 family shuffling 이 유리한 것으로 알려져 있다 [14-16]. 본 연구에서는 이를 위한 자원으로 *Agrobacterium tumefaciens*로부터 인디칸에 높은 활성을 지닌  $\beta$ -glucosidase (Atglu)를 추가로 발굴하여, Smglu와의 비교 연구를 통해 이러한 가능성을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 사용 시약, 균주 및 배양 조건

실험에 사용된 인디칸, X-gal, 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (MUG), cellobiose, maltose, sucrose, gentibiose, p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, lactose, salicin과 arbutin은 Sigma (USA)로부터 구입하여 사용하였다. *A. tumefaciens* ATCC33970 (C58) 균주는 분양기관 (MICROBANK)에서 구입하여 사용하였고, *Escherichia coli* XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA46 thi-1 hsdR17 relA1 lac F' [proAB lacIqZM15 Tn10(Tetr)c])를 이용하여  $\beta$ -glucosidase의 cloning과 발현 숙주로 사용하였다. Plasmid는 pMAL-c2x (New England Biolabs)를 사용하였고, 재조합 균주는 ampicillin (50  $\mu$ g/mL)이 포함된 LB 배지 (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)에서 37°C, 200 rpm 조건으로 배양하였다.

### 2.2. 유전자의 증폭, cloning 및 아미노산 서열비교

*A. tumefaciens*의 genomic DNA는 kit (promega genomic DNA isolation kit)을 이용하여 추출하였다. 이를 주형으로 이용하고,  $\beta$ -glucosidase 유전자의 클로닝을 위해 PCR을 수행하였다. Primer는 GeneBank에 등록된 서열정보 (Accession No. AF322365)를 바탕으로 정방향 (5'-ATGGATCCACCGATCCCCAA-3')과 역방향 (5'-ATAAGCTTTCACCCCTTCA CCA-3') primer를 각각 제작하여 사용하였다. PCR 반응은 5 ng의 genomic DNA를 주형으로 사용하고, pfu polymerase (SolGent)를 이용하여 95°C에서 5분간 denaturation 후 95°C에서 1분, 50~58°C에서 1분, 72°C에서 2분간, 총 30 cycle을 수행하였다. 증폭된 유전자와 pMAL-c2x 벡터는 각각 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단한 후, ligation 과정을 거쳐 숙주로 형질전환 하였다.

Smglu와 Atglu의 아미노산 서열 비교는 ClustalW2 분석 프로그램을 이용하여 작성하였다 [17].

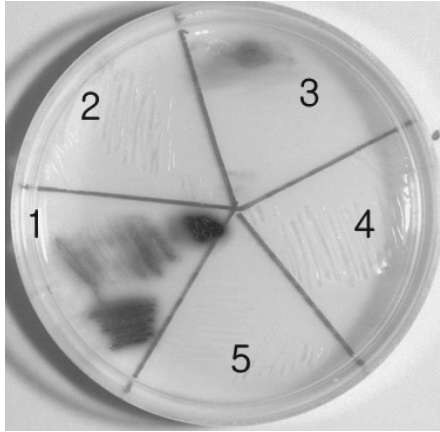
### 2.3. 단백질 분리 및 활성 측정

재조합 균주를 LB 배지에서 7시간 동안 전배양 후, 동일한 배지 1 L에 10 mL의 배양액을 접종하고 37°C, 200 rpm 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 재조합 단백질의 발현 유도는 흡광도 (optical density at 600 nm)가 0.45일 때, 1 mM IPTG를 이용하여 90분 동안 수행하였다. 배양된 세포는 원심분리 (10,000 rpm, 10 min)로 회수한 후, 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8)을 이용하여 세척하고 EDTA (1 mM)와 NaCl (200 mM)이 포함된 완충액 50 mL에 부유시켰다. 세포 파쇄를 위해 freezing-thawing을 3회 수행한 후, lysozyme (~70000 units/mg, Sigma) 100 mg을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후 ice-water bath에서 15분 동안 sonication하여 세포를 완전히 파쇄하고, 13,000 rpm으로 30분간 원심분리한 상등액을 단백질 정제에 이용하였다.

