

2007年 8月

碩士學位論文

재조합 대장균을 이용한
인디고의 최적 생산

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

韓 貴 煥

재조합 대장균을 이용한

인디고의 최적 생산

Optimum production of indigo using
recombinant *Escherichia coli*

2007年 8月

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

韓 貴 煥

재조합 대장균을 이용한
인디고의 최적 생산

指導教授 金時郁

이 論文을 工學碩士 學位申請 論文으로 提出함.

2007年 8月

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

韓 貴 煥

韓貴煥의 碩士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 柳 鎭 鐵 印

委 員 朝鮮大學校 教授 金 時 郁 印

委 員 朝鮮大學校 教授 申 鉉 載 印

2007年 8月

朝鮮大學校 大學院

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	I
LIST OF TABLES	III
LIST OF FIGURES	IV
Abstract	VI
제 1 장 서론	1
제 1 절 인디고 화합물 (Indigo compound)	1
제 2 절 FMO를 이용한 인디고이드 화합물의 합성경로 및 생산	2
제 3 절 기술 및 연구 동향	6
제 4 절 연구 목표	7
제 2 장 실험 재료 및 방법	11
제 1 절 효소 및 시약	11
제 2 절 사용 균주 및 플라스미드	11
제 3 절 FMO 유전자 클로닝	11
1. Chromosomal DNA extraction	11
2. fmo 유전자 증폭	13
3. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리	13
4. Ligation	14
5. FMO 유전자의 형질전환	14
6. 형질전환 된 균체로부터 plasmid DNA 분리 및 확인	14
제 5 절 인디고 분리 및 특성 분석	15
제 6 절 인디고 및 인디루빈 생성량 측정	16
제 7 절 배지 조성 변화에 따른 인디고 생산량의 변화	16
제 8 절 반응표면분석법을 이용한 인디고 생산 배지 및 생산 조건 최적화	19
1. 생산 배지의 최적화	19
2. 생산 조건의 최적화	20
제 9 절 인디고 생산 조건	23
1. Water - organic solvent를 이용한 바이오 인디고 생산	23
2. 연속식 반응기를 이용한 인디고 생산	23

3. 3000L 반응기를 이용한 인디고 생산	24
제 10 절 생산된 인디고를 이용한 식물 염색	24
제 3 장 결과 및 고찰	26
제 1 절 FMO유전자의 cloning 및 발현	26
1. pBlue 1.7 genomic library 제작 및 형질 전환	26
2. 인디고 분리 및 특성 분석	26
제 2 절 유기화합물 및 아미노산 첨가에 따른 인디고 생산량의 변화	32
1. Glucose, Lactose 및 Fructose 첨가에 따른 인디고 생산 비교	32
2. 아미노산 첨가에 따른 인디고이드 화합물의 생산량 변화	34
제 3 절 재조합 대장균을 이용한 인디고 생산	36
1. 중심합성계획법에 따른 배지의 최적화	36
2. 중심합성계획법을 이용한 생산 조건의 최적화	44
4. 연속식 반응기를 이용한 바이오 인디고 생산	52
5. 3000L 발효조를 이용한 인디고 생산	58
제 4 장 결론	64
제 5 장 참고 문헌	67

LIST OF TABLES

Table 1. Composition of standard mineral base medium	12
Table 2. Experimental range and levels of the independent variables of culture medium	21
Table 3. Experimental range and levels of the independent variables of culture condition	22
Table 4. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points	37
Table 5. Analysis of variance for quadratic model	38
Table 6. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)	39
Table 7. Experimental design used in RSM studies by using two independent variables with five center points	45
Table 8. Analysis of variance for quadratic model	46
Table 9. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)	47
Table 10. Color fastness of bio indigo produced from mass production system.	63

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Mono- and di- indole derivatives with biological activity.	4
Fig. 2. Generally accepted pathway for the oxygenase-mediated synthesis of indigoid compounds from indole.	5
Fig. 3. Analysis of patents application trend (each countries).	8
Fig. 4. Analysis of patents application trend (each fields).	9
Fig. 5. Analysis of papers publication trend.	10
Fig. 6. Standard curve for the determination of the indigo concentration.	17
Fig. 7. Standard curve for the determination of the indirubin concentration.	18
Fig. 8. Extraction of indigo from culture medium using organic solvent such as diphenylmethane and DMSO. T1:culture medium 3ml and DMSO 3ml; T2:culture medium 3ml, DMSO 3ml and diphenylmethane 3ml, vortexing; T3:culture medium 3ml, DMSO 3ml and diphenylmethane 3ml; T4:culture medium 3ml, and diphenylmethane 3ml, vortexing; T5:culture medium 3ml and diphenylmethane 3ml.	25
Fig. 9. Scheme for the construction of plasmid pBlue 1.7.	28
Fig. 10. Production of indigo from tryptophan by recombinant E. coli cells harboring flavin containing monooxygenase gene.	29
Fig. 11. Comparison of absorption spectra between chemical- and bio-indigo dissolved in DMSO.	30
Fig. 12. Thin layer chromatography of chemical and Bio indigo deriva ...	31
Fig. 13. Effect of glucose concentration on the indigo production when recombinant E. coli was cultured on the tryptophan medium.	33
Fig. 14. UV-visible spectra of indigo derivatives formed by recombinant	

<i>E. coli</i> cells under different medium compositions. Pigments are dissolved in DMSO.	35
Fig. 15. Response surface plot showing the effect of tryptophan and yeast extract and also their mutual effect on the production of indigo (mg/ℓ).	40
Fig. 16. Response surface plot showing the effect of tryptophan and NaCl and also their mutual effect on the production of indigo (mg/ℓ).	41
Fig. 17. Response surface plot showing the effect of yeast extract and NaCl and also their mutual effect on the production of indigo (mg/ℓ).	42
Fig. 18. Comparison of indigo production in original tryptophan medium and new tryptophan medium.	43
Fig. 19. Response surface plot showing the effect of pH and Temperature and also their mutual effect on the production of indigo (mg/ℓ).	48
Fig. 20. Scheme for the construction of water-organic system., reactor-bio indigo fermentation reactor., Mix tank-it was mixed bio indigo and diphenylmethane.	50
Fig. 21. Comparison of indigo production of recombinant <i>E. coli</i> in control(tryptophan Medium) with 2 phase system(diphenylmethane and tryptophan medium).	51
Fig. 22. Continuous fermentation system for the production indigo in the 5 L fermentor.	54
Fig. 23. Effect of temperature change maximum production of indigo in the continuous fermentation.	55
Fig. 24. Effect of pH on the indigo production in the continuous fermentation.	56
Fig. 25. continuous fermentations was performed under the optimum	57
Fig. 26. Mass production of indigo in the 3000 L fermentor. Fresh medium containing tryptophan 1.4 g/l; 24 h-Culture of	

recombinant E. coli expressing FMO; Isolated Indigo by continues centrifuge.	59
Fig. 27. Mass production of indigo by recombinant E. coli in the 3000 L fermenter.	60
Fig 28. Dyeing of various fabrics using bio indigo.	62

Abstract

Mass production of indigoid compounds by recombinant *Escherichia coli*

Han, Gui Hwan

Advisor : Prof. Kim, Si Wouk, Ph.D.

Department of Environmental

Engineering,

Graduate School of Chosun University

Flavin-containing monooxygenase has been identified in organisms from bacteria to humans. A fragment of FMO from *Methylophage aminisulfidivorans* MP^T has been cloned and expressed in *Escherichia coli* DH5a. Growth of the recombinant *Escherichia coli* DH5a pBlue 1.7 in tryptophan medium (2 g tryptophan, 10 g NaCl, 5 g yeast extract, and 50 mg ampicillin per liter) resulted in the formation of indigo.

In the batch reaction, the recombinant *E. coli* DH5a pBlue 1.7 produced 920 mg/L of bio indigo for 20 h cultivation in 5 L reactor. Cultured in the 3000 L reactor containing tryptophan medium in the same culture conditions, the same concentration of indigo could be obtained.

To enhance indigo production, a novel medium system was constructed. The cultivated medium containing indigo was transferred to the bottle and mixed with diphenylmethane. Next, the mixture was applied to the cylindrical column (3 X 30 cm) filled with diphenylmethane, and indigo was moved into the diphenylmethane layer. The isolated medium was circulated into the bioreactor. In the water-organic system, 1.4 g/L of indigo was produced from the medium containing 3 g/L of tryptophan.

In addition, continuous system was constructed. It investigated the optimum continuous culture conditions such as medium pH, temperature,

tryptophan concentration, and feeding rate. The optimum conditions were as follows: pH 7.0, temperature 35°C, and tryptophan concentration 3 g/l. After indigo concentration reached to 0.8 g/l in the 2 g/l tryptophan medium, a fresh medium containing 3 g/l tryptophan was continuously fed at a rate of 2.8 ml/min during 140 h. Under this condition, the recombinant *E. coli* cells produced 5.6 g/L/day of indigo.

Bio indigo was applied to dye several fabrics such as cotton, silk, hemp, and ramie. Colour fastness value to light, washing, and perspiration were 3, 4-5, and 4-5, respectively. We concluded that bio indigo appeared to have a lot of benefits that enable the dyed materials to exhibit their natural colors.

제 1 장 서론

제 1 절 인디고 화합물 (Indigo compound)

인디고(Indigo)는 가장 오래된 염료 중의 하나로 특히 청바지의 원단인 데님의 염료로 주로 사용되어지고 있으며 이외의 면, 모, 마 등의 직물 염색에도 응용되어지고 있다. 또한 인디고를 이용한 제품들의 대중적인 인기로 생산량이 증가 되고 있는 추세이다. 2002년 기준 매년 22,000톤이 생산되어지고 있으며 약 2억불에 해당되는 부가가치를 창출하고 있다.¹⁾ 초기 인디고는 식물체인 *Polygonum tinctorium* 등으로부터 소규모 생산을 통해 사용되어져 왔다. 1882년 A. Bayer 에 의해서 화학합성법이 개발된 후 대량생산이 가능하게 되었으며, 그 후 합성메커니즘, 공정의 개선이 이루어졌으며, 현재 산업적으로 가장 많이 이용되고 있는 화학 인디고 합성 방법은 아닐린(aniline)을 원료로 하여 페닐글리신(phenylglycine)을 만들고 이를 알칼리 용융하는 방법이다. 페닐글리신(phenylglycine) 제조에는 모노클로로초산(monochlorac-
etate)을 쓰는 방법이 일반적이나, 포르말린(formalin)과 시안나트륨(sodium cyanide)을 이용하기도 한다.

화학합성 인디고 염료는 원료 및 생산과정에서 발생하는 부산물들이 잠재적 독성을 가지고 있어 배출될 경우 환경오염 및 점막, 상기도, 눈, 피부자극, 기침, 천명, 후두염, 숨 가쁨, 두통, 오심, 구토, 발암성, 피부 알레르기 반응 등 인체에 피해를 발생시킨다. 화학합성 인디고로 인한 직접 또는 간접적인 피해 때문에 화학합성 인디고 생산 산업은 전형적인 공해 산업으로 인식되어 환경규제 대상 산업으로 분류되고 있다. 이러한 추세는 친환경적인 생산방법의 개발을 요구하게 되었으며, 이 중 미생물을 이용한 천연 인디고의 합성은 발효, 세포분리, 정제 등의 간단한 과정을 통하여 화학합성 인디고와 질적 손상이 없는 천연 인디고를 생산할 수 있으며, 무해한 원료를 사용하여 맹독성의 산업 폐기물 대신 바이오메스와 이산화탄소를 남김으로서 화학합성방법의 대안이 되고 있다. 또한 이때 생산되는 천연인디고는 인체에서 aryl

hydrocarbon receptor와도 높은 친화력을 가지는 물질로 알려져 있다. 이런 인디고의 상업적 생산을 위해서 유전공학적 기술을 이용한 합성들이 시도되었고 이런 합성 방법으로 화학적 합성에 비해 질적 손상이 없는 천연 인디고가 대량생산 될 수 있다는 것을 증명하였다.^{2),3),4),5),6),7)} 또한 최근에는 monooxygenas

-e, dioxygenase 유도체 화합물들이 그 자체의 약리효과나 생물학적 활성으로 인해 주목 받고 있다. 예를 들어서 한약재인 당귀의 주성분인 indirubin은 indigo의 이성질체로서 만성 백혈병 치료제로 예로부터 중국에서 약제로 사용되어 왔으며, indole acetic acid(IAA)는 식물의 성장에 관련된 호르몬으로 줄기 성장을 촉진한다고 알려져 있다(Fig. 1). 뿐만 아니라, oxygenase에 의해 형성되는 mono-, di-indole 유도체들은 인체에서 생물학적 기능을 조절하기 위해 이용되는 잠재력을 지니고 있다.

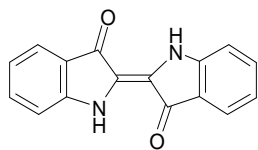
제 2 절 FMO를 이용한 인디고이드 화합물의 합성경로 및 생산

미생물을 이용한 천연인디고의 생산은 1928년 Gray에 의해서 최초로 보고 되었으며 이후 많은 연구자들에 의해 미생물을 활용한 천연인디고의 생산이 보고되었다. 미생물을 이용한 천연인디고의 생산과 관련된 효소는 monooxygenase, dioxygenase 그리고 cytochrome P450 등이 있으며 각각의 효소가 포함된 유전자를 *Escherichia coli* 또는 *Pseudomonas* 등에 도입하여 glucose 또는 nutrient medium 에서 천연인디고를 생산하였다. 그러나 미생물을 활용한 천연인디고의 생산은 아직 화학합성방법을 대체할 만큼의 인디고를 생산하지 못하고 있는 실정이다.

