

자연발효 과정에서 인디고에 환원력을 지닌 미생물 커뮤니티 분석과 농화배양

최은실^{1,2}, 이은빈¹, 최형안¹, 손경희², 김근중¹, 신윤숙^{2*}

Analysis and Enrichment of Microbial Community Showing Reducing Ability toward indigo in the Natural Fermentation of Indigo-Plant

Eun-Sil Choi^{1,2}, Eun-Bin Lee¹, Hyeong-An Choi¹, Kyunghye Son², Geun-Joong Kim¹, and Younsook Shin^{2*}

접수: 2013년 8월 26일 / 게재승인: 2013년 10월 14일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Indigo is utilized in various industries including textile dyeing, cosmetics, printing and medicinal products and its reduced form, leuco-indigo, is mainly used in these process. Chemical reducing agent (sodium dithionite, sodium sulfide, etc.) is preferred to use for the formation of leuco-indigo in industry. In traditional indigo fermentation process, microorganisms can participate in the reduction of indigo and thus it has been known to reduce environmental pollution and noxious byproducts. However, in fermentation method using microorganisms it is difficult to standardize large scale production process due to low yield and reproducibility. In this study, we attempted to develop the indigo reduction process using microbial flora which was isolated from naturally fermented indigo vat or deduced by metagenomic approach. From the results of library analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes from the traditional indigo fermentation vat sample (metagenome), it was confirmed that *Alkalibacterium* (71%) was distinctly dominant in population. Some strains were identified after confirming that they become pure culture in nutrient media modified slightly. Four strains were

separated in this process and each strain showed obvious reducing ability toward indigo in dyeing test. It is expected that the analyzed results will provide important data for standardizing the natural fermentation of indigo and investigating the mechanism of indigo reduction.

Keywords: Microbial community, Metagenome, Enrichment, Indigo, Fermentation, Leuco-indigo

1. 서론

미생물은 35억년 이상 지구에 존재해 왔으며 생물 총량의 60%라는 가장 광범위한 다양성을 지닌다. 이들은 오랜 기간 동안 지구 생태계에 변성하면서 극한 환경을 포함한 다양한 서식지에서 적응할 수 있도록 진화되어 왔다. 따라서 미생물은 대사/생리 활성도 매우 다양하여 이들이 지닌 잠재적 이용 가치는 자원의 보고라고 할 만큼 무한하다 [1]. 실제로 많은 미생물은 다양한 생태계를 구성하는 중요한 주체이고, 상호 작용을 통해 natural geochemical cycle과 같은 global regulation에 중요한 역할을 담당하고 있다. 일산화탄소나 이산화탄소가 biomass로 전환되고 이러한 화합물이 food chain을 경유해, 고정/소비/순환되는 과정은 미생물이 지닌 대사 다양성을 바탕으로 이루어진다 [2,3]. 또한 미생물의 2차 대사로부터 얻을 수 있는 다양한 산물이나 대사 기작 규명을 통해 인류가 당면한 에너지/의약/식량과 같은 보편적인 문제의 해결책을 찾아가고 있다 [4,5]. 따라서 특정한 생태계의 미생물 군집 (microbial community)을 분석하고 이들이 지닌 대사/생리를

¹전남대학교 생물학과
²Department of Biological Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²전남대학교 의류학과/생활과학연구소
²Department of Clothing and Textiles/Human Ecology Research Institute, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: +82-62-530-1341, Fax: +82-62-530-1349
e-mail: yshin@chonnam.ac.kr

통해 새로운 적용점을 찾는 일은 매우 중요한 연구주제가 되고 있다.

Microbial community를 분석하여 이용하는 대표적인 분야가 (천연)발효 산업이다. 자연적인 균총에 의지하고 공학적인 체계 (규격화나 표준화가 어려운 특성)를 지니지 못한 특성으로 인해 발생한 비균일한 공정시간이나 재현성, 수율을 유지하는데 이러한 분석과정이 필요하기 때문이다. 예를 들어 대표적인 발효 제품인 김치는 한국의 전통적인 발효 음식으로 원재료나 공정, 발효 방법 그리고 보존/숙성하는 방법에 따라 품질이 다양한 것으로 알려져 있다. 따라서 발효시키거나 원재료, 공정에 따라 주도적으로 참여하는 균주를 이해하고 그 기작이 규명되면 표준화된 김치생산이 가능할 수 있을 것이다 [6,7]. 미생물에 의한 발효 산업은 식품을 벗어나 천연 염료를 생산하는 과정에도 이용된다. 대표적인 것이 쪽 식물로부터 생산되는 인디고 (indigo) 생산과정이다. Indigo는 주된 활용분야인 염료산업 이외에, 화장품이나 기능성 소재로도 이용되고, 다양한 유도체를 제조해 항균제를 비롯한 의약품으로도 활용 가능성이 보고되고 있다 [8-11]. 전통적인 인디고 생산법은 수확한 쪽을 일정기간 물에 담궈 발효, 숙성 과정을 유도한 후 양금을 생성하고 석회를 첨가하여 회수하는 것이다. 즉, *Polygonum tinctorium*의 잎에 저장된 indican이 쪽 식물자체 혹은 자연적으로 내포된 미생물의 효소활성 (β -glucosidase)에 의해 indoxyl과 glucose로 가수분해되고 공기와 접촉하여 indigo (blue, insoluble)가 생성된다 [12-14]. 양금에 존재하는 indigo는 산화된 형태로 불용성이지만 발효 환

경에서 제공되는 환원력에 의해 물에 용해가 가능한 leuco-indigo (colorless, soluble)로 전환되어 염료로 이용된다 (Fig. 1) [15]. 그러나 이러한 방법으로 염료를 제조할 경우 소요시간이 길고 사용하는 석회의 종류, 석회의 양 또는 제조하는 사람에 따라 염료의 품질이 달라 규격화가 어렵다. 또한 입자가 크고 균일하지 않아 염색 시 일정하게 염색되지 않는다. 이러한 문제점과 함께 천연염료의 염색 견뢰도, 재현성, 생산의 한계성 및 보관상의 문제점 때문에 그 이용범위가 제한되어 있으며 고가로 거래되고 있는 실정이다 [13].