단백질은 pMAL™ system's instruction manual (NEB)에 제시된 affinity chromatography 방법을 이용하여 정제하였다. 먼저 상등액을 0.45  $\mu$ m filter (Sartorius)로 거른 후, affinity column (MBP Trap HP, GE healthcare)에 0.5 mL/min 속도로 흘려주었다. 이 후 washing buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.8)를 이용해 resin에 부착되지 않은 단백질을 제거하였다. 단백질의 탈착에는 10 mM maltose가 첨가된 완충액을 이용하였고, 회수된 융합단백질 (MBP-glucosidase)은 factor Xa protease (2 units/ $\mu$ g, Qiagen)를 4°C에서 38시간 처리해 분리시켰다. 반응액을 다시 amylose resin에 흘려주어 MBP의 부착을 유도하는 방법으로 순수한  $\beta$ -glucosidase만을 회수하였다. 회수된 효소는 필요에 따라 centricon (Amicon)으로 농축한 후, 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 순도를 분석하였다. 단백질 정량에는 Bradford 방법을 이용하였다 [18].

인디칸에 대한  $\beta$ -glucosidase 활성측정을 위해, 1 mM의 인디칸이 포함된 완충액 (100 mM Na-phosphate, pH 7.0)에 3.5  $\mu$ g의 정제된 단백질을 넣고 35°C에서 10분간 반응시켜 인디고와 glucose의 생성량을 확인하였다. 생성된 glucose

의 측정에는 glucose oxidase-peroxidase assay kit (Sigma)를 사용하였다. 효소 활성 1 unit은 35°C에서 1  $\mu$ mol의 인디칸을 가수분해 하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.



**Fig. 1.** Cell growth and pigment production in the minimal medium supplemented with indican as a sole carbon source 1: *Agrobacterium tumefaciens*, 2: *Bradyrhizobium japonicum*, 3: *Sinorhizobium meliloti*, 4: *Flavobacterium johnsoniae*, 5: *Shewanella baltica*.

## 2.4. Oligomeric structure와 zymogram 분석

정제된 효소를 Superose<sup>TM</sup> 12 size exclusion chromatography (10/300, GE healthcare)를 통해 분자량과 사차 구조를 확인하였다. 이동상으로 NaCl (100 mM)과 EDTA (1 mM)가 포함된 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8)을 사용하여 0.4 mL/min 속도로 흘려주었다. 단백질 size marker로는 ribonuclease A (13.7 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (44 kDa), conalbumin (75 kDa)를 이용하였다.

Zymogram 분석은 정제된 효소 2  $\mu$ g을 10% native PAGE 겔을 이용하여 전기영동 한 후, 회수한 겔을 100 mM Na-phosphate 완충액 (pH 7.0)을 이용하여 2회 세척한 후, 각각 0.2 mM X-gal, 5 mM 인디칸, 그리고 2.5 mM MUG가 포함된 1% agarose 겔과 반응시켜 수행하였다.

## 2.5. 온도와 pH에 따른 효소활성 측정

효소의 최적 온도 확인을 위해 20~60°C 온도 범위에서 활성을 측정하였다. 반응은 1 mM의 인디칸이 포함된 1 mL 완충액 (100 mM Na-phosphate, pH 7.0)에 3.5  $\mu$ g의 효소를 첨가하여 10분간 수행한 후, 생성된 glucose의 양을 측정하였다. 최적 pH 조건 확인을 위해 1 mM의 인디칸이 포함된 각각의 완충액에 3.5  $\mu$ g의 효소를 첨가하고 35°C에서 10분 동안 반응시켰다. 완충용액으로는 50 mM sodium acetate (pH 4.0~5.5), 50 mM sodium phosphate (pH 6.0~8.0), 50 mM Tris-HCl (pH 8.5~10.0)를 사용하였다. 온도와 pH에 따른 안정성 측정에는 30분 동안 각각의 온도와 완충액에 같은 양의 효소를 정치 반응한 후, 남아 있는 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.