Methylotrophic bacteria는 에너지원과 탄소원으로 환원상태의 일원자 탄소를 이용하는 세균집단을 일컫는다. 본 실험실에서 분리한 facultative marine methylotrophic bacterium인 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T는 천연인디고의 생산에 관여하는 Flavin-containing monooxygenase(fmo) 유전자를 가지고 있다. Flavo protein의 일종인 FMO는 효소활성이 높고 기질특이성이 우수하며 heteroatom을 포함하는 물질 또는 아민류를 산화시키는 것으로 알

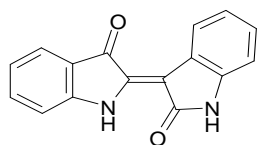
려져 있다.⁷⁾

재조합 미생물을 이용한 인디고 화합물의 합성에 사용되지는 기질은 주로 glucose 또는 미량의 indole를 이용하고 있다. 전자인 glucose를 이용한 생산과정의 경우 최종 생산물이 생산되기까지 관여하는 유전자의 수가 많고 대사 과정이 복잡하다는 단점을 가지고 있으며, 후자의 경우 indole 자체가 가지고 있는 독성 때문에 미생물의 성장을 제한할 뿐 아니라 생산량의 한계를 가지고 있다. 반면 본 연구에 사용한 FMO 유전자의 경우는 단일 유전자를 이용하여 대사 과정이 간단할 뿐만 아니라 tryptophan을 기질로 사용함으로써 인디고 화합물의 대량 생산에 적합하다. FMO를 포함하는 재조합 대장균을 이용한 인디고 화합물의 합성은 먼저 숙주인 대장균에 존재하고 있는 tryptophanase에 의해서 배지 내의 tryptophan이 indole로 전환된다. 이 indole은 FMO에 의해서 2-hydroxyindole, 3-hydroxyindole 그리고 isatin으로 전환되고, 이후 산소 존재하에 자발적인 반응에 의해서 인디고 또는 인디루빈(indirubin) 및 기타 인디고 화합물을 생산하게 된다(Fig. 2).^{8),9)}



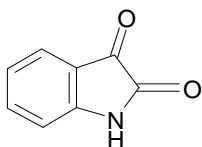
Indigo

aryl hydrocarbon receptor



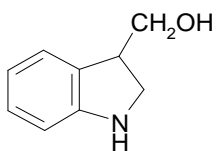
Indirubin

Anti- agent
aryl hydrocarbon receptor



Isatin

Monoamine oxidase inhibitor



Indole-3-carbinol

Cancer preventive natural
product

Fig. 1. Mono- and di- indole derivatives with biological activity.

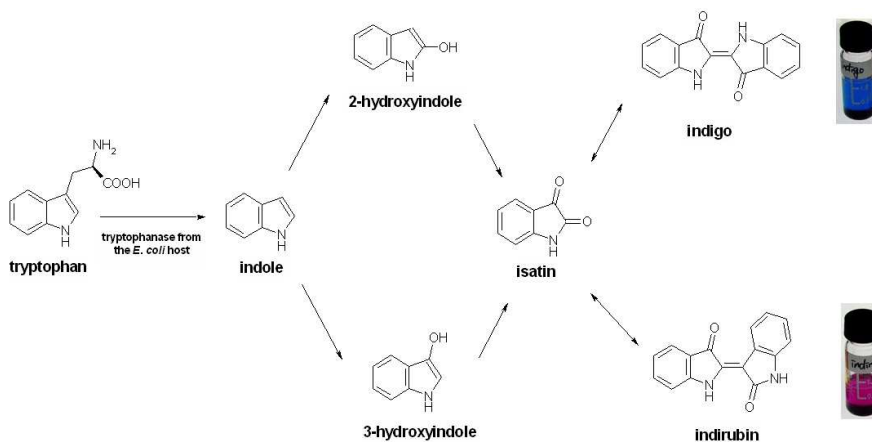


Fig. 2. Generally accepted pathway for the oxygenase-mediated synthesis of indigoid compounds from indole (Adapted from Meyer *et al.*, 2002).

제 3 절 기술 및 연구 동향

화학합성 및 천연 인디고와 관련한 특허는 1986년부터 현재까지 총 287건이 등록되었으며, 특허 출원 국가는 일본, 미국, 유럽국가 순이었다. 출원된 특허는 화학합성 인디고 227건(79%), 천연 인디고 57건(20%), 인디루빈 3건(1%)으로 분류되었다(Fig. 3). 조사한 기간 중 1986년부터 2004년까지는 매년 약 3%의 성장률을 보였으며, 2004년 이후 감소 추세를 나타냈다(Fig. 4). 이는 화학합성 인디고의 생산에 대한 규제가 시작된 시점과 유사하며, 인디고와 관련된 전체 특허 중 화학합성 인디고 관련 특허의 비중을 고려할 때 화학합성 인디고와 관련된 기술이 쇠퇴기에 이르렀음을 시사한다. 반면, 같은 기간 중 천연 인디고 생산 기술 중 미생물을 이용한 천연 인디고 생산과 관련된 논문은 매년 7%씩 증가했다. 발표된 논문의 경우 70%가 인디고 생산과 관련된 유전자 또는 효소의 기능분석과 관련된 것이며 천연 인디고 합성에 관련한 논문은 30%에 불과했다(Fig. 5). 등록된 특허와 논문을 종합한 결과 미생물을 이용한 천연 인디고 생산 기술은 초기 단계로 분석된다.

미생물을 이용한 인디고의 생산은 제1장 제2절에서 나타낸 바와 같은 일련의 대사 과정을 거쳐 최종 산물로 인디고로 생산되고 그밖에 소량의 인디루빈과 기타 인디고 화합물이 생산된다. 최근 미생물을 이용한 천연인디고의 대량 생산을 위해 균주 개량 및 돌연변이를 이용한 연구가 진행되고 있다.^{10),12),14)} 또한 최근 인디고 화합물 중의 하나인 인디루빈의 약리학적 기능이 보고되면서 인디고 화합물 중 매우 고가인 인디루빈의 생산에 관한 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 연구의 대부분은 유전자 조작 기술을 통하여 인디고 화합물의 생산에 관여하는 유전자의 돌연변이를 유도함으로써 indole로부터 2-hydroxyindole 및 3-hydroxyindole 그리고 isatin으로 전환되는 과정을 조절하게 되고, 최종적으로 인디루빈의 생산량이 높아지는 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구실에서 개발한 인디고 화합물 생산 균주인 *E. coli* DH5a pBlue 1.7에서 인디고 화합물 생산에 관여하는 FMO 유전자의 돌연변이를

유도함으로써 천연인디고 및 인디루빈의 생산율이 증가 할 것으로 예상된다.

제 4 절 연구 목표

앞에서 언급한 바와 같이 mono- 및 di-oxygenase는 자체적으로 생물학적인 조절능력을 잠재적으로 가지고 있을 뿐만 아니라, 생산되는 인디고 화합물 또한 식물 염료 및 의약품 등으로서의 개발 가능성이 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 현재 생산되어지고 있는 인디고 화합물의 대부분이 화학합성에 의해 생산되어지고 있으며 이에 따라 발생하는 2차 오염은 환경 또는 인체에 피해를 주고 있다. 또한 식물체 및 미생물 등으로부터 생산되는 경우 대량 생산이 어려워 고가로 유통되어 천연 염료나 의약품으로 이용되기 어려운 실정이다.

본 연구실에서는 인디고 화합물을 유전자 재조합 대장균에서 생산하고자 *M. aminisulfidivorans* MP^T에 존재하는 fmo 유전자를 유전자 형질 전환 기술을 도입하여 재조합 대장균인 *E. coli* DH5a pBlue 1.7을 개발함으로써 인디고 화합물의 생산 및 대량생산의 가능성을 확인하였다. 본 연구에서는 이 재조합 대장균의 인디고 화합물 생산율을 향상시키기 위해 최적의 배양 조건 및 공정을 개발하고자 하였다.

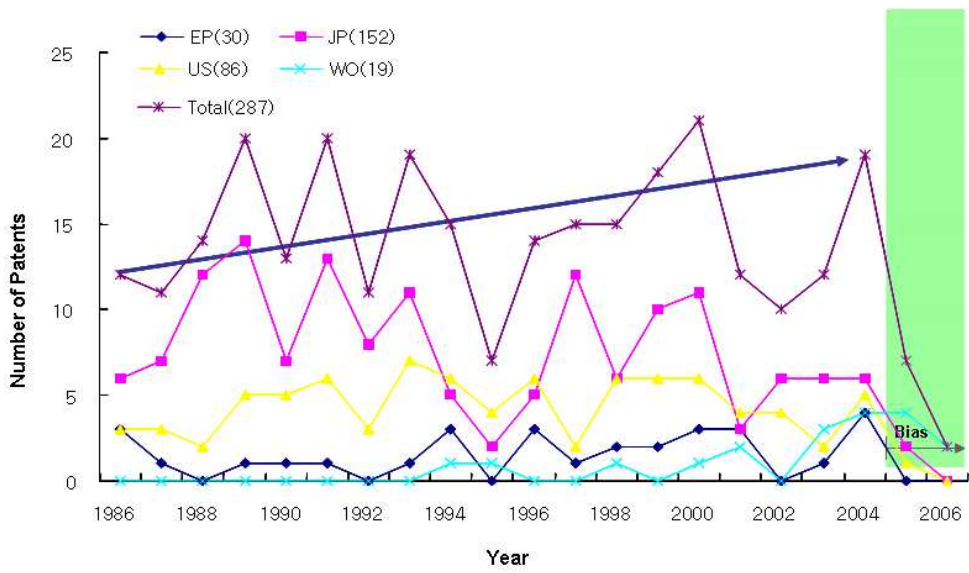


Fig. 3. Analysis of patents application trend (each countries).

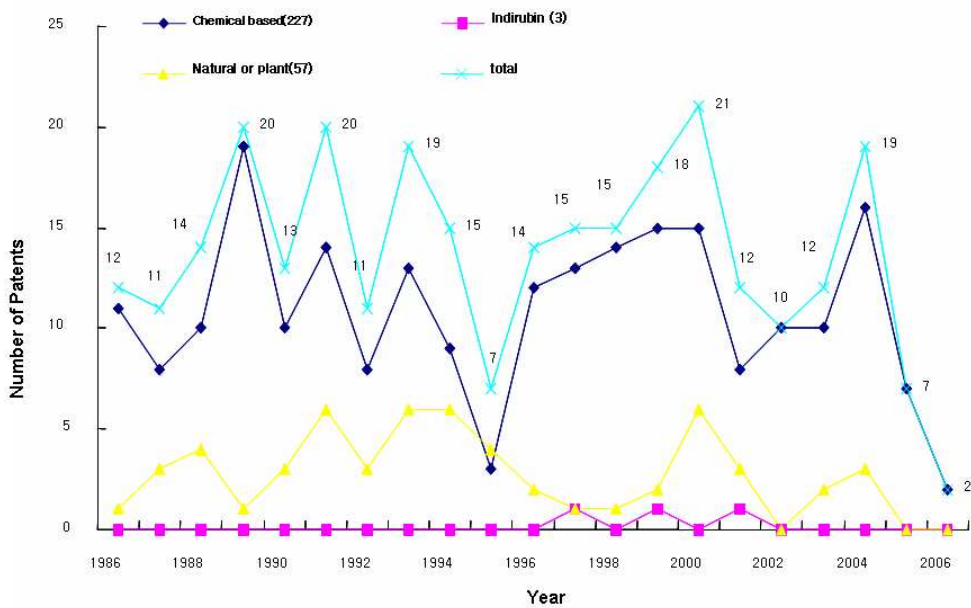
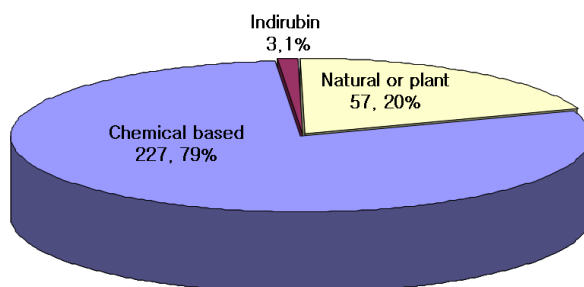


Fig. 4. Analysis of patents application trend (each fields).

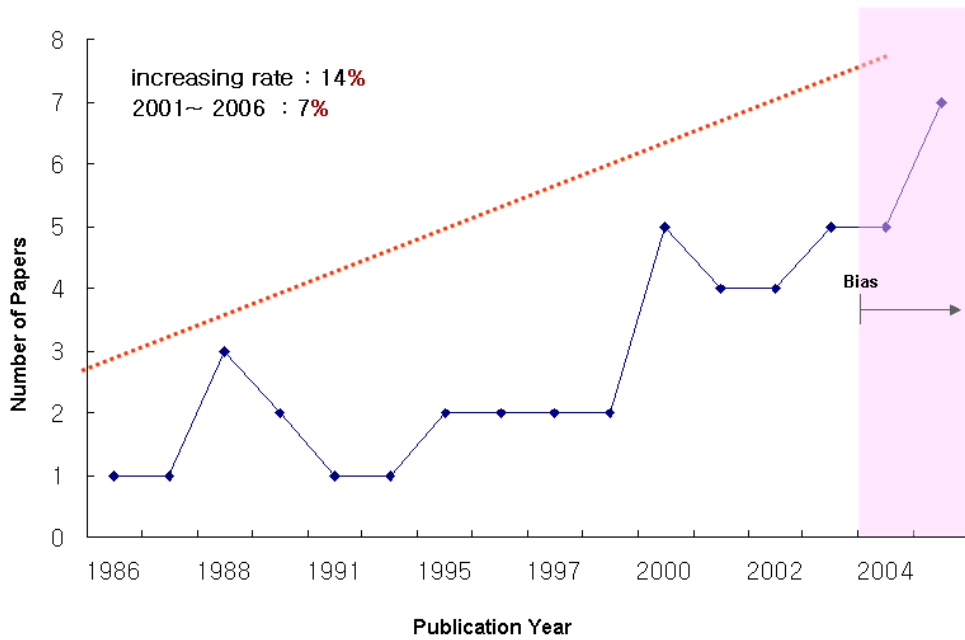
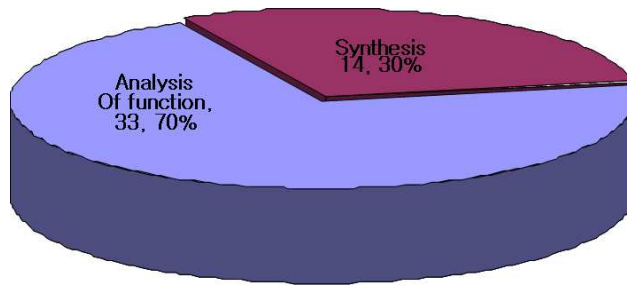


Fig. 5. Analysis of papers publication trend.