따라서 전통적으로 indigo를 환원시키는 공정 (석회와 미생물 이용) 대신 화학적 환원제인 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를 이용하는 방법이 대체되어 이용되나, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 가 Na_2SO_4 , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 와 같은 독성 물질로 산화되고 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 의 강한 환원력 때문에 환경오염을 유발하는 문제가 있다 [13,16,17]. 또한 반응 부산물에 의한 건강상의 문제도 상존하는 것으로 보고되고 있다. 대안으로 전기화학적 방법으로 indigo를 환원시키거나 [18] glucose와 같은 환원당을 이용하여 indigo를 leuco-indigo로 전환하는 방법이 있으나 [19] 이들 역시 낮은 생산 효율 문제와 더불어 높은 온도와 강알칼리 환경이 요구되는 문제로 인해 규격/표준화에 어려움이 있다. 따라서 이러한 문제의 근본적인 해결책으로 순수한 생물학적 방법으로 indigo를 환원시키려는 연구가 재조명 받고 있다.

본 연구에서 indigo를 화학적으로 대량 환원시킴으로써 발생하는 환경오염이나 질환 유발 문제를 해결하기 위해, indigo의 환원과정에 미생물을 이용할 수 있는 가능성을 제시하고

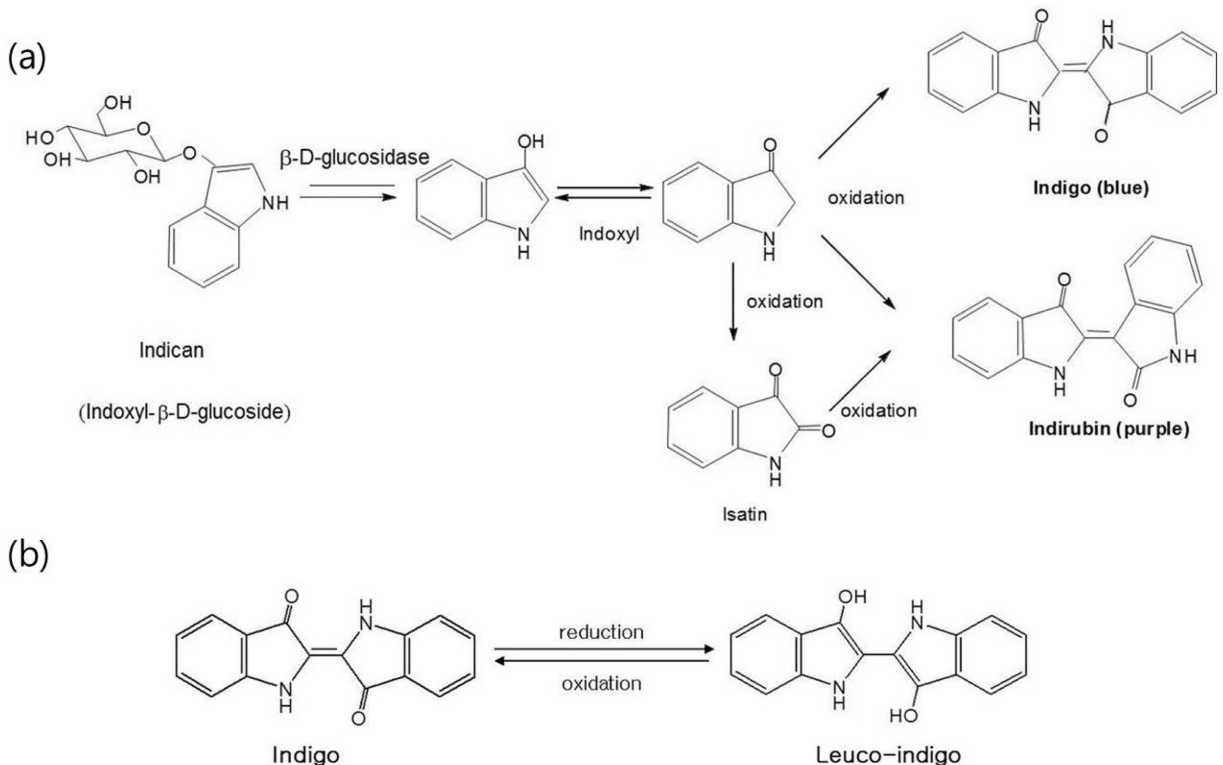


Fig. 1. Redox reaction mechanism of indigo.

자 한다. 이를 위해 metagenomics의 전형적인 접근법으로 쪽 식물을 발효시킨 발효액에 존재하는 균총을 분석한 후, 분리 배양될 수 있는 균주의 특성 규명을 시도하였다. 이들의 indigo 환원능은 확인함으로써 전통적인 인디고 발효과정에 규격 혹은 표준화 요소로서 미생물의 이용가능성을 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 배지

전라남도 나주의 쪽 천연염색 장인이 쪽 (*Polygonum tinctorium*)의 전통발효를 통해 만든 염액 중 염색이 잘 되는 2008년, 2010년 염액과 염색이 잘 되지 않는 2009년 염액을 -70°C에 보관된 상태로 시료로 사용하였다. 영양배지 (1% Trypton, 0.5% Yeast extract, 0.3 g Beef Extract, 5% NaCl and pH 10)는 2 N NaOH를 이용하여 pH를 조절하였고, YPA 배지 (0.8% peptone, 0.3% yeast extract, 1% agar and pH 10)와 YPD 배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1% agar, pH 10)는 100 mM NaHCO₃와 100 mM Na₂CO₃를 이용하여 pH를 조절하였다. 모든 배지는 121°C에서 15분간 멸균 후 사용하였다.