## 2.6. Kinetic parameter와 기질 특이성 측정

인디칸과의 반응에 따른 동역학 상수의 측정을 위해 3.5  $\mu$ g

의 효소와 각각 0.1~10 mM의 인디칸이 포함된 반응액 (100 mM Na-phosphate, pH7.0)을 35°C에서 30분간 반응시키며, 시간에 따라 생성된 glucose의 양을 측정하였다. 이후 측정된 값을 토대로 반응속도를 결정한 후, Lineweaver-Burk 식을 이용하여 동역학 상수를 계산하였다 [19].

기질 특이성 분석은, 1 mM의 기질 (cellobiose, maltose, sucrose, gentiobiose, p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, indican, 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, lactose, salicin, arbutin)이 포함된 반응액 (100 mM Na-phosphate, pH7.0)에 3.5  $\mu$ g의 효소를 첨가하고 35°C에서 30분간 반응시켜 생성된 glucose의 양을 측정하는 방법을 이용하였다.

## 2.7. 인디칸의 인디고 전환을 비교

10 mM의 인디칸이 포함된 5 mL의 반응액 (100 mM sodium phosphate, pH 7.0)에 10  $\mu$ g의 정제된 효소를 첨가한 후 35°C, 80 rpm 조건으로 반응시키며 생성되는 glucose 양을 측정하였다. 동일한 조건에서 *S. meliloti* 유래의 정제된  $\beta$ -glucosidase (this work)를 비교군으로 사용하였다 [6].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 인디칸 분해 활성을 갖는 $\beta$ -glucosidase의 발굴 및 유전자 분석

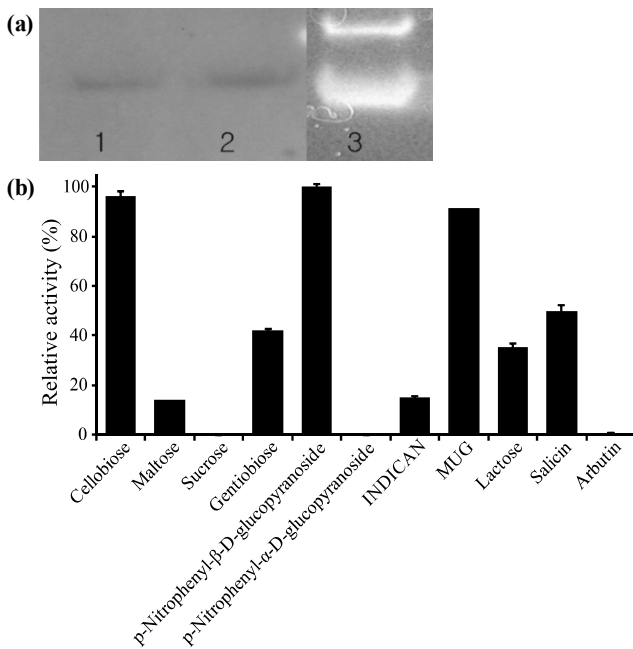
선행 연구의 결과로써 *S. meliloti*를 포함한 다양한 미생물 중에서 인디칸에 높은 활성을 지닌 균주를 발굴하여 보고하였다 [5]. 이들 중 *A. tumefaciens*의 경우, *S. meliloti*와 비교할 만한 활성을 지니고 있음이 유추되었다. 이러한 예측이 가능한 것은 *S. meliloti*와 유사하게 인디칸을 탄소원으로 포함한 최소배지에서 잘 성장하는 것과 효소 활성의 결과로 인디고로 추정되는 파란 색소가 생성되었기 때문이다 (Fig. 1). 따라서 인디칸에 활성을 지니 인디고의 생산과정에 직접 이용하거나, *S. meliloti* 유래 유전자와의 family shuffling에 이용 가능한 효소원의 추가 확보를 시도하였다. 이를 위해, *A. tumefaciens* 과쇄액에서의 활성 분석과 유전체로부터  $\beta$ -glucosidase 암호화 유전자의 탐색을 시도하였다.