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 효소 및 시약

사용한 시약은 restriction enzymes, DNA ligase, alkaline phosphatase (Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan), tryptophan(Ajinimoto Co., Japan) 및 indigo(Fluka)이었다.

제 2 절 사용 균주 및 플라스미드

fmo 유전자의 cloning을 위해서 본 실험실에서 분리한 *M. aminisulfidivora* -ns MP^T을 사용하였으며, 3%(w/v) NaCl과 탄소원 및 에너지원으로써 1 % (v/v) methanol을 포함하는 standard mineral base medium(Table 1)에서 호기적인 조건으로 배양 온도를 30 °C로 조절하여 배양하였다.

그리고 DNA 조작과 형질전환에는 *E. coli* strain DH5a를 이용하였고, 사용한 플라스미드는 pBluescript SK(+) vector(Fermentas co, canada)를 사용하였다. 유전자 재조합 *E. coli*는 ampicillin(50 µg/ml)이 추가된 LB medium에서 37°C로 24시간동안 배양하였다.

제 3 절 FMO 유전자 클로닝

1. Chromosomal DNA extraction

Goldberg 와 Ohman(1984)이 제시한 방법을 이용하여 준비하였다. 50 ml의 기본염류배지에 1 % methanol이 첨가된 액체배지에서 *M. aminisulfidivorans* MP^T 균주를 지수성장기까지 배양하여 균체를 모은 뒤(10,000 × g, 15분, 4 °C), 균체를 멸균된 증류수로 두 번 씻고 10ml의 Solution I (50 mM glucose, 10 mM, EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 재현탁 하였다. 여기에 1 ml의 lysozyme 용액 (50 mg/ml)과 0.5 ml RNase(2 mg/ml) 및 0.1ml proteinase K(50 mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 1시간 방치한 다음 0.6 ml의 10 % SDS

solution

Table 1. Composition of standard mineral base medium

Components	Amounts
Na ₂ HPO ₄	2.34g
KH ₂ PO ₄	6.1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.01 g
Ferric EDTA solution ^a	0.1ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.5mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1mg
Cobalt nitrate	0.1mg
Sodium Borate	0.1mg
Sodium molybdate	2.0mg
D.W.	1ℓ

^a The ferric EDTA solution was made by combining a solution containing 17.9 g of solution EDTA and 3.23 g of KOH dissolved in 186 ml distilled water and a solution containing 13.7 g of FeSO₄·7H₂O in 364 ml of disstilled water. The mixture was bubbled overnight with air, and stored in a brown glass bottle.

을 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 방치 하였다. 반응액에 1 ml의 mercaptoethanol을 가한 후 반응액의 0.5배에 해당하는 3M sodium acetate solution(pH 5.2)을 가하여 반응액에 동일양의 chloroform을 처리하였다. 이후 15,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였고, 이렇게 얻은 상등액에 0.6배에 해당하는 isopropanol을 가한 후 chromosomal DNA pellet을 회수하여 70 % ethanol로 세척한 다음 건조하였다. 3 ml의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여 실험에 사용하였다.

2. fmo 유전자 증폭

M. aminisulfidivorans MP^T의 FMO 유전자를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 pBlue 2.2의 염기서열을 참고하여 제작하였다. fmo 유전자의 증폭은 *M. aminisulfidivorans* MP^T의 chromosomal DNA를 template DNA로 하여, 총 반응액을 50 μ l로 하여 수행하였다. 반응혼합액의 조성은 TaqTM reaction buffer[50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂], 0.2 mM dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10~50 ng의 template DNA, 100 ng의 3'과 5' primer, 2.5 unit의 TaqTM DNA polymerase이며, PCR은 geneAMP PCR system 2400 기기를 이용하여 실행하였다. 그리고 PCR의 최종 반응산물은 AccuPrepTM PCR Purification kit(Bioneer Co., Korea)을 이용하여 정제하였다.

3. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리

PCR을 통해 증폭된 DNA와 vector에 5~10 units의 제한효소 SacI과 XbaI으로 각각 37℃에서 1시간 반응 시켰다. Vector와 insert DNA를 제한효소로 각각 처리한 후에 1%(w/v) agarose gel에서 전기영동 하였다. Gel로부터 vector와 insert DNA 부분을 잘라내어 용해시키고, AccuPrepTM Gel Purification kit (Bioneer Co., Korea)를 사용하여 gel로부터 원하는 DNA 단편을 분리 정제하였다.

4. Ligation

Vector와 insert DNA를 1 : 3의 몰수비로 넣어주었고, 10× ligation buffer (300 mM Tris-HCl(pH 7.8), 100 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 10mM ATP)와 3 unit의 T4 DNA ligase를 첨가하여 총 반응액을 15 μl 로 하여 4 °C에서 24시간 반응시켰다.

5. FMO 유전자의 형질전환

LB medium 5 ml에 *E. coli* DH5a 단일 콜로니를 접종하여 37 °C, 200 rpm으로 12시간 배양하였다. 200ml SOB medium에 배양액 1%를 접종하였고, OD₆₀₀가 0.4 ~ 0.7로 될 때까지 배양한 다음 얼음물에서 10분간 방치한 후 배양액을 5,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 상등액은 버리고 TB buffer 67ml를 가하여 재 현탁한 후 같은 조건으로 원심 분리한 후 다시 TB buffer 16ml 와 DMSO 1.2 ml에 재현탁하여 competent cell을 제조하였다. 이렇게 제조한 competent cell suspension 100 μl 를 멸균한 eppendorf tube에 넣고, ligation한 DNA 15 μl 를 첨가한 뒤 얼음물에서 30분간 방치하였다. 이후에 42°C에서 90초간 반응시킨 후 LB medium 0.9 ml를 첨가하여 37 °C incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 배양액 100 μl 을 ampicillin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 LB agar plate에 도말하여 37 °C에서 배양한 후 생성된 콜로니를 형질전환 된 *E. coli* 균주로 선발하였다.

6. 형질전환 된 균체로부터 plasmid DNA 분리 및 확인

Alkaline lysis 방법으로 형질전환된 대장균으로부터 plasmid를 분리하였다. 세균배양액 1ml를 Eppendorf tube에 넣고 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물을 2 mg/ml lysozyme이 녹아있는 100 μl 의 용액 I에 현탁하였다. 용액 I은 50mM 포도당과 10mM EDTA가 들어 있는 25mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)을 사용하였다. 현탁액을 37°C에서 20분간 방치한 후 새로 만든 용액 II(0.2N NaOH와 1% SDS 혼합액)를 200 μl 첨가하여 서너번 조심스럽게 흔들어 혼합시킨 다음 얼음에 5분간 방치하였다. 반응이

끝난 용액에 150 μ l의 용액 III(5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, 증류수 28.5 ml)을 첨가한 후 혼합, 얼음 속에서 5분간 방치하였다. 이후 50 μ l의 chloroform를 가한 후 vortex 하였다. 혼합된 액을 15,000 \times g 에서 5분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액의 2배에 해당하는 ethanol을 가한 후 15,000 \times g 에서 5분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 상등액을 제거한 후 70% ethanol를 가하였다. 원심분리하여 상등액을 제거 후 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 침전물을 건조시켰다. DNase가 제거된 pancreatic RNase(20 μ g/ml) 1 μ l와 TE buffer 50 μ l를 가하여 침전물을 녹인 후 실험에 사용하였다. 분리한 plasmid DNA를 5-10 units의 제한효소 SacI 과 XbaI으로 처리하였고, 반응액을 혼합한 뒤 약 30초간 원심분리 한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 다음 전기영동 하였다. 형질 전환된 plasmid DNA를 선별하여 pBlue 1.7라고 명명하였다.

제 5 절 인디고 분리 및 특성 분석

청색소를 생산하는 유전자를 포함하고 있는 *E. coli* DH5a를 100 ml LB 배지에서 37 $^{\circ}$ C로 16시간 동안 배양하였다. 배양액을 10,000 \times g로 1분간 원심분리하여 균청색의 pellet을 획득하였다. 균청색의 pellet을 증류수로 두 번에 걸쳐 씻은 후 10 ml의 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma)로 재현탁 하였다. 이 후 microprobe를 이용하여 sonication하였다. 10,000 \times g 로 1분간 원심분리한 후 상층액을 얻어 인디고 분석에 사용하였다. Ultrospec 2000 Spectrophotometer(Amersham Bioscience)를 이용하여 indigo의 흡수파장을 측정하였다. 이때 파장범위는 400에서 700nm로 하여 측정하였다. Thin layer chromatography는 배양액 100 μ l를 10,000 \times g로 1분간 원심분리하여 균청색의 pellet을 획득한 후 1 ml의 DMSO에 재현탁하여 silica gel TLC plate (Merck)에 spot하였다. Mobile solution은 methanol과 acetone의 혼합비율이 50 : 50(v/v) 용액을 사용하였고 화학인디고를 대조군으로 사용하여 분석하였다.

제 6 절 인디고 및 인디루빈 생성량 측정

인디고 및 인디루빈 생성량은 시간별로 시료 1 ml를 10,000 × g로 원심 분리하여 상등액을 제거 후 DMSO 10 ml을 가하여 재현탁 하였다. DMSO에 현탁된 sample을 microprobe를 이용하여 sonication하였다. 10,000 × g 로 원심분리하여 cell debris를 제거한 후 인디고는 흡수파장이 최대가 되는 620 nm에서(Fig. 6), 인디루빈은 540nm(Fig. 7)에서 흡수파장을 측정한 후 인디고 및 인디루빈 생성량을 측정하였다. 인디고 및 인디루빈의 standard curve는 화학 합성된 인디고(Fluka) 및 인디루빈(Biomol)을 DMSO에 녹인 후 측정하였다.

제 7 절 배지 조성 변화에 따른 인디고 생산량의 변화

인디고 생산에 사용된 tryptophan 배지(tryptophan 2 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L)에 아미노산, glucose, lactose, fructose를 첨가하여 인디고 생산량의 변화를 측정하였다. 세포대사 초기 탄소원으로 이용되기 쉬운 glucose를 각각 5 ~ 100 mM 첨가하여 37 °C에서 21시간 동안 인디고 생산량 변화를 측정하였으며, lactose 및 fructose 를 각각 100mM 첨가하여 인디고 생산량 변화를 관찰 하였다. tryptophan 배지 중 yeast extract의 아미노산 조성을 조사한 결과 기타 아미노산에 비하여 시스테인, 아스파라틱산, 아르기닌의 농도가 상대적으로 낮았다. 이 아미노산을 각각 2 g/L 씩 첨가하여 인디고 생산량 변화를 관찰 하였다.

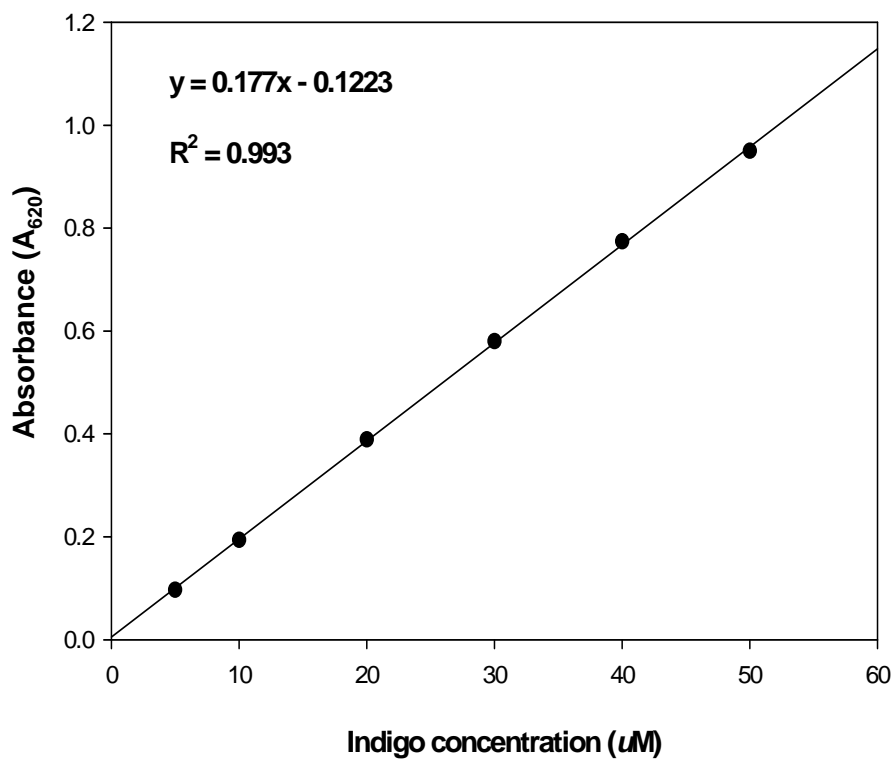


Fig. 6. Standard curve for the determination of the indigo concentration.