2.2. 전통 발효 염액의 metagenomic DNA 추출

비교연구를 위해 전라남도 나주에서 염색 장인이 *Polygonum tinctorium*을 전통적인 방법으로 발효시켜 염색이 정상적으로 이루어진 것과 동일한 발효과정을 거쳤으나 염색이 되지 않는 발효액을 각각 이용하였다. 모든 발효액은 -70°C에 보관된 상태로 실험을 진행하였다. 각각의 발효액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 획득한 0.1~0.2 g의 pellet을 DDW 5 mL에 재부유시켰다. 농축된 sample 1 mL로부터 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 이때 co-precipitation에 의해 DNA 손실을 유발하는 protein precipitation solution은 처리하지 않았다. 추출한 DNA는 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 주형 DNA로 사용하였다.

2.3. 16S rRNA 유전자 라이브러리 구축 및 염기서열 분석

대표적인 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCMTG GCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 각 발효액으로부터 획득한 genomic DNA를 주형으로 PCR를 이용해 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 Taq polymerase (1 U)를 이용하여 주형 DNA 0.3 ng를 첨가하고, 10x Taq polymerase buffer 1 µL, 10 mM dNTP 1 µL, 그리고 각각의 primer를 5 pmol 첨가하여 전체 양이 25 µL 되게 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분 denaturation, 95°C에서 1분 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1.5분간 extension/25 cycle로 하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자는 PCR Clean-Up Kit로 회수한 후, pGEM[®]-T vector (Promega)와 T-Blunt vector system (Solgent, Korea)에 클로닝

하였다. 이때 대장균 숙주로는 XL1-blue를 이용하였다. 형질 전환체는 2% X-gal agar 배지에 도말하여 흰색 콜로니를 선별한 후, 신선한 배지로 옮겨 같은 과정으로 검증하였다.

2차 선별된 clone을 LB 액체 배지에 배양하여 DNA purification system (Promega, USA)을 사용하여 plasmid를 정제하였다. 정제된 plasmid는 삽입된 각각의 16S rRNA 유전자를 PCR로 재증폭하기 위한 주형으로 이용하였다. 증폭된 유전자는 *Sau3A* I 제한효소를 처리한 후, gel 상에서 절편의 크기나 성분비가 다른 것을 최종 선별해 염기서열 분석에 이용하였다. 서열 분석에는 pGEM[®]-T와 T-Blunt vector의 M13 primer (F5'-GTAAAACGACGGCCA GT-3', R5'-GCGGATA ACAATTTCACACAGG-3')를 이용하였다. 얻어진 sequence는 BlastN (NCBI)을 이용해 관련 균주들과 비교하여 동정에 이용하였다.

2.4. 전통발효 염액에 서식하는 배양 가능 균주 분리 및 동정

발효 염액의 복합적인 균총 가운데 분리가 가능한 균주를 배양하기 위해, 16S rRNA 서열을 이용한 균주 동정 결과를 바탕으로 영양배지 (1% Trypton, 0.5% Yeast extract, 0.3 g Beef Extract, 5% NaCl and pH 10)를 변형해 이용하였다. 발효액을 희석 배율에 따라 영양배지에 도말하고, 30°C에서 4일간 배양하였다. 또한 인디고 염료의 전구물질인 indican 배당체 (indoxyl-glucose)를 탄소원으로 사용하여 성장 가능한 균주를 선별하기 위해 M9 최소영양배지에서 같은 조건으로 배양하였다. 배양된 균주는 일반적인 표현형질 차이에 따라 최종 분석 대상 균주로 선별하였다.

발효 염액으로부터 배양된 4종의 균주는 colony PCR을 통해 16S rRNA 유전자를 증폭하여 서열을 분석한 후, 동정에 이용하였다. 또한 정확한 동정을 위해 생리·생화학적 특성 분석을 위한 하기 실험을 진행하였다. Gram-staining과 KOH test를 통해 균주의 표현형질을 판별하였다. 단백질 가수분해능을 조사하기 위해 nutrient 평판배지 (0.3% yeast extract, 0.8% peptone, 1% agar)에 skim milk를 0.5%가 되도록 첨가하여 균을 배양하였다. 균의 성장으로 형성된 투명한 환에 10% HgCl₂/20% HCl 용액을 가하여 카제인에 대한 분해능을 확인하였다. 전분 분해능을 확인하기 위해 nutrient 평판배지에 0.15% soluble starch를 첨가하여 테스트 배지를 제작하였다. 제작한 배지에 균을 접종하고 배양한 후, iodine 용액을 콜로니 주변에 떨어뜨려 투명한 환이 형성되는지를 확인하였다. 각 균의 젤라틴에 대한 분해능은 다음과 같이 확인하였다. 젤라틴배지 (12% 젤라틴, 2% peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose)를 15 mL test tube에 굳혔다. 백금을 이용하여 젤라틴 배지 가운데 균을 접종하고 배양 (20~23°C)하였다. 균의 성장에 따라 액화가 진행되는 정도를 측정해 젤라틴 분해능을 확인하였다. Catalase test는 3% 과산화수소를 균배양액의 10배가 되도록 혼합하여 기포의 생성 여부를 확인하거나, 30°C에서 배양한 평판배지 콜로니 위에 과산화수소액 (3%, 5 µL)을 첨가해 기포 생성 여부로 확인하였다. Cytochrome

oxidase의 활성 유무는 nutrient 평판배지에 접종한 균을 30°C에서 배양한 후, α -naphthol/95% ethanol : 1% dimethyl-p-phenylenediamine oxalate solution 용액을 1:1로 첨가해 색변화로 결정하였다.