관련된 활성을 지닌 단백질의 존재 여부를 확인하기 위해 *A. tumefaciens*를 배양한 후 과쇄한 조효소 (crude extract) 액을 이용하여 zymogram을 수행하였다. 이때 대조군으로 개발된 *S. meliloti* 조효소액의 같은 양을 비교하였다. 결과적으로 하나만 확인되는 *S. meliloti* 활성 밴드와 달리, 형광 기질인 MUG (인디칸에 대한 활성과 잘 부합되어 사용한 기질)에 대해 2개의 활성 밴드가 나타나는 것을 확인하였다. 형광기질과 달리 상대적으로 비활성 (specific activity)이 낮아 착색 화합물의 생성에 오랜 반응 시간 (5~7시간)이 필요한 인디칸을 기질로 이용한 zymogram에서도 같은 결과가 확인되었다 (data not shown, Fig. 4(a) 참조). 따라서 *A. tumefaciens*에는 인디칸을 분해할 수 있는 두 종류 이상의  $\beta$ -glucosidase가 존재하거나, 하나의 효소가 non-reducing 환경에서 2가지의 형태로 나타나는 것으로 보였다. 비환원



발굴된 현상과 일치하는 결과이다. 따라서 *A. tumefaciens* 유래 효소의 경우, 상대적으로 약한 결합력을 지닌 이량체를 형성하고 있으며, 각각이 분리된 단량체도 활성을 지니고 있음이 확인되었다. 기발굴된 *S. meliloti* 유래 효소의 경우, 재조합 균주와 원균에서 단량체만 확인되었다.

온도 및 pH에 따른 효소 활성을 확인한 결과, 최적 활성 온도는 40°C이고 30-45°C 온도조건에서 30분간 정치 후에도 90% 이상의 효소활성을 지닌 것이 확인되었다. 반면에 55°C 이상의 온도에서 30분간 정치 시키면 대부분 (>90%)의 효소활성을 잃는 것으로 확인되었다. pH에 대한 효소 의존성을 확인한 결과, pH 7.0에서 가장 높은 효소 활성을 지니며, pH 4.0-5.0 범위에선 활성이 측정되지 않고 pH 8.0-10.0에서는 20% 이하의 낮은 효소 활성을 나타내었다. 안정성의 경우에도, 산성 조건 (pH 4.0-5.0)에서 30분간 정치시킨 후 중화시킨 반응액에서 활성이 측정되지 않았다. 반대로 알칼리 조건 (pH 8.0-10.0)에서는 45-70% 정도의 효소 활성이 남아 있음이 확인되었다. 이러한 특성은 기발굴된 *S. meliloti* 유래 효소와 매우 유사한 특성으로서 [6], 인디칸에 활성을 지닌 효소들의 구조/생화학적 안정성은 상대적으로 낮음을 보여 주는 결과이다. 이와는 달리 4°C에서 1개월 동안 보관 (100 mM Na-phosphate, pH 7.0)하며 측정된 효소 활성은 50% 이상이 남아 있는 것으로 확인되었다. 이때 기발굴된 *S. meliloti* 유래 효소의 경우, 15% 내외의 추가 손실이 있음이 확인되었다.



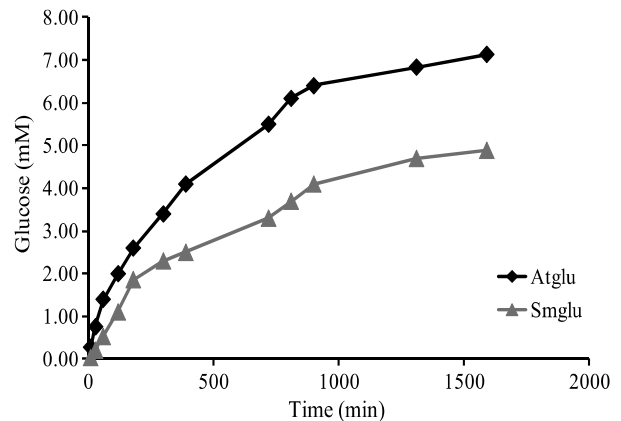
**Fig. 4.** Activity staining and substrate specificity of the purified β-glucosidase. (a) Zymogram assay on native gels using X-gal (lane 1), indican (lane 2) and MUG (lane 3) as a substrate. (b) Substrate specificity of the purified β-glucosidase against natural and synthetic substrates including indican.