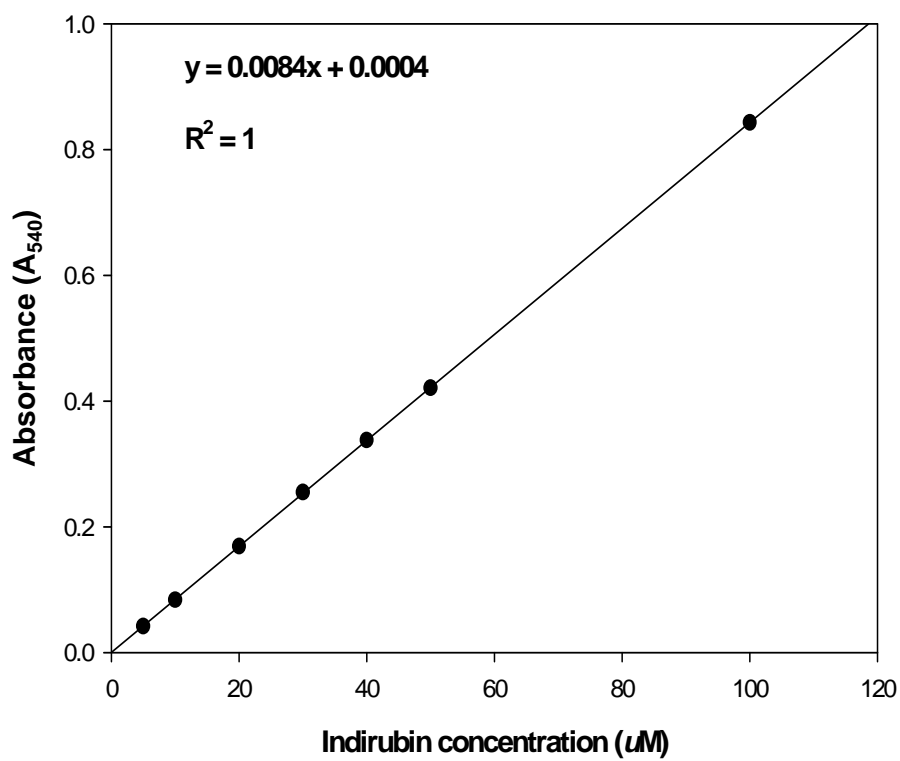


Fig. 7. standard curve for the determination of the indirubin concentration.

제 8 절 반응표면분석법을 이용한 인디고 생산 배지 및 생산 조건 최적화

1. 생산 배지의 최적화

인디고 생산에 사용되는 배양배지의 조성을 최적화하기 위하여 배양 인자인 tryptophan, yeast extract, NaCl 각각의 농도변화가 인디고 생산에 미치는 영향을 반응표면분석법 중 중심합성계획법(central composite design)을 이용하여 분석하였다. 중심합성계획법은 중심점(center point)와 축점(axial point)을 2^k 요인실험에 추가시킨 실험계획으로 중심합성계획의 실험에서는 6개의 중심점과 8개의 축점 및 6개의 외축점으로 구성하였다(Table 2). 중심합성계획의 횟수는 20개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다. 각각의 실험인자에 변화에 따른 인디고 생산량의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 아래와 같은 2차 다항식에 적용 시켰다.

$$f = y_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{123}X_1X_2X_3$$

여기서 f 는 인디고 생산량(mg/l)을 나타내며 X_1, X_2, X_3 는 각각 tryptophan, yeast extract, NaCl이며 y_0 는 절편, a_n 은 회귀계수이다. 중심합성계획에 의해 수행한 20개의 조건에서 생산된 인디고의 결과를 design expert 7.1 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 구하고, 각각 인자 간의 상호영향을 조사함으로써 인디고 생산을 위한 최적의 배지를 조성하였다. 또한 이 때 전체 model에 대한 유의성은 design expert program의 통계적 분석 시 P값에 의해 결정되며 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 인정된다. 최적의 인자 농도의 결정은 2차 다항식의 f 값이 최대가 되는 지점을 3차원 반응 표면도와 contour plot을 이용하여 관찰하였다.

2. 생산 조건의 최적화

인디고 생산조건을 최적화하기 위하여 배양 조건인 pH 및 배양 온도의 변화가 인디고 생산에 미치는 영향을 반응표면분석법 중 중심합성계획법(central composite design)을 이용하여 분석하였다. 중심합성계획법은 중심점(center point)와 축점(axial point)을 2^k 요인실험에 추가 시킨 실험계획으로 중심합성계획의 실험에서는 5개의 중심점과 4개의 축점 및 4개의 외축점으로 구성하였다(Table 3). 중심합성계획의 횟수는 13개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다.

Table 2. Experimental range and levels of the independent variables of culture medium

Variable	Symbol code	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Tryptophan (g/100ml)	X ₁	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Yeast extract (g/100ml)	X ₂	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
NaCl (g/100ml)	X ₃	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

	Run order	Tryptophan X ₁	Yeast extract X ₂	NaCl X ₃
Fractional 2 ³ factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00
	2	+ 1.00	-1.00	-1.00
	3	-1.00	+ 1.00	-1.00
	4	+ 1.00	+ 1.00	-1.00
	5	-1.00	-1.00	+ 1.00
	6	+ 1.00	-1.00	+ 1.00
	7	-1.00	+ 1.00	+ 1.00
	8	+ 1.00	+ 1.00	+ 1.00
Star points	9	-2.00	0.00	0.00
	10	+ 2.00	0.00	0.00
	11	0.00	-2.00	0.00
	12	0.00	+ 2.00	0.00
	13	0.00	0.00	-2.00
	14	0.00	0.00	+ 2.00
Central points	15	0.00	0.00	0.00
	16	0.00	0.00	0.00
	17	0.00	0.00	0.00
	18	0.00	0.00	0.00
	19	0.00	0.00	0.00
	20	0.00	0.00	0.00

Table 3. Experimental range and levels of the independent variables of culture condition

Variable	Symbol code	Range and levels				
		-1.5	-1	0	1	1.5
pH	X ₁	6.4	6.6	7.0	7.4	7.6
Temperature (°C)	X ₂	22.5	25	30	35	37.5

Run order	pH	temperature (°C)	
	X ₁	X ₂	
Fractional 2 ³ factorial design	1	-1.00	-1.00
	2	+ 1.00	-1.00
	3	-1.00	+ 1.00
	4	+ 1.00	+ 1.00
Star points	9	-1.50	0.00
	10	+ 1.50	0.00
	11	0.00	-1.50
	12	0.00	+ 1.50
Central points	15	0.00	0.00
	16	0.00	0.00
	17	0.00	0.00
	18	0.00	0.00
	19	0.00	0.00

제 9 절 인디고 생산 조건

1. Water - organic solvent를 이용한 바이오 인디고 생산

배양액으로부터 인디고를 회수하기 위하여 diphenylmethane 과 DMSO 를 시험하였다. 배양액 3 ml에 각각 diphenylmethane 3 ml 또는 DMSO 3 ml를 첨가한 후 혼합여부에 따라 배양액으로부터 인디고 회수능력을 시험하였다 (Fig. 8). 인디고 생산은 tryptophan 2 g/l가 포함된 2l의 배지를 사용하였으며 30 °C, 180 rpm, pH 7.0의 조건으로 Bioflo 3000(New Brunswick scientific, USA) 을 사용하여 회분식 배양으로 수행하였다. 36시간 동안 생산량을 관찰하였다. 배양액으로부터 바이오 인디고를 연속적으로 손쉽게 분리·정제하기 위해서 diphenylmethane를 사용하였다. Diphenylmethane이 충전된 원통형의 컬럼(3 × 50cm)을 발효조 외부에 설치한 다음 2 ml / min의 속도로 생산된 인디고가 포함된 배지를 흘려보내 배지로부터 생산된 바이오 인디고를 분리하였다. 배지에 혼합된 바이오 인디고는 컬럼을 통과하는 과정에서 diphenylmethane 층에 농축되어 배지와 분리정제 되었다. 분리된 배지는 반응조로 반송되며 연속적으로 인디고 정제하였다. 최종적으로 tryptophan 3 g/l가 포함된 배지에서 생산된 인디고를 diphenylmethane 층에서 배지와 분리 정제하는 과정을 연속적으로 수행하여 인디고 생산량 변화를 관찰하였다.

2. 연속식 반응기를 이용한 인디고 생산

연속식 배양에 의한 인디고 생산은 5 l fermenter(KoBioTech model : KF-5L)를 사용하였다. 연속식 반응기에서는 온도, pH, tryptophan 농도에 따른 바이오 인디고의 생산량 변화를 측정하였다. 재조합 대장균을 3 g/l tryptophan, 1% NaCl, 0.5% yeast extract가 포함된 2l의 배지에서 배양하면서, 인디고가 약 800 mg/l 가 생산되었을 때 2.8 ml/min의 속도로 신선한 배지를 공급하였으며, 이 때 온도, pH, 및 tryptophan 농도 변화에 따른 생산량 변화를 관찰 하였다. 모든 인디고 생산 실험의 교반 속도는 180 rpm으

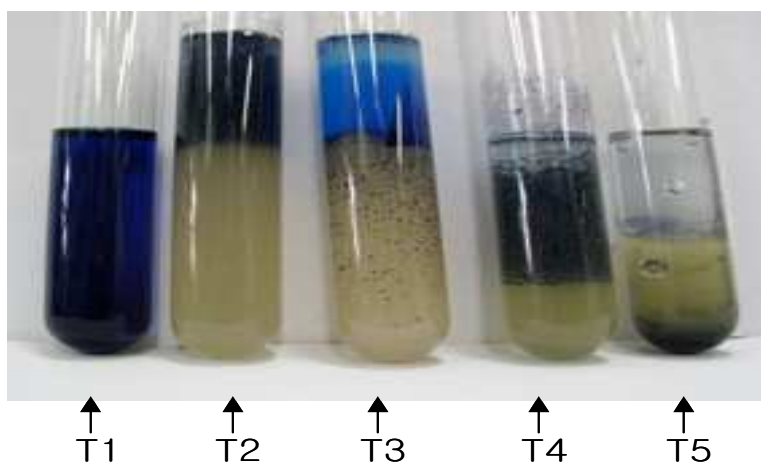
로 고정하였고, 공기펌프를 이용하여 공기를 주입함으로써 호기적인 조건을 유지하였다.

3. 3000L 반응기를 이용한 인디고 생산

5L 반응기에서 확립한 인디고 생산 조건을 기반으로 하여 3000L 반응기를 이용하여 인디고를 생산 하였다. 인디고 생산 배지는 고가의 시약용 tryptophan을 대체하기 위하여 사료용 tryptophan을 사용하였고, yeast extract는 맥주 건조효모를 사용하였다. 맥주 건조효모는 90 °C의 증류수에서 24시간 동안 self-lysis 시킨 후 상등액을 사용하였다. 그리고 NaCl는 천일염으로 하여 배지를 구성하였다. 3000L 반응기에서 유효용적을 2000 L로 하여 24시간 동안 30 °C에서 pH 7.0 으로 고정하여 배양 하였다.

제 10 절 생산된 인디고를 이용한 식물 염색

인디고를 이용한 염색은 전통적인 쪽 염색 방법을 참고하여 수행하였다. 60 °C의 증류수 1 L에 생산한 바이오 인디고 10 g을 넣고, 면섬유에 대한 친화력이 없는 불용성상태의 인디고를 환원제(sodium hydrosulfite) 5 g과 알칼리제(NaOH) 3 g을 넣어 환원시켜, 노란색의 alkali leuco 화합물로 만들었다. 인디고 염료의 온도가 30 ~ 40 °C가 되면 직물을 5분간 침지시켜 염색하였다. 색의 정도를 조절하기 위하여 수차례 반복 염색하였다. 염색된 직물의 건뢰도를 측정하기 위하여 FITI 시험 연구소에 의뢰하여 직물의 건뢰도를 측정하였다.



sample	diphenylmethane	DMSO	vortex
T1	×	○	×
T2	○	○	○
T3	○	○	×
T4	○○○	×	○
T5	○○	×	×

Fig. 8. Extraction of indigo from culture medium using organic solvent such as diphenylmethane and DMSO. T1: culture medium 3ml and DMSO 3ml; T2: culture medium 3ml, DMSO 3ml and diphenylmethane 3ml, vortexing; T3: culture medium 3ml, DMSO 3ml and diphenylmethane 3ml; T4: culture medium 3ml, and diphenylmethane 3ml, vortexing; T5: culture medium 3ml and diphenylmethane 3ml.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 FMO유전자의 cloning 및 발현

1. pBlue 1.7 genomic library 제작 및 형질 전환

M. aminisulfidivorans MP^T의 chromosomal DNA로부터 fmo 유전자의 open reading frame(ORF)를 포함하는 1.7kb DNA fragment를 얻기 위해 각각 *SacI*과 *XbaI*의 제한효소 binding site를 포함하는 primer (FMO-F: 5'-ATAGAGCTCTCGTTTAACCAGGGGCACATG, FMO-R:TATTCTAGATTAAGCTTCTTTAGCCACAG)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 얻어진 PCR product를 제한효소 *SacI*과 *XbaI*으로 37°C에서 1시간 동안 처리한 후 pBluescript SK(+) vector의 *SacI*과 *XbaI*에 subcloning 하여 pBlue 1.7을 제작하였다(Fig. 9). pBlue 1.7을 *E. coli* DH5a에 형질전환 하여 ampicillin 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 이 포함된 LB agar 배지에 16시간 동안 배양한 결과 짙은 푸른색의 colony를 형성하였다(Fig. 10).