API ZYM kit (BioMerieux, France)는 미생물의 효소활성(19가지)을 검사하기 위해 주로 사용되는 도구로서 거의 모든 종류의 균에 적용할 수 있다. 균의 성장 조건에 따라 나타나는 효소활성의 차이를 확인하기 위해 Rich 평판배지 (1% tryptone, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 0.3% beef extract, 1% agar, pH10)와 YPD 평판배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1% agar, pH 10)에서 배양한 균을 멸균증류수 혹은 0.85% NaCl 용액에 부유시켰다 ($OD_{550\text{ nm}}=1\sim1.5$). Kit의 각 큐플에 150 mL의 균액을 접종하고 30°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후, kit에 포함된 ZYM A와 B 용액을 각각 첨가해 5분간 반응시킨 후 결과를 분석하였다. 반응 경과에 따라 1, 3, 12시간 동안 상온에서 반응시키면서 발색여부를 확인하였다.

2.5. 선별 균주의 환원력 측정

자연환원이 일어나는 천연발효 염액에서 순수분리한 균주의 환원력을 확인하기 위한 방법으로, TTC reduction assay 법을 활용하였다. 이를 위해 배당체인 indican을 포함한 M9 최소배지에서 성장한 균주 4종을 $OD_{600}=2.5\pm0.2$ 의 흡광도를 보일 때까지 배양한 후, 균체 일부 (0.1~0.2 g)를 회수하였다. 이를 50 mM potassium phosphate (pH 7.0, 9 mL)에 부유시키고 1 mL의 15 mM 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride를 처리하였다. 25°C에서 반응시키며 시간에 따라 세포를 회수 (13,000 rpm, 10 min)하고 생성된 formazan은 95% ethanol에 녹였다 [20,21]. UV-Visible Spectrophotometer (UV-1700, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 흡광도 (485 nm) 값을 측정해 환원력을 분석하였고, 대조군으로 대장균 XL1-Blue와 화학 환원제인 sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)를 이용하였다.

균 환원력 측정의 다른 방법으로 indigo-carmin을 기질로 이용하였다. 염기성의 indigo-carmin은 물에 용해되면 보라색을 띤 청색을 나타내며, 환원되면 노란색으로 변하는 특성을 이용해 환원력을 검출하는데 사용된다. 이를 위해 YPA media (100 mM $\text{NaHCO}_2/\text{Na}_2\text{CO}$, 0.8% peptone, 0.3% yeast extract, 1% agar and pH 10)에 4.3 mM indigo-carmin이 포함된 배지를 제작하였다 [22]. 각 균을 30°C 혐기조건에서 3일간 배양하며 배지의 색상 변화를 통해 환원력 여부를 확인하였다.

2.6. 균의 환원력에 의한 합성인디고 염액 발효

환원력이 확인된 균주들을 이용해 leuco-indigo를 생산한 후, 직물을 염색하는 방법으로 실 적용 가능성 여부를 확인하였다. 이를 위해 0.2% Na_2CO_3 (pH 11.32)용액 35 mL에 합성인디고 0.25 g을 첨가하고 배양된 균을 첨가하여 32°C에서 반응시켰다. 이때 사용한 합성 인디고는 시판중인 제품 (Indigo, Vat Blue 1, Aldrich, Germany)을 구입하여 사용하였다. 각 균

은 YPD (pH 10) 액체배지에 배양하며 $OD_{600}=2.0\pm0.1$ 도달한 시점에서 원심분리 (10,000 rpm, 4°C 10 min)로 회수하였다. 모든 균의 경우, 회수량을 배양액 기준으로 30, 60, 90, 150 mL (dry weight 20, 40, 60, 100 mg)로 나누어 환원여부를 확인하였다. 각 반응액은 하루에 한번씩 inverting을 통해 섞일 수 있도록 하였고, 반응개시 날을 0일로 하여 매일 염색을 시도하였다. 염색은 경과일에 따라 0.1 g 마직물을 염액의 상등액에 20분 동안 침지 후, 공기 중에서 산화, 발색, 수세하고 0.1% 아세트산 수용액으로 10분 중화 후 건조하였다. 염색한 직물은 색차계 (Color-Eye 3100, Macbeth, USA)를 이용하여 최대 흡수파장에서의 K/S 값으로 표면염착을 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 발효액으로부터 획득한 16S rRNA gene library 구축

미생물 균총 분석을 위해 메타지놈을 추출하기 위한 인디고 천연 발효액은 염색의 성패에 상관없이 모두 알칼리 조건 (pH 9.11~9.6)의 특성을 지니고 있음이 확인되었다. 준비된 시료 (발효액 40.5 ml)를 원심분리했을 때, 대략 0.1~0.2 g 정도의 세포를 포함한 고형분을 회수할 수 있었으며, 재료 및 방법에서 서술한 방법으로 핵산을 분리하였을 때 1.25~1.5 ng/ μL (total volume 100 μL) genomic DNA를 추출하였다. 핵산의 분리과정에서 회수율 감소의 주원인으로 분석된 protein precipitation solution을 처리하지 않았기 때문에 추출된 핵산에는 단백질을 포함한 불순물이 포함되어 있다. 따라서 추출된 핵산을 주형으로 16S rRNA gene을 증폭하기 위해, 시료를 희석 (1/10~1/100)해 PCR을 수행하였다. 각각 (염색이 잘 된 것과 그렇지 않은 것)의 발효액에서 얻은 16S rRNA 유전자들은 클로닝이 용이한 commercialized TA cloning vector를 사용하여 library를 구축하였다. 재조합 유전자 pool은 X-gal을 이용하여 약 2900개의 positive clone을 1차적으로 확보하였고, insert의 제한효소 (*Sau3AI*) 처리에 따른 절편의 크기와 패턴에 따라 총 40개의 subfamily로 분류해 균총분석에 이용하였다.