정제된 효소의 기질 특이성을 확인하기 위해 인디칸을 포함한 다양한 기질을 사용하여 각각의 상대적 효소활성을

측정하였다. 그 결과 p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside에 대해 가장 높은 효소 활성을 나타내며, β-1,4 glucosidic bond를 갖는 다양한 기질에 대해 비교적 높은 효소 활성을 지닌 것이 확인되었다 (Fig. 4(b)). 반대로 α-1,4 glucosidic bond에 대한 효소 활성은 매우 미약하거나 없는 것으로 확인되었다. 하지만 목적 기질인 인디칸에 대한 효소활성은 다른 기질에 비해 상대적으로 낮은 것으로 측정되었다. 최적 반응 조건에서 다양한 농도의 인디칸에 대한 효소활성을 측정된 결과, 전형적인 형태의 기질-반응속도 곡선을 확인하였다. Lineweaver-Burk 식을 사용하여 Km과 Vmax 값을 계산한 결과, 1.4 mM, 373.8 μM/min/mg으로 각각 확인되었다. 이는 선행 연구결과 확인된 *S. meliloti* 유래 효소의 인디칸에 대한 동력학적 상수 (Km, 0.97 mM; Vmax, 355.6 μM/min/mg)와 비슷한 수준이다 [6].

**3.4. 인디칸을 이용한 인디고 전환률**

새로이 발굴된 효소원의 반응 공정 도입 가능성을 확인하기 위한 예비 연구로 pH 7.0, 35°C 반응 조건에서 인디칸을 기질로 인디고를 생산해 보았다. 전환 실험에서 기발굴된 *S. meliloti* 유래 효소를 대조군으로 비교하였다. 같은 조건에서 효소 반응을 유도하며 반응시간에 따른 glucose의 생성량을 측정된 결과, 초기 반응은 비슷함에도 불구하고 새로운 효소원이 *S. meliloti* 유래 효소보다 더 많은 양의 글루코스 생성되는 것이 확인되었다 (Fig. 5). 이러한 결과는 반응액을 용매로 추출하여 인디칸을 직접 분석한 HPLC에서도 확인되었다. 따라서 흥미롭게도 두 효소의 인디칸에 대한 동력학적 변수 (Km과 Vmax) 값이 유사하며, 온도나 완충액에 대한 특성이 상당히 유사함에도 전환률의 차이가 뚜렷하다는 것이다. 재현성 있게 1.7-1.8배 정도의 차이를 보이는 최종 전환률로 새로운 효소가 기발굴된 *S. meliloti* 효소보다 불용성 산물인 인디고에 의한 활성저해나 변성이 적다는 것을 의미한다. 이러한 특성은 서로 다른 4차 구조나 활성부위 주변의 아미노산 잔기 차이에 의한 것으로 추정된다. 현재는 이들 두 효소원의 유전자를 혼합한 상태에서 특성 개량을 위한 family shuffling을 진행중이다.



**Fig. 5.** Conversion profile of the hydrolysis of pure indican in small scale. The same amounts of two enzymes are used in this study. Data represented the mean value of triplicate experiment.

#### 4. 결론

*Agrobacterium tumefaciens*로 부터 인디칸에 활성을 지닌  $\beta$ -glucosidase 유전자를 발굴하여 MBP가 융합된 형태로 과 발현을 유도하였다. 새로이 발굴된 효소는 51 kDa 단량체가 이량체를 형성하는 4차 구조를 지닌다. Zymogram 결과 단량체와 이량체 모두에서 효소 활성을 나타냄이 확인되었다. 최적 활성 pH와 온도는 각각 40°C, pH 7.0로 조사되었으며 산성 조건에서 상대적으로 낮은 안정성을 보여 주었다. 다양한 기질과 반응시켜 측정된 기질 특이성의 분석에서 p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside에 가장 높은 활성을 지니며, 주로  $\beta$ -1,4 glucosidic bond 결합에 특이성을 지니는 것으로 확인되었다. 인디칸 분해 활성에 대한 동역학 변수 측정에서 기발굴된 효소원과 유사한 값을 지님에도 인디고 전환률은 더 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과들은 새로이 발굴된 효소원이 인디칸으로부터의 인디고 생산이나 특성 개량을 위한 주형으로 기발굴된 유전자원과 병행해 사용할 수 있음을 보여주는 결과이다.