2. 인디고 분리 및 특성 분석

청색소를 생산하는 유전자를 포함하고 있는 *E. coli* DH5a를 100ml LB에서 37°C로 16시간동안 배양한 후 배양액을 10,000 × *g*로 1분간 원심분리하여 짙은 푸른색의 pellet을 획득하였다. 짙은 푸른색의 pellet을 증류수로 두번에 걸쳐 씻은 후 10ml의 *N, N*-dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)로 재현탁 하였다. 그 후 microprobe를 이용하여 sonication하였다. 10,000 × *g*로 1분간 원심분리한 후 상층액을 얻어 인디고 분석에 사용하였다. 먼저 Ultrospec 2000 Spectrophotometer(Amersham Bioscience)를 이용하여 흡수 스펙트럼을 400nm 부터 700nm까지로 하여 흡수과장을 측정 한 결과 화학 합성 인디고와 동일한 620nm에서 최대 흡수 과장을 확인하였다(Fig. 11). Thin layer chromatography는 DMSO에 녹인 색소와 표준 화학 인디고를 silica gel TLC plate (Merck)에 spot하여 methanol : acetone의 혼합

비율이 50 : 50 (v/v) 용액을 사용하여 분석한 결과 청색 색소 spot의 바이오 인디고는 화학합성 인디고와 같은 Rf 만큼 이동하여 동일한 물질임을 알 수 있었고, 또한 핑크빛을 띠는 또 하나의 spot(indirubin)을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

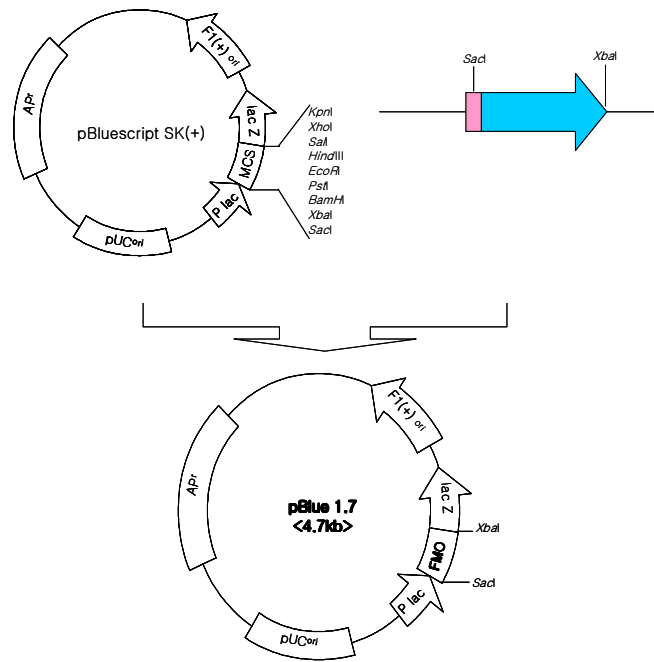


Fig. 9. Scheme for the construction of plasmid pBlue 1.7.

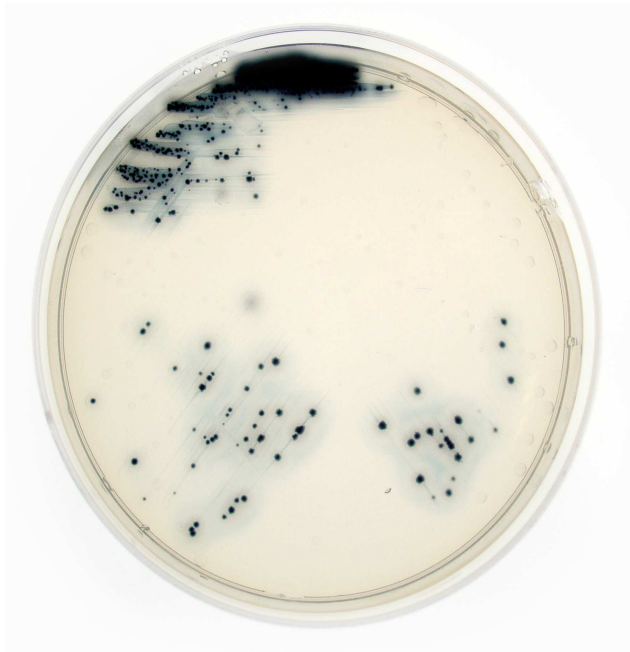


Fig. 10. Production of indigo from tryptophan by recombinant *E. coli* cells harboring flavin containing monooxygenase gene.

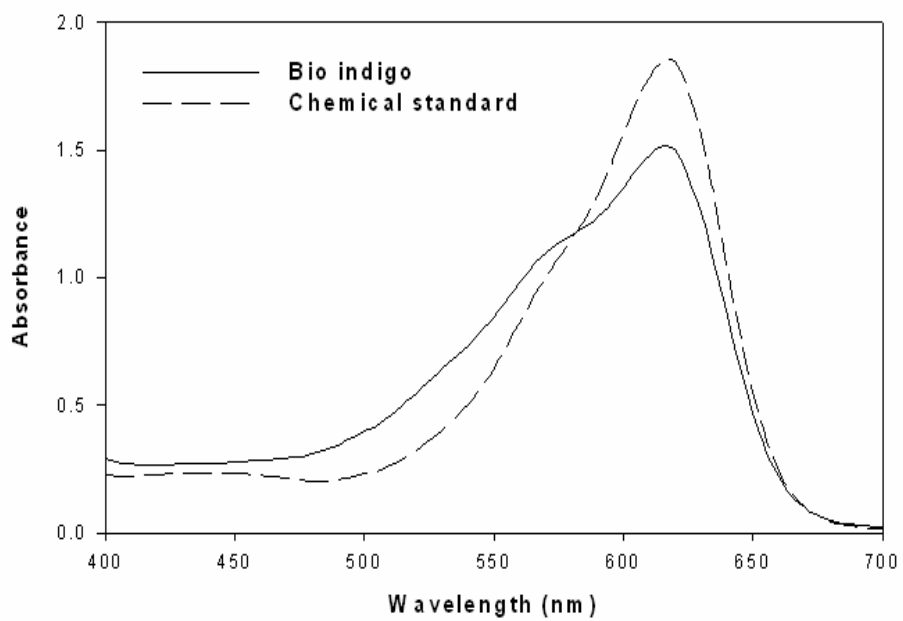


Fig. 11. Comparison of absorption spectra between chemical- and Bio- indigo dissolved in DMSO.

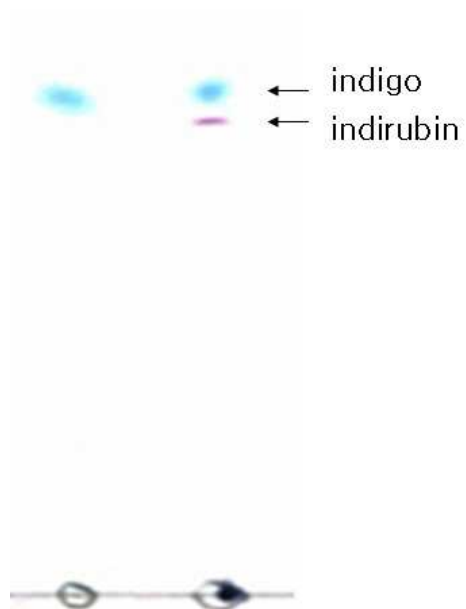


Fig. 12. Thin layer chromatography of chemical and Bio indigo derivatives.

제 2 절 유기화합물 및 아미노산 첨가에 따른 인디고 생산량의 변화

1. Glucose, Lactose 및 Fructose 첨가에 따른 인디고 생산 비교

재조합 미생물을 이용하여 tryptophan으로부터 인디고를 생산하는데 있어 수율을 높이기 위하여 세포대사 초기에 탄소원으로 glucose를 첨가하였을 때 효율이 증가하는지를 확인하고자 실험을 수행하였다. 본 실험은 미생물 자동 성장 분석기인 Bioscreen C (Transgalactic Co.)를 이용하여 tryptophan 배지에 각각 5 ~ 100 mM의 glucose를 첨가하여 30 °C에서 21시간 동안 1시간 간격으로 600nm에서 흡광도를 측정하면서 glucose 첨가 후 성장 속도 및 인디고 생산량을 측정하였다. 그 결과 glucose 첨가 시 성장 속도 및 인디고 생산량이 감소하였다. 이는 glucose가 재조합 대장균의 인디고 생산을 저해 하는 것으로 판단된다(fig. 13). Lactose와 fructose를 각각 100 mM을 첨가한 결과 각각 lactose 첨가 시 37.4 mg/L의 인디고가 생산 되었으며, fructose 첨가 시 144.6 mg/L의 인디고를 생산 하였다. 인디고 생산 배지에 glucose, lactose, fructose를 첨가한 모든 경우에서 인디고 생산량이 증가 하지 않았다.

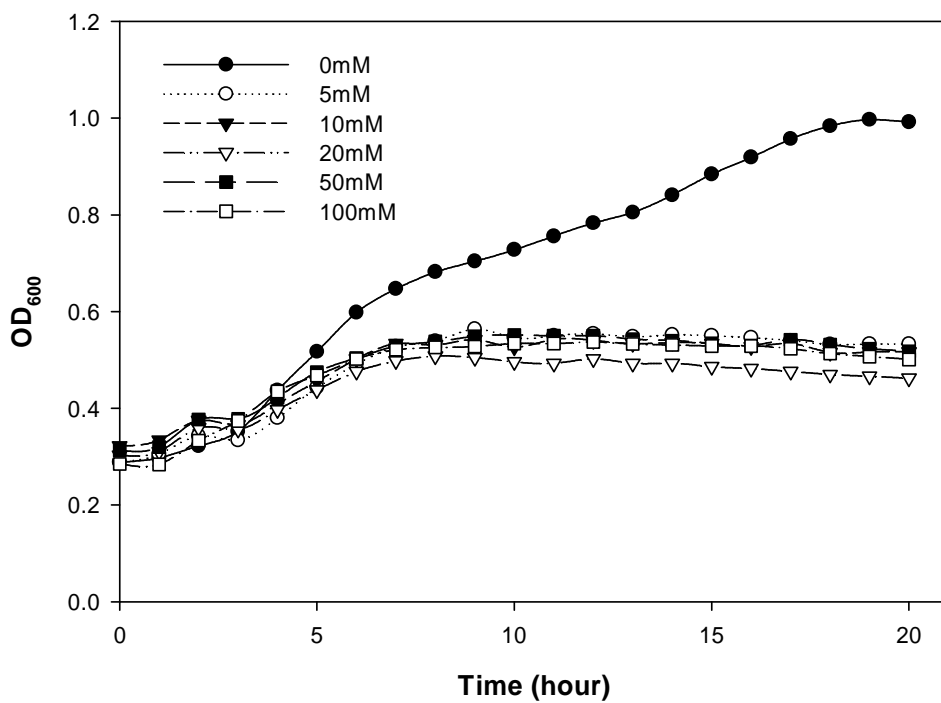


Fig. 13. Effect of glucose concentration on the indigo production when recombinant *E. coli* was cultured on the tryptophan medium.

2. 아미노산 첨가에 따른 인디고이드 화합물의 생산량 변화

바이오 인디고 생산에 사용되어진 tryptophan 배지 내 yeast extract의 아미노산의 조성을 조사한 결과, 시스테인, 아스파르트산 및 아르기닌이 다른 아미노산들과는 상대적으로 적은 양을 포함하고 있었다. 따라서 시스테인, 아스파르트산, 아르기닌을 각각 2 g/L씩 첨가하여 이에 따른 인디고와 인디루빈의 생산비율 변화를 관찰하였다. 그 결과 tryptophan 배지에서의 인디고 : 인디루빈 생산비가 90 : 10, 시스테인이 첨가된 경우 76 : 24, 아르기닌과 시스테인이 첨가된 경우 75 : 25, 시스테인과 아스파르트산이 첨가된 경우 54 : 46, 아르기닌, 아스파르트산 및 시스테인이 첨가된 경우 28 : 72의 생산비 변화가 관찰되었다(Fig. 14.). 세 가지 아미노산이 첨가된 각각의 경우에서 tryptophan 배지에서 보다 인디루빈의 생산비율이 증가됨을 확인하였으며, 특히 시스테인을 포함하는 세 가지 아미노산이 모두 첨가된 경우 인디루빈의 비율이 가장 많이 증가됐다.

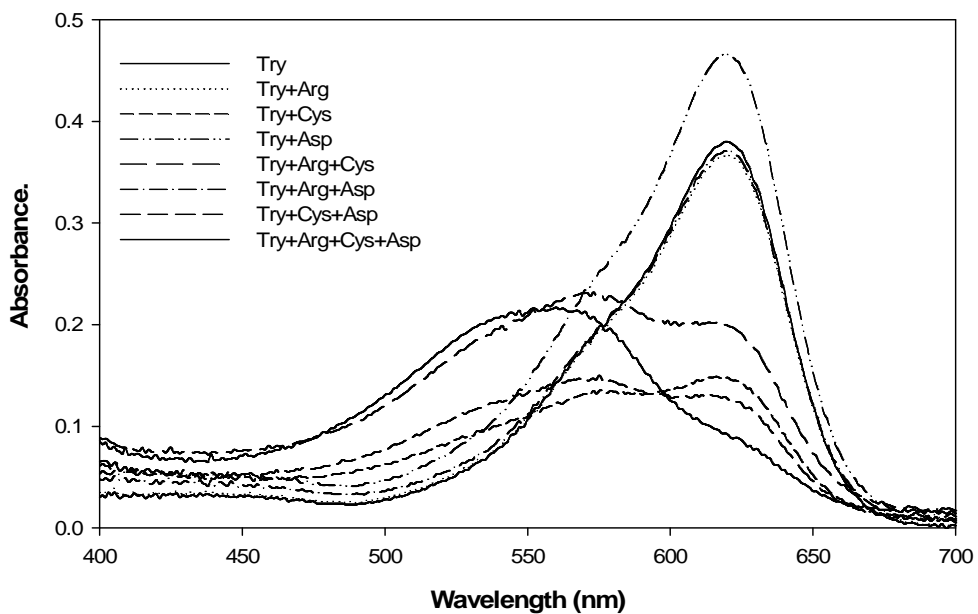


Fig. 14. UV-visible spectra of indigo derivatives formed by recombinant *E. coli* cells under different medium compositions. Pigments are dissolved in DMSO.