3.2. 선별 클론의 서열 분석에 의한 발효 균총 분석

상기 과정에서 최종 선별된 40개의 클론은 제한효소 절단 절편 패턴이 같은 각각의 subfamily를 대표할 수 있는지를 임의로 선정된 subfamily 하나의 특성분석으로 확인한 후, 서열 분석을 진행하였다. 얻어진 염기서열은 BLAST N (NCBI) 프로그램 이용해 database (GenBank) 상의 관련 균주들과 consensus sequence를 비교하는 방법으로 동정에 이용하였다. 분석결과, 천연 발효액 중 염색이 가능했던 발효액에서는 *Alkalibacterium*이 우점하고 있었다. 전체적인 균총의 비율을 분석하면 71% *Alkalibacteriums*과 14% *uncultured bacterium clone ambient alkaline* (clone NN2-1), 그리고 나머지 균총의 주된 종으로는 *Bacillus*가 검출되었으나 이외에도 다양한 비배양 종이나 미규명 종들이 확인되었다 (Fig. 2). 염색이 되지 않았

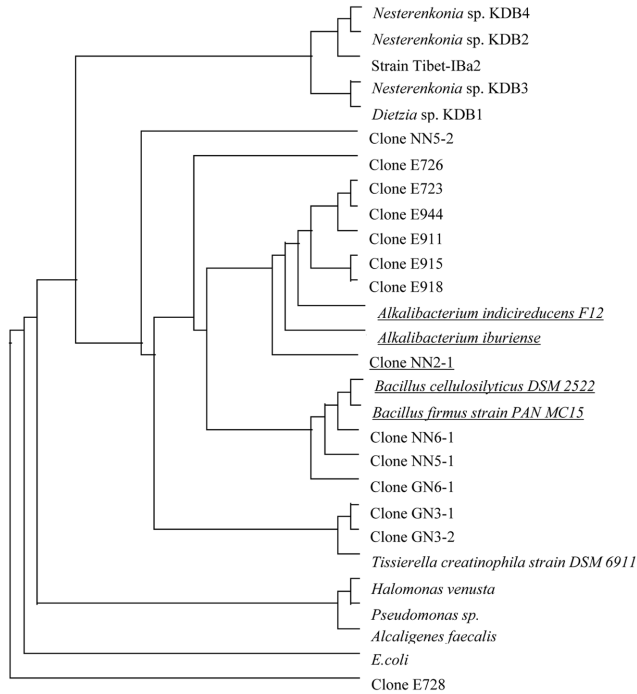


Fig. 2. Phylogenetic tree analyses of representative clones from the sample of fermentation liquor based on 16S rRNA gene sequence analysis. The clones from the first fermentation liquor (successfully dyeing sample) are analyzed in this figure using Clustal W program. The most dominant genus is underlined.

던 두번째 발효액에서는 *uncultured bacterium clone ambient alkaline*이 대략 50%, *Bacillus* 계열이 30%를 차지하며 매우 제한된 종 편중현상이 관찰되었다 (data not shown). 고세균이나 곰팡이는 분석과정에서 배제하였다 (실제 영양 선택 배지에 발효액을 도말한 결과 확인되지 않았다). 분석된 서열은 GenBank에 등록된 관련 균주의 16S rRNA 서열과 의미있는 유사성 (> 90%)을 보였고, subfamily 내의 균주 간에는 모두 99.0~99.9%의 높은 상동성을 확인하여 분석을 신뢰성을 확보할 수 있었다. 또한 원 발효액의 환경 (알칼리성)에 적합한 균주들이 주로 존재하는 것을 확인함으로써 균총 분석의 신뢰성을 담보할 수 있었다.

3.3. 농화 배양이 가능한 균주 선별

메타지놈 분석 결과 일부 균주는 배양 가능한 균주로 조사되었다. 이들 균주를 포함하여 복합적인 균총 가운데 분리 배양이 가능한 균주를 선별하기 위해, 천연 발효액의 물리화학적 특성과 메타지놈 분석 결과를 바탕으로 영양배지를 변형시켜 농화배양을 통한 균주 선별과정에 이용하였다. 경우에 따라, 농화배양 배지의 선택성을 강화할 목적으로 인디칸을 배지에 추가로 첨가하였다. 준비된 배양액에 발효액을 희석 배율에 따라 도말하고 30°C에서 4일간 배양하였을 때, 정상적으로 염색이 진행된 발효액에서 5개의 균주 (TPL19, Tibet-IBa2, AC84, W5044, 110-8)를 얻을 수 있었다. 복합균총내에서의 미생물 상호작용이나 고체 배지의 특성으로 인해 제한

된 균주만이 선별되었을 수도 있는 가능성을 고려해, 염료 발효액을 액체 배지에 희석하여 다시 액체 배지에 접종하고 균체의 성장이 확인되면 새로운 배지에 재희석해 종류가 다른 균주의 농화배양이 유도되는지를 확인하였으나, 종이 다른 새로운 균주는 선별되지 않았다. 따라서 본 연구에서 제안된 선택배지에서는 동일한 종만이 농화배양되는 것을 확인하였다. 이때 박테리아에 대한 선택성의 증가를 위해 진핵미생물의 성장을 제한하는 항생제의 사용도 병행하였다. 염색이 되지 않는 발효액에서도 6개의 균주가 농화배양되었으나, 본 연구의 목적과 달라 후속 연구를 진행하지 않았다 (data not shown).