#### 감사

이 논문은 부분적으로 2011년 교육과학기술부의 재원으로 (재)바이오합성연구단 (글로벌프론티어)과 BK21 프로그램의 지원을 받아 수행된 연구임 (과제번호, 2011-0031950).

#### References

- Painbeni, E., S. Valles, J. Polaina, and A. Flors (1992) Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 3087-3091.
- Bhatia, Y., S. Mishra, and V. S. Bisaria (2002) Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 375-407.
- Pack, S. P., K. Park, and Y. J. Yoo (2002) Enhancement of beta-glucosidase stability and cellobiose-usage using surface-engineered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 24: 1919-1925.
- Moriwaki, N., K. Matsushita, M. Nishina, K. Matsuda, and Y. Kono (2003) High myo-inositol concentration in the hemolymph of planthoppers. *Appl. Entomol. Zool.* 38: 359-364.
- Kim, J. Y., J. Y. Lee, Y. S. Shin, and G. J. Kim (2009) Mining and identification of a glucosidase family enzyme with high activity toward the plant extract indican. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 57: 284-291.
- Kim, J. Y., J. Y. Lee, Y. S. Shin, and G. J. Kim (2010) Characterization of an indican-hydrolyzing enzyme from *Sinorhizobium meliloti*. *Process Biochem.* 45: 892-896.
- Gilbert, K. G., H. G. Maule, B. Rudolph, M. Lewis, and H. Vandenburg, E. Sales, S. Tozzi, and D. T. Cooke (2004) Quantitative analysis of indigo and indigo precursors in leaves of *isatis* spp. and *Polygonum tinctorium*. *Biotechnol. Prog.* 20: 1289-1292.
- Minami, Y., H. Takao, T. Kanafuji, K. Miura, M. Kondo, I. Hara Nishimura, M. Nishimura, and H. Matsubara (1997) beta-glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol.* 38: 1069-1074.
- Maugard, T., E. Enaud, A. de La Sayette, P. Choisy, and M. D. Legoy (2002) Beta-glucosidase-catalyzed hydrolysis of indican from leaves of *Polygonum tinctorium*. *Biotechnol. Prog.* 18: 1104-1108.
- Bechtold, T., A. Turcanu, S. Geissler, and E. Ganglberger (2002) Process balance and product quality in the production of natural indigo from *Polygonum tinctorium* Ait. Applying low-technology methods. *Bioresour. Technol.* 81: 171-177.
- Komboonchoo, S. and T. Bechtold (2009) Natural dyeing of wool and hair with indigo carmine (CI Natural Blue 2), a renewable resource based blue dye. *J. Clean Prod.* 17: 1487-1493.
- Meksi, N., M. Kechida, and F. Mhenni (2007) Cotton dyeing by indigo with the borohydride process: effect of some experimental conditions on indigo reduction and dyeing quality. *Chem. Eng. J.* 131: 187-193.
- Thangadurai, D., M. B. Viswanathan, and N. Ramesh (2002) Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longiracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity (Retracted Article. See vol 59, pg 336, 2004). *Pharmazie* 57: 714-715.
- Powell, K. A., S. W. Ramer, S. B. del Cardayre, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, and G. W. Huisman (2001) Directed evolution and biocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 3948-3959.
- Taylor, S. V., P. Kast, and D. Hilvert (2001) Investigating and engineering enzymes by genetic selection. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 3310-3335.
- Wang, J. X., S. F. Zhang, H. D. Tan, and Z. B. Zhao (2007) PCR-based strategy for construction of multi-site-saturation mutagenic expression library. *J. Microbiol. Method.* 71: 225-230.
- European Bioinformatics Institute, Tools, Sequence analysis, ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk>.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelman (1996) *Protein Methods*. 2nd ed., pp. 62-67. John Wiley & Sons, Inc., publication, NY, USA.
- Lineweaver, H. and D. Burk (1934) The Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658-666.