제 3 절 재조합 대장균을 이용한 인디고 생산

1. 중심합성계획법에 따른 배지의 최적화

재조합 대장균의 바이오 인디고 생산을 위한 배지의 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 tryptophan, yeast extract, NaCl 로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2 의 5개로 부호화하여 각 레벨에 따른 인디고 생산량을 측정하였으며, 결과는 Table 4과 같고, 반응변수에 미치는 독립변수의 영향은 Table 6에서 나타난 바와 같다. 중심합성계획법의 통계학적 결과는 주어진 변수의 유의 확률값에 따라 통계적 유의성이 결정된다. 일반적으로 변수의 유의 확률(Probability value, P value) 값이 0.05보다 작으면 각 변수간의 효과 차이가 유의성을 가진다고 하며, 0.01보다 작으면 매우 유의하다고 한다. Table 5의 분산분석 자료에 따르면 모델식의 유의확률이 0.0072로서 매우 유의성을 가진다고 할 수 있다. 이차회귀식에 따른 R^2 값은 0.8653으로 나타났다. 모델식에 따라 tryptophan과 yeast extract(Fig. 15), tryptophan 과 NaCl(Fig. 16) 그리고 yeast extract 와 NaCl(Fig. 17)의 독립변수의 상호 관계를 분석하였다. 이 때 각 독립변수들의 최적 값을 산출한 결과 tryptophan 2.48 g/l, yeast extract 5.20 g/l, NaCl 14.1 g/l로 나타났다. 모델식의 결과를 검증하기 위하여 기존의 tryptophan 배지와 산출된 값에 근거한 배지에서 각각 3회의 인디고 생산 실험을 수행한 결과 기존의 tryptophan 배지에서는 평균 835 mg/l의 바이오 인디고를 생산 하였고, 중심합성계획법에 의하여 산출된 새로운 배지에서는 평균 800 mg/l의 바이오 인디고를 생산 하였다(Fig. 18). 기존의 배지 조건에서 바이오 인디고의 생산량이 더 많았으며, tryptophan의 가격과 생산량 등을 고려한 결과, 바이오 인디고 생산에 가장 효율적인 tryptophan 배지의 조성(tryptophan 2 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l)을 확인 할 수 있었다.

Table 4. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points

	Run orde r	Tryptophan X_1	Yeast extract X_2	NaCl X_3	Indigo production (mg/l)
Fractional 2^3 factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00	464.396
	2	+1.00	-1.00	-1.00	631.885
	3	-1.00	+1.00	-1.00	344.761
	4	+1.00	+1.00	-1.00	203.194
	5	-1.00	-1.00	+1.00	270.987
	6	+1.00	-1.00	+1.00	15.765
	7	-1.00	+1.00	+1.00	314.853
	8	+1.00	+1.00	+1.00	7.790
Star points	9	-2.00	0.00	0.00	819.312
	10	+2.00	0.00	0.00	13.771
	11	0.00	-2.00	0.00	38.698
	12	0.00	+2.00	0.00	470.378
	13	0.00	0.00	-2.00	37.664
	14	0.00	0.00	+2.00	69.601
Central points	15	0.00	0.00	0.00	936.953
	16	0.00	0.00	0.00	917.623
	17	0.00	0.00	0.00	943.544
	18	0.00	0.00	0.00	1092.48
	19	0.00	0.00	0.00	953.720
	20	0.00	0.00	0.00	911.032

Table 5. Analysis of variance for quadratic model

Source	SS	DF	MS	F-value	Prob > F
Model	2.365E+006	10	2.365E+005	5.78	0.0072
Residual (error)	3.683E+005	9	40919.39		
Lack of Fit	3.475E+005	4	86423.14	19.14	
Pure Error	22581.92	5	4516.38		0.0031
Total	2.734E+006	19			

$R^2 = 0.8653$; CV = 40.30%, SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; Adj. $R^2 = 0.7156$

Table 6. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)

Model term	Parameter estimates	Standard error	F-ratio	p-value
Intercept	926.22	80.68	5.78	0.0072
X ₁	-134.22	50.57	7.04	0.0263
X ₂	22.06	50.57	.019	0.6730
X ₃	-103.06	50.57	4.15	0.0720
X ₁ ²	-45.11	71.52	0.04	0.5439
X ₂ ²	-73.53	71.52	1.06	0.3308
X ₃ ²	-73.03	71.52	1.04	0.3339
X ₁ X ₂	-152.17	40.34	14.23	0.0044
X ₁ X ₃	-192.80	40.34	22.84	0.0010
X ₂ X ₃	-200.53	40.34	24.71	0.0008
X ₁ X ₂ X ₃	32.15	71.52	0.20	0.6637

$$Y = 926.22 - 134.22 X_1 + 22.06 X_2 - 103.06 X_3 - 45.11 X_1 X_2 - 73.53$$

$$X_1 X_3 + 73.03 X_2 X_3 - 152.17 X_1^2 - 192.80 X_2^2 - 200.53 X_3^2 + 32.15 X_1 X_2 X_3$$

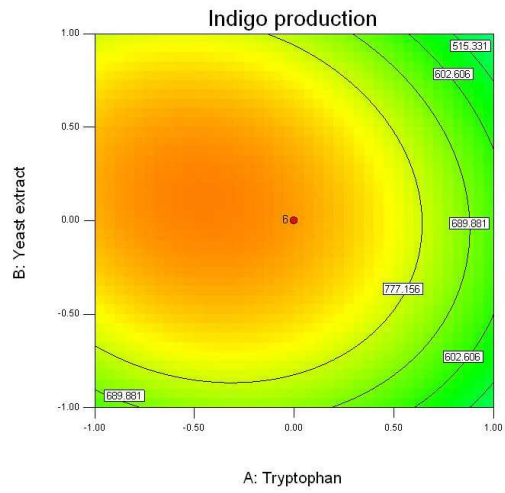
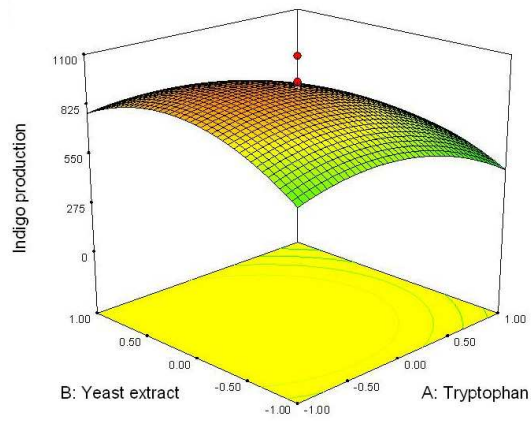


Fig. 15. Response surface plot showing the effect of tryptophan and yeast extract and also their mutual effect on the production of indigo (mg/l).

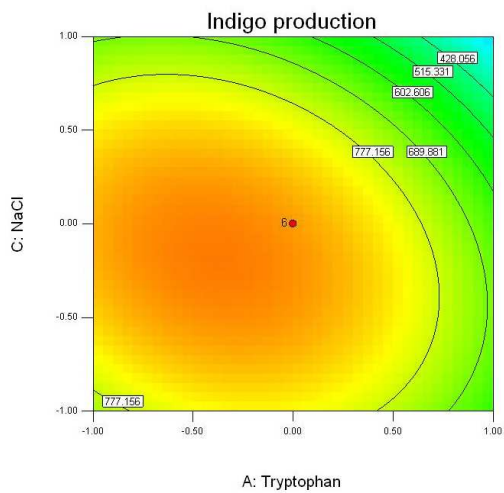
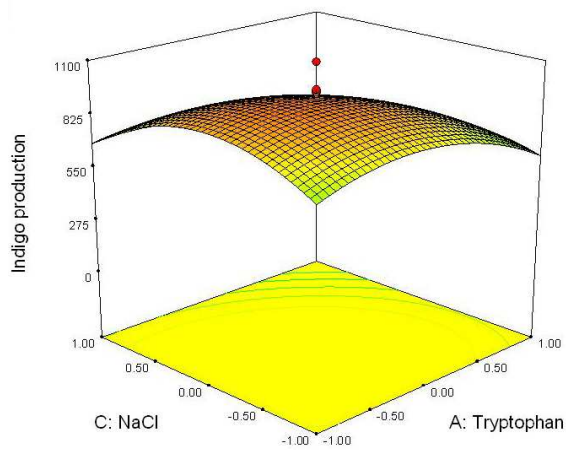


Fig. 16. Response surface plot showing the effect of tryptophan and NaCl and also their mutual effect on the production of indigo (mg/l).

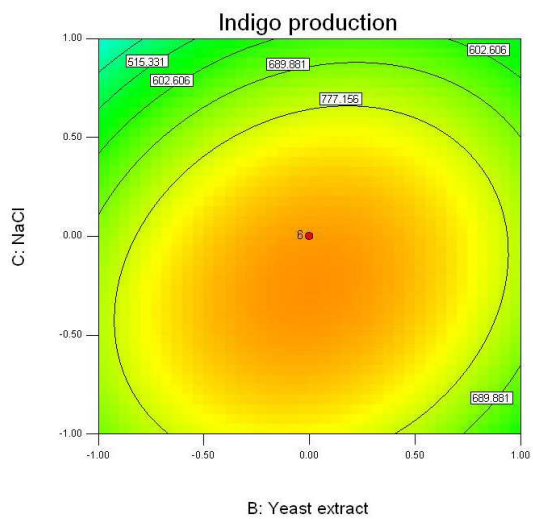
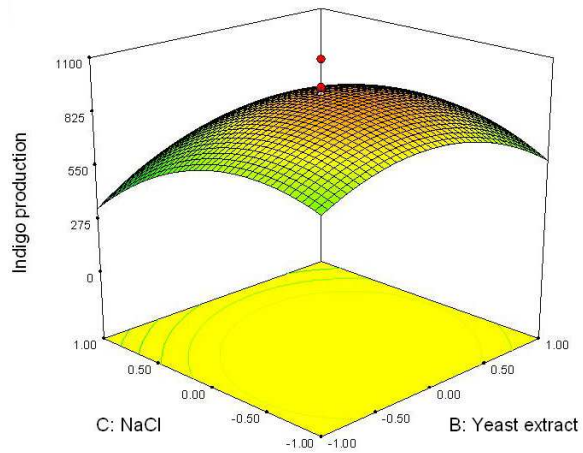


Fig. 17. Response surface plot showing the effect of yeast extract and NaCl and also their mutual effect on the production of indigo (mg/l).

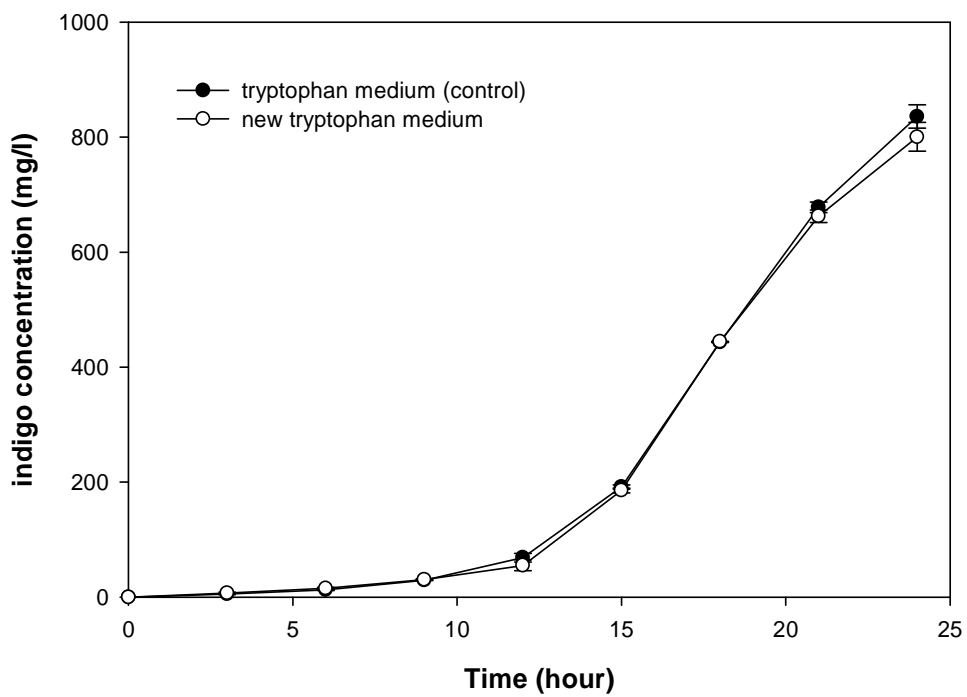


Fig. 18. Comparison of indigo production in original tryptophan medium and new tryptophan medium.