전술한 대로 발효액의 주요 미생물은 식물 유래 전구체인 인디칸을 인디고로 전환시키거나 인디고 환원에 관여할 가능성이 높다. 전자의 경우는 가수분해 산물로 생성되는 glucose를 이용해 세포성장이 가능한 것으로 알려져 있다. 이러한 활성을 확인하고자 배당체인 indican을 유일 탄소원으로 첨가한 M9 최소영양배지에 배양하였을 때, 4개의 균주 (TPL19, AC84, W5044, 110-8)가 생장이 유도되었고 가수분해 산물인 indigo의 생성으로 인해 남색의 colony가 관찰되었다 (Fig. 3). 결과적으로 인디칸을 가수분해할 수 있는 β-glucosidase를 지니고 있음이 확인되었으며, 균주 110-8의 경우는 X-gal을 가수분해 할 수 있는 glycosyl hydrolase를 생산함이 확인되었다. 액체 배양된 세포 (OD₆₀₀=2.7±0.2)를 반응액 (50 mM Tris-Cl, pH 7~10, 1% Triton X-100, 그리고 1 mM indican)에 첨가해 3일간 반응시켰을 때, 4종의 균주에서 indican (1 mM) 으로부터 indigo로의 뚜렷한 전환 (1.6~33.8%)이 재 확인되었다 (data not shown).

3.4. 분리된 균주의 동정

Indican에 대해 활성이 있는 균주로 선별된 4가지 균주에 대한 정확한 동정을 위해 배양 특성과 생리/생화학적 특성을 분석하였다 (Table 1). 우선, Gram-staining 결과 모두 양성균임이 확인되었다. 하지만 Gram-staining의 경우 일부 그람양성균은 그람음성으로 염색되는 경우가 있다. 특히 혐기성 균에서 이런 현상이 빈번하며 경우에 따라 배양 기간에 의해서도 음성으로 탈색되는 경우가 있어 정확한 판독이 어렵다. 따라서 이러한 오류를 보안하기 위해 KOH test를 수행하였다. 이를 위해 네 가지 균을 3% KOH 용액과 혼합하여 점성이 나타나는 시간과 정도를 확인하였다. KOH test에서 15초 내외에 강한 점성이 나타나는 결과를 그람음성균으로 판독하고 있는데, 실험에 이용된 균들은 모두 점성이 나타나지 않았다. 균의 동정과정은 표현형 뿐만 아니라 생리활성의 특성을 확인함으로써 보다 정확한 계통을 확인할 수 있다. 따라서 pH 9 이상의 알칼리에서 자라는 특성을 바탕으로 각 균이 특정 시약에 반응하는지 여부를 확인할 수 있는 API ZYM kit를 이용하여 생리활성을 분석하였다. API ZYM kit 결과, 110-8, W5044, AC84는 비슷한 특성을 보이지만, TPL19는 세 가지 균주와는 다른 특성을 보였다 (Table 2). TPL19에서 뚜렷한 β-glucosidase 활성을 보였고, 네 균주 모두 α-galac-

Table 1. Phenotypic characters of enriched microorganisms from natural indigo-fermentation vats

Character	strain 1 ^a	2	3	4
Colony figment	Coral red	White	Light red	Yellow
Gram stain	+	+	+	+
pH range for growth	7.0-12	8.0-12	8.0-12	8.0-12
Temperature range for growth (°C)	20-37	20-32	20-32	20-32
NaCl range for growth (%)	0-5.0	0-5.0	0-5.0	0-5.0
KOH	-	-	-	-
Hydrolysis of casein	-	-	-	-
Hydrolysis of starch	-	-	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	-	-	-
Nitrate reductase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	-	+	+	+

^aStain 1, *Dietzia* sp. KDB1 (TPL19); 2, *Nesterenkonia* sp. KDB2 (AC84); 3, *Nesterenkonia* sp. KDB3 (W5044); 4, *Nesterenkonia* sp. KDB4 (110-8): +, positive; -, negative.

Table 2. Assay results of enriched microorganisms using ZYM kit

Character	strain 1 ^a	2	3	4
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	+	-	+	+
Lipase (C14)	+	+	-	+
Leucinearylaminidase	+	+	+	+
Valinearylaminidase	+	-	+	+
Crystinearylaminidase	+	+	+	+
Trypsin	-	-	+	+
α -chymotrypsin	-	+	+	+
Acid phosphatase	+	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	-	+	+
α -galactosidase	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	+	-	-
α -glucosidase	+	-	+	+
β -glucosidase	+	-	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-
α -mannosidase	-	-	-	+
α -fucosidase	-	-	-	-

^aStain 1, *Dietzia* sp. KDB1 (TPL19); 2, *Nesterenkonia* sp. KDB2 (AC84); 3, *Nesterenkonia* sp. KDB3 (W5044); 4, *Nesterenkonia* sp. KDB4 (110-8). Culture was performed on rich agar media and YPD agar media (pH10): +, positive; -, negative.

tosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -fucosidase에 대한 활성은 측정되지 않았다. TPL19의 경우, trypsin이나 oxidase test에서도 활성이 검출되지 않았다. 탄소원뿐 아니라 주요 영양분으로 사용되는 화합물을 대사하는 미생물의 경우, 각 성분에 대한 분해/흡수를 위한 효소를 갖는다. 선별된 균주들은 일반적인 질소원인 casein이나 gelatin에 대한 분해 효소 활성을 갖고 있지 않았다. 통성호기성 혹은 미세 호기성 균주나 혐기성 균주에서 많이 발견되는 nitrate reductase 활성은 모두 검출되었다.

상기 표현 형질과 생리적인 특성, 그리고 완전하게 재분석한 16S rRNA 서열을 바탕으로 천연인디고 발효액에서 선별

된 4가지 균주 TPL19, AC84, W5044, 110-8을 각각 *Dietzia* sp. KDB1 (KC433534), *Nesterenkonia* sp. KDB2 (KC433535), *Nesterenkonia* sp. KDB3 (KC433536), *Nesterenkonia* sp. KDB4 (KC433537)로 명명하였다.