2. 중심합성계획법을 이용한 생산 조건의 최적화

재조합 대장균의 바이오 인디고 생산을 위한 생산 조건의 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 pH 와 temperature로 요인변수들을 -1.5, -1, 0, 1, 1.5 로서 5개로 부호화하여 각 레벨에 따른 인디고 생산량을 결과는 Table 7과 같으며, 반응변수에 미치는 독립변수의 영향은 Table 9에서 보는 바와 같다. Table 8의 분산분석 자료에 따르면 모델실의 유의확률이 0.0001 이하로서 매우 유의성을 가진다고 할 수 있다. 이차회귀식에 따른 R²값은 0.9895으로 나타났다. 모델식에 따라 독립변수 pH 와 온도의 최적 값을 산출한 결과 pH 7.0, 30 °C로 나타났다(Fig. 19).

Table 7. Experimental design used in RSM studies by using two independent variables with five center points

	Run order r	Tryptophan X_1	Yeast extract X_2	Indigo production (mg/l)
Fractional 2^3 factorial design	1	-1.00	-1.00	2.04
	2	+ 1.00	-1.00	114.2
	3	-1.00	+ 1.00	81.9
	4	+ 1.00	+ 1.00	136.0
Star points	9	-2.00	0.00	53.6
	10	+ 2.00	0.00	20.6
	11	0.00	-2.00	101.9
	12	0.00	+ 2.00	70.6
Central points	15	0.00	0.00	846.3
	16	0.00	0.00	873.9
	17	0.00	0.00	880.0
	18	0.00	0.00	829.3
	19	0.00	0.00	850.1

Table 8. Analysis of variance for quadratic model

Source	SS	DF	MS	F-value	Prob > F
Model	1.883E+006	5	3.766E+005	131.32	< 0.0001
Residual (error)	20074.78	7	2867.83		
Lack of Fit	18361.47	3	6120.49	14.29	0.0133
Pure Error	1713.31	4	428.33		
Total	1.903E+006	12			

$R^2 = 0.9895$; $CV = 14.33\%$, SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; Adj. $R^2 = 0.9819$

Table 9. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)

Model term	Parameter estimates	Standard error	F-ratio	p-value
Intercept	852.38	23.88		
X ₁	13.73	18.37	0.56	0.4790
X ₂	6.44	18.37	0.12	0.7363
X ₁ X ₂	-14.51	26.78	0.29	0.6046
X ₁ ²	-376.91	18.61	410.36	< 0.0001
X ₂ ²	-355.07	18.61	364.18	< 0.0001

$$Y = 852.38 + 13.73 X_1 + 6.44 X_2 - 14.51 X_1 X_2 - 367.91 X_1^2 - 355.07 X_2^2$$

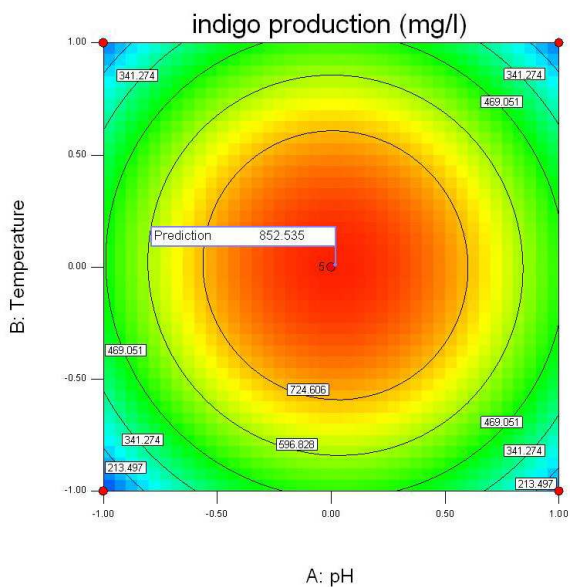
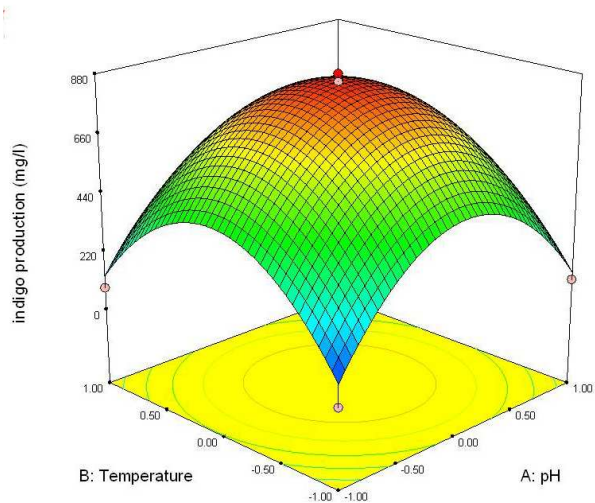


Fig. 19. Response surface plot showing the effect of pH and Temperature and also their mutual effect on the production of indigo (mg/l).

3. Water-organic solvent를 이용한 바이오 인디고 생산

반응조 내의 인디고의 농도가 증가할수록 인디고 독성으로 인해 미생물의 생산율이 낮아짐에 따라 반응조 내 인디고의 농도를 일정하게 유지시키기 위해 organic solvent를 이용하여 생산된 인디고를 분리하고자 하였다. 예비 실험에서 각각의 organic solvent의 배양액으로부터 인디고 분리능을 확인하기 위해서 배양액 3 ml에 diphenylmethane 3 ml 와 DMSO 3 ml를 처리하여 생산된 인디고와 배양액의 분리능을 확인한 결과 배양액과 diphenylmethane을 처리한 경우 가장 인디고가 잘 분리되었다.

인디고 생산을 위해 Bioflo 3000 반응조와 원통형 컬럼을 이용하여 반응기를 제작하고 정량 펌프를 이용하여 일정한 속도로 배양액이 순환 될 수 있도록 제작하였다(Fig. 20). 종균 배지는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 ampicillin이 포함된 LB배지에서 pBlue 1.7을 포함하고 있는 재조합 대장균을 16시간동안 배양한 후 접종하였다. 인디고 생산에 사용한 배지는 tryptophan 3 g/l가 포함된 배지를 사용하였다. 배양 후 10시간이 지난 후 정량 펌프를 이용하여 2 ml/min의 속도로 배양액을 diphenylmethane이 충전된 mix tank로 이송되어 배양액과 diphenylmethane을 혼합시킨 후 원통형 컬럼으로 이송하여 배양액과 인디고가 포함된 diphenylmethane층으로 분리하였다. 분리된 배양액은 다시 반응조로 반송하였으며 diphenylmethane층으로 추출된 인디고는 원심분리기를 통하여 인디고와 diphenylmethane으로 분리 하였다. 분리된 diphenylmethane은 반송하여 재사용 하였다. Water-organic solvent 의 2상 시스템을 이용한 바이오 인디고 생산 실험 결과 최종적으로 3 g/l 의 tryptophan 배지에서 1394.39 mg/l 의 인디고를 생산하였다(Fig. 21.).

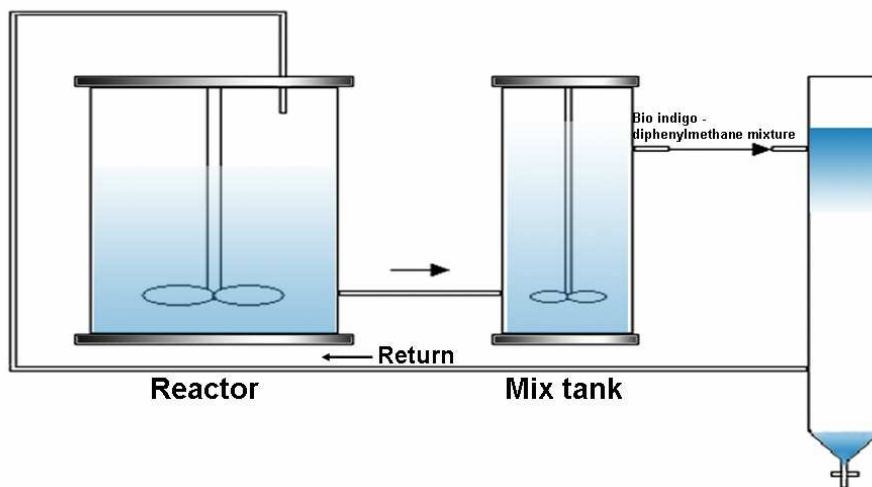


Fig. 20. Scheme for the construction of water-organic system., reactor-bio indigo fermentation reactor., Mix tank-it was mixed bio indigo and diphenylmethane.

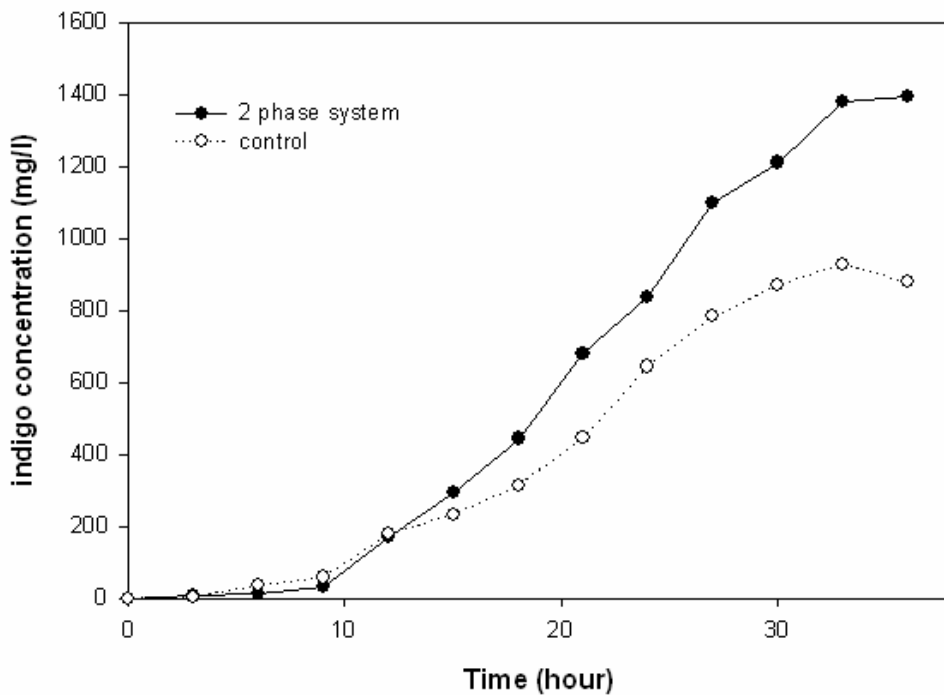


Fig. 21. Comparison of indigo production of recombinant *E. coli* in control(tryptophan Medium) with 2 phase system(diphenylmethane and tryptophan medium).

4. 연속식 반응기를 이용한 바이오 인디고 생산

인디고 생산실험은 5ℓ fermenter (KoBioTech Model : KF-5L)를 사용하여 2ℓ 의 tryptophan medium에서 배양하였다. 정량 펌프를 이용하여 2.8 ml/min의 유량으로 fresh medium을 공급하고, 같은 유량으로 culture medium을 배출하여 반응기 내의 volume을 2ℓ 로 유지 하도록 제작하였다 (Fig. 22). Fed batch 반응기에서 온도 변화에 따른 바이오 인디고 생산량 변화를 관찰하기 위하여 초기 배양 온도를 30℃로 유지하고, 인디고 생산량이 800 mg/ℓ 로 안정화된 이후 35℃로 증가하여 인디고 생산량을 측정하였다. 배양 10시간 후 인디고의 생산량은 914 mg/ℓ 를 보였으며 이후 tryptophan 2 g/l 가 포함된 배지를 공급하고, 온도를 35℃로 증가하여 배양 한 결과 인디고의 생산량이 소폭 증가하였다. 배양 18시간 후 1,146 mg/ℓ 의 인디고를 생산 하였으며 20시간 이후 온도를 37℃로 증가시켰으나 점차 생산량이 감소하였다. 인디고 생산 실험에서 배양 온도 30℃에서 927 mg/ℓ 의 인디고가 생산 되었으며, 온도를 35℃로 증가 시킨 결과 1146 mg/ℓ 의 인디고가 생산되어 약 19%의 생산량이 증가하였다(Fig. 23). Fed batch 실험에서는 배양 10시간 이후 온도를 30℃에서 35℃로 증가시켰을 때 인디고의 생산량이 약 19% 증가하였는데, 온도에 따른 영향뿐만 아니라 pH의 변화에 따른 인디고 생산량을 관찰하고자 초기 pH를 7.0 ~ 7.2로 조절하고 배양 10시간 이후의 pH를 각각 6.6 ~ 6.8, 7.0 ~ 7.2, 7.4 ~ 7.6로 조절하여, 각 조건에 따른 인디고 생산량을 관찰 하였다. 배양 14시간 이후 인디고의 생산이 안정화 되었으며 이후 각각 pH 6.6 ~ 6.8, pH 7.4 ~ 7.6으로 조절하여 생산한 결과 18시간 이후부터 대조군인 pH 7.0 ~ 7.2 보다 생산량이 급격하게 감소하였다(fig. 24.). 선행 실험을 통하여 fed batch 반응기에서의 최적 온도 및 pH 조건을 확인하였고, 초기 2 g/l 의 tryptophan이 포함된 배지에서 배양을 시작하였다. 배양 10시간 후(인디고 생산량 800 mg/ℓ) 3 g/ℓ tryptophan이 포함된 배지를 2.8 ml/min 의 속도로 주입하여 140시간 동안 (7 days) 인디고 생산량을 관찰하였다. 3 g/ℓ 의 tryptophan 배지가 주입된 이후 20시간까지 인디고 생산량이 점차 증가하였으며, 20시간 이후 인디고 생산량은 평균 1,386 mg/ℓ 로 안정화 되었고 120시간까지 유지되었다. 그러

나 120 시간 이후 생산량이 급격하게 감소하였는데, 이는 FMO의 활성이 120시간 이후 급격하게 감소됨을 의미한다(fig. 25.). 기존의 batch 배양 조건에서는 최종적으로 926 mg/l 의 인디고를 생산할 수 있었으나 feb batch 발효에서는 순간 최대 1,437 mg/l 를 생산하였고 평균 5,642 mg/l/day 의 바이오 인디고를 생산하였다.