3.5. TTC Assay와 indigo-carmin을 통한 환원능 확인

Indican으로부터 indigo의 생산이 가능하고, 발효액의 염기 조건에서 생존하는 것으로 확인된 균주들을 이용해 염액의 생성과정에서 중요한 환원력 (indigo의 leuco-indigo로의 전환)을 제공하는지를 시험하였다. 이를 위해 최종선별된 4종의 균주와 대조균으로 대장균 (*E. coli* strain XL1-Blue)을 배양하여 0.1~0.2 g의 cell을 획득하고, 50 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 재 부유시킨 후, 15 mM 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride를 처리하였다. 결과적으로 현재 일반적으로 쓰이는 화학 환원제 (45 mM Na₂S₂O₄)와 흡광도로 비교했을 때, 4개의 균주를 혼합한 샘플에서 최대 10배 높은 환원력이 나타남을 확인하였다. 대조균으로 이용된 대장균을 같은 조건에서 비교하였을 때, 각각의 균주의 15~43% 정도의 환원력만 측정되었다.

보다 유의한 방법으로 indigo와 유사한 구조를 가지며, 환원여부를 확인할 수 있는 지시약인 indigo-carmin을 이용하여 4개 균주의 환원력을 확인하였다. 4.3 mM의 indigo-carmin이 포함된 YPA media를 배양한 결과, 4개의 균주가 성장함에 따라 푸른빛의 배지에 노란색의 환이 생성되었다. 각 균주의 환원력에 따라 환의 크기는 다르지만 4개 균 모두 indigo-carmin에 대한 환원력을 지니고 있음을 확인하였다 (data not shown).

3.6. 선별 균주의 indigo 환원능에 의한 염색

환원력이 확인된 분리 균주를 이용해 실제로 indigo 환원과 염색과정에 적용하기 위한 laboratory scale의 염액 제조를 시도하였다. 천연인디고의 경우는 균주의 첨가가 없어도 어느 정도의 자연적인 환원이 이루어졌다. 이는 천연 인디고 제작 과정에서 첨가된 소석회나 멸균되지 않은 잔존 미생물에 의

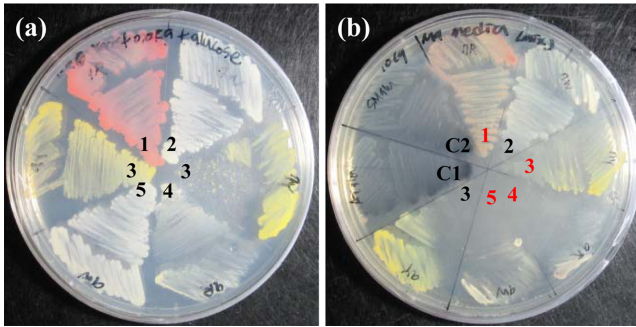


Fig. 3. Grown cells of enriched strains from natural indigo-fermentation on modified M9 media supplemented with 1 mM indican as a sole carbon source. Four strains have ability that produces indigo from indican (indoxyl- β -D-glucoside). (a) Grown cells on modified M9 media supplemented with yeast extracts 0.05 g, beef extracts 0.02 g and 1mM glucose as a control. (b) Grown cells on the modified M9 media containing yeast extracts 0.05 g, beef extracts 0.02 g and 1mM indican. The two typical strains, *Agrobacterium tumefaciens* and *Sinorhizobium meliloti*, were used as positive controls. C1, *Agrobacterium tumefaciens*; C2, *Sinorhizobium meliloti*; 1, *Dietzia* sp. KDB1; 2, *Nesterenkonkia* sp. Tibet-IBa2; 3, *Nesterenkonkia* sp. KDB4; 4, *Nesterenkonkia* sp. KDB3; 5, *Nesterenkonkia* sp. KDB2.

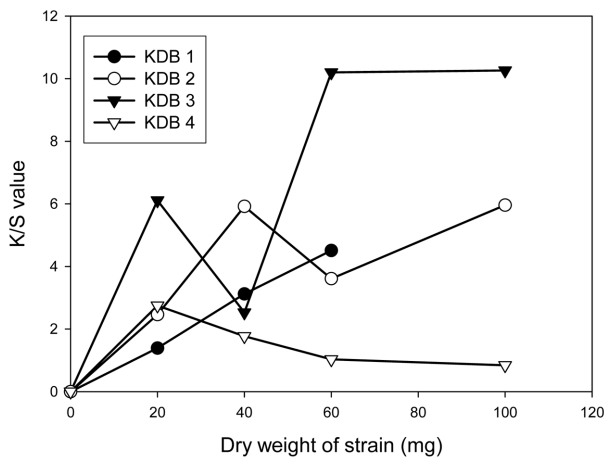


Fig. 4. Indigo-reducing ability of enriched cells for dyeing on ramie (K/S value). The experimental conditions and analyzing procedure were described in the method sections.

한 효과일 수 있다. 따라서 본 연구에서는 보다 분명한 선별균의 환원력을 평가하기 위해 시판중인 합성 인디고를 이용하였다. 대조균으로 이용한 균이 포함되지 않은 합성인디고는 환원이 이루어지지 않아 염색이 되지 않았다. 환원력은 경과일에 따른 염착량을 평가하였으며, 균주양에 따른 최대 염착량을 평가제시하였다(Fig. 4).

Dietzia sp. KDB1의 경우, 균주 7 mg을 첨가시 환원이 되지 않았고 균주 20 mg 첨가 시 6일째에 최대염착량 (K/S값 1.39)을 나타내었다. 균주 40 mg과 60 mg을 첨가한 경우에는 모두 하루 만에 염색이 개시되었으며, 균주량이 많을수록 더 높은 환원력을 보이는 것을 확인하고 그 이상의 균주양에서

는 실험을 하지 않았다. *Nesterenkonkia* sp. KDB2의 경우, 균주 20, 40, 60 mg은 8일째 각각 2.46, 5.92, 그리고 3.61의 최대염착량을 나타내었고 이후에는 감소하는 경향을 보였다. 균주 100 mg은 오히려 6일이나 더 늦은 14일째에 최대염착량 (K/S값 5.96)을 나타내었다. *Nesterenkonkia* sp. KDB3의 경우, 균주 20, 40, 60, 100 mg 첨가한 경우에는 각각 7, 5, 6, 6일째 최대염착량 3.04, 2.53, 8.93, 7.53을 나타내어 환원력이 가장 좋았다. *Nesterenkonkia* sp. KDB4는 20 mg 첨가시 최대염착량이 2.75로 가장 높게 나왔고, 이후 균주 첨가량이 증가하여도 최대염착량은 감소한 결과를 나타내어 다른 균주에 비해 환원력이 낮음을 알 수 있었다.

결과적으로 선별된 4개 균주 모두 합성인디고에 대한 환원력을 가지고 있으며, 전반적으로 경과일에 따른 환원력이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 선별된 4개 균주의 적정 배합을 통해 인디고의 환원개시일을 앞당기고, 높은 염착량을 나타낼 수 있는 환경을 유지하는 방법을 고안해야 할 것이다.

4. 결론

자연적인 쪽 식물 발효 환경에 존재하는 균총을 바탕으로 인디고 환원의 순수 생물학적 접근 방법은 가능한 것으로 확인되었다. 메타지놈 분석결과를 바탕으로 배양 가능한 균주들의 추가 발굴과 이를 이용한 생물학적 인디고 환원법을 정립할 경우, 관련된 연구분야에 새로운 응용 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

감사

이 논문은 2013년도 정부 (미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다 (No. 2013029705).

REFERENCES

- Hunter-Cevera, J. C. (1998) The value of microbial diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 278-285.
- Hu, H. Y., K. Fujie, H. Nakagome, K. Urano, and A. Katayama (1999) Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinones. *Water Res.* 33: 3263-3270.
- Weinbauer, M. G. and D. F. Wenderoth (2002) Microbial diversity and ecosystem functions - the unmined riches. *Electro. J. Biotechnol.* 5: 19-20.
- Kapur, M. and R. K. Jain (2004) Microbial diversity: exploring the unexplored. *World Federation of Culture Collection Newsletter* 39: 12-16.
- Satyanarayana, T., C. Raghukumar, and S. Shivaji (2005) Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Curr. Sci. India* 89:

- 78-90.
6. Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha (1992) Microfloral changes of the lactic acid bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol.* 20: 102-109.
 7. Yoon, J. H., S. S. Kang, T. I. Mheen, J. S. Ahn, H. J. Lee, T. K. Kim, C. S. Park, Y. H. Kho, K. H. Kang, and Y. H. Park (2000) *Lactobacillus kimchii* sp nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 50: 1789-1795.
 8. Altinoz, S. and S. Toptan (2003) Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry. *J. Food Compos. Anal.* 16: 517-530.
 9. Buolamwini, J. K. (2000) Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. *Curr. Pharm. Design* 6: 379-392.
 10. 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. C. Tang, G Eisenbrand, and L. Meijer (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* 1: 60-67.
 11. Pawlak, K., M. Puchalska, A. Miszczak, E. Rosloniec, and M. Jarosz (2006) Blue natural organic dyestuffs - from textile dyeing to mural painting. Separation and characterization of coloring matters present in elderberry, logwood and indigo. *J. Mass Spectrom.* 41: 613-622.
 12. Angelini, L. G., E. Campeol, S. Tozzi, K. G. Gilbert, D. T. Cooke, and P. John (2003) A new HPLC-ELSD method to quantify indican in *Polygonum tinctorium* L. and to evaluate beta-glucosidase hydrolysis of indican for indigo production. *Biotechnol. Progr.* 19: 1792-1797.
 13. 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.
 14. Minami, Y., Y. Shigeta, U. Tokumoto, Y. Tanaka, K. Yonekura-Sakakibara, H. Oh-oka, and H. Matubara (1999) Cloning, sequencing, characterization, and expression of a beta-glucosidase cDNA from the indigo plant. *Plant Sci.* 142: 219-226.
 15. Padden, A. N., V. M. Dillon, J. Edmonds, M. D. Collins, N. Alvarres, and P. John (1999) An indigo-reducing moderate thermophile from a woad vat, *Clostridium isatidis* sp nov. *Int. J. Systematic Bacteriol.* 49: 1025-1031.
 16. Aino, K., T. Narihiro, K. Minamida, Y. Kamagata, K. Yoshimune, and I. Yumoto (2010) Bacterial community characterization and dynamics of indigo fermentation. *Fems. Microbiol. Ecol.* 74: 174-183.
 17. Bechtold, T., E. Burtscher, A. Amann, and O. Bobleter (1993) Alkali-stable iron complexes as mediators for the electrochemical reduction of dispersed organic dyestuffs. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89: 2451-2456.
 18. Vuorema, A., P. John, M. Keskitalo, M. A. Kulandainathan, and F. Marken (2008) Electrochemical and sonoelectrochemical monitoring of indigo reduction by glucose. *Dyes Pigments* 76: 542-549.
 19. Roessler, A., O. Dossenbach, U. Meyer, W. Marte, and P. Rys (2001) Direct electrochemical reduction of indigo. *Chimia* 55: 879-882.
 20. Beloti, V., M. A. F. Barros, J. C. de Freitas, L. A. Nero, J. A. de Souza, E. H. W. Santana, and B. D. G. M. Franco (1999) Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Rev. Microbiol.* 30: 137-140.
 21. Zapata, J. M., C. Salinas, A.A. Calderón, R. Muñoz, and A. Ros Barceló (1991) Reduction of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride by the Kcn-Insensitive, Salicylhydroxamic Acid-Sensitive Alternative Respiratory Pathway of Mitochondria from Cultured Grapevine Cells. *Plant Cell Reports* 10: 579-582.
 22. Dube, E., F. Shareck, Y. Hurtubise, C. Daneault, and M. Beauregard (2008) Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolorisation of an indigo dye. *Appl. Microbiol. Biot.* 79: 597-603.