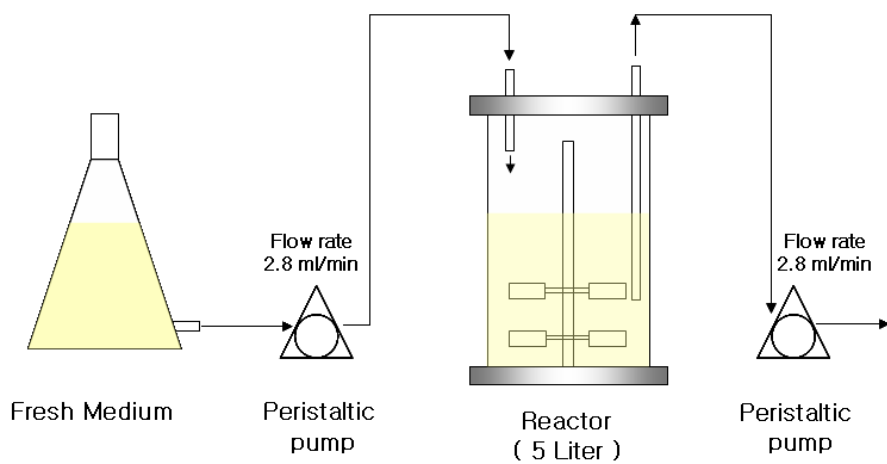


Fig. 22. Continuous fermentation system for the production indigo in the 5 L fermentor.

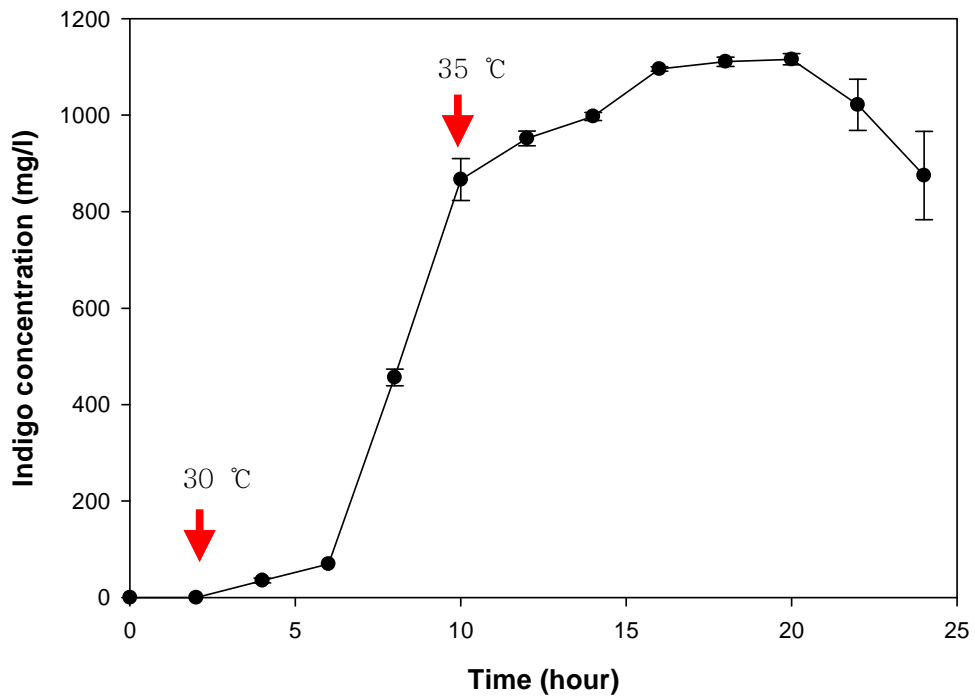


Fig. 23. Effect of temperature change maximum production of indigo in the continuous fermentation.

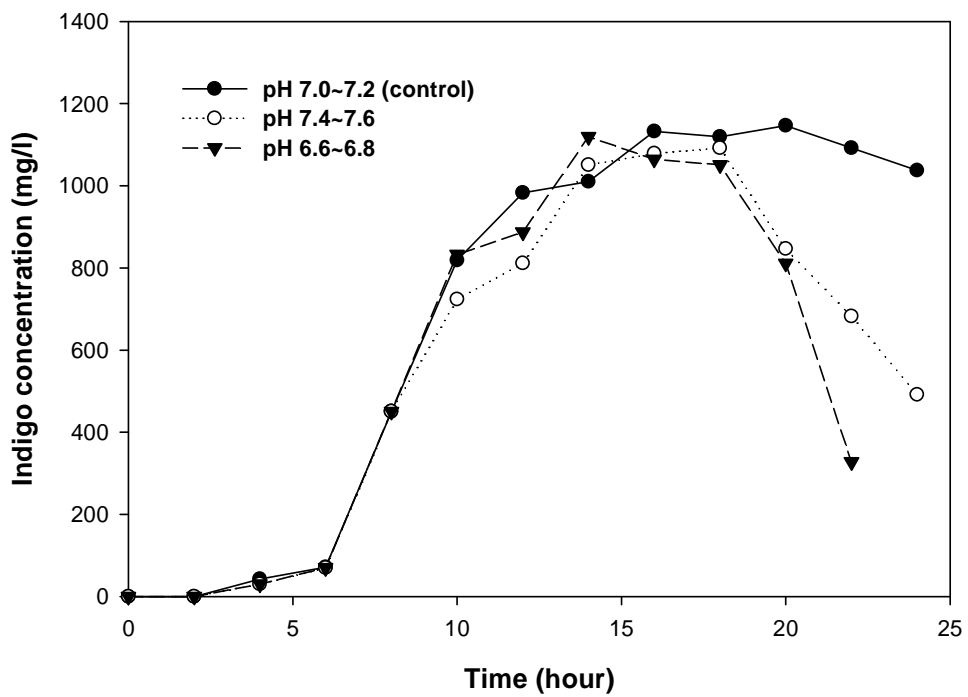


Fig. 24. Effect of pH on the indigo production in the continuous fermentation.

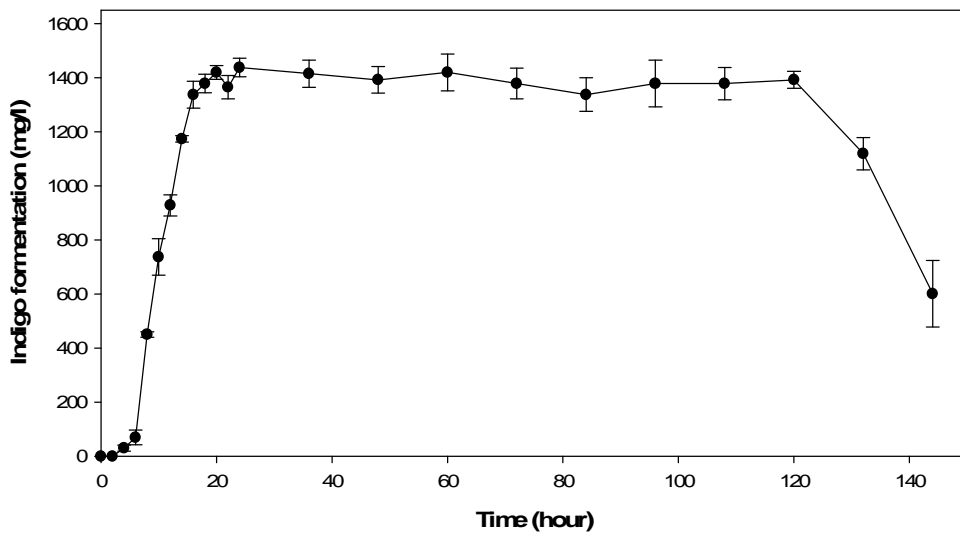


Fig. 25. continuous fermentations was performed under the optimum culture condition (initial volume 2L).

5. 3000L 발효조를 이용한 인디고 생산

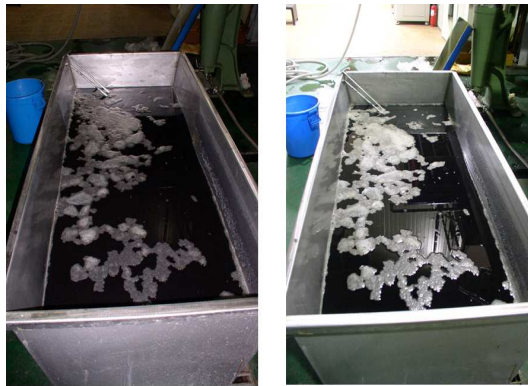
재조합 대장균을 이용한 인디고의 생산이 산업에의 응용여부를 확인하고자 대용량 반응기를 이용한 생산 실험을 수행하였다(Fig. 26). 5L 반응기에서 확립한 인디고 생산 조건을 기반으로 하였으며 저가의 생산비용을 위하여 70% tryptophan, 천일염, 수산용 ampicillin 및 yeast extract를 대체하기 위해서 맥주제조 과정에서 발생하는 건조효모를 이용하여 인디고 생산 배지를 만들었다. 건조효모는 90 °C의 물에 넣어 24시간 동안 처리하여 self-lysis 시킨 후 상등액을 이용하였다. 최종적으로 70% tryptophan 2 g/l, yeast extract 0.5 %, 그리고 NaCl 1 %가 포함되어 있는 배지 2000 L를 pH 7.0으로 조절 한 후 종균 배지 1%를 접종하여 배양 하였다. 배양 결과 최종적으로 914 mg/l의 인디고를 생산하였다(fig. 27.). 5 L 반응기에서의 인디고 생산량과 비교한 결과 tryptophan으로부터 인디고로의 전환율이 92 %로 동일하였다.



<TRYPTOPAHN 배지 - 배양전>



<TRYPTOPAHN 배지 - 배양후>



<배양후 발효액>



<인디고 회수>

Fig. 26. Mass production of indigo in the 3000 L fermentor. Fresh medium containing tryptophan 1.4 g/l; 24 h-Culture of recombinant *E. coli* expressing FMO; Isolated Indigo by continues centrifuge.

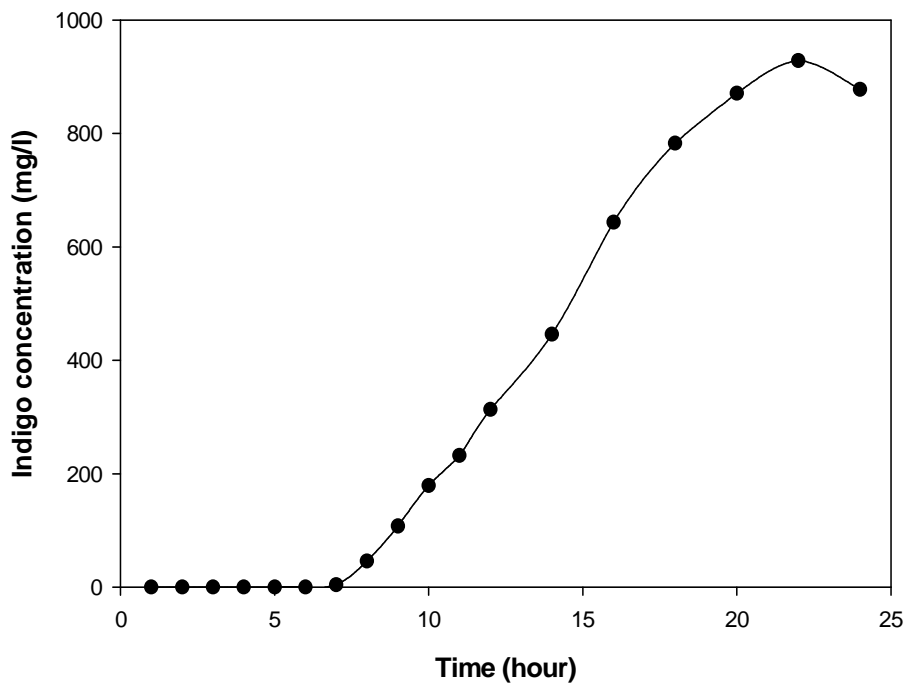


Fig. 27. Mass production of indigo by recombinant *E. coli* in the 3000 L fermenter.

제 4 절 생산된 인디고를 이용한 식물 염색

생산된 인디고를 이용한 염색은 전통적인 쪽 염색 방법을 참고하였다. 증류수를 60℃로 가열한 후 생산된 람 상태의 인디고 10 g 을 현탁 시킨 후 sodium hydrosulfite 5 g, NaOH 3 g를 넣었다. 염료의 온도를 30 ~ 40℃로 낮춘 후 직물을 5분간 침수시킨 뒤 공기 중에서 5분간 산화시킨 다음 증류수로 세척하여 직물의 색이 청색이 될 때까지 반복하여 염색하였다. 염색 횟수에 따라 직물에 나타나는 청색의 강도가 강해졌다(Fig. 28). 염색한 직물의 각종 견뢰도를 FITI 시험연구원에 의뢰하여 테스트한 결과 세탁 견뢰도 4-5, 일광 견뢰도 3, 땀 견뢰도 4-5 의 견뢰도 결과를 나타냈다(Table 10). 식물에서 추출하는 인디고를 이용한 견뢰도와 비교한 결과 세탁 및 땀 견뢰도에서는 동일한 정도를 확인 할 수 있었으나, 특히 일광 견뢰도의 경우 식물의 인디고가 최대 2를 보이는 반면 재조합 대장균을 이용하여 생산한 인디고에서는 3을 나타내어 더욱 우수하다는 것을 확인 할 수 있었다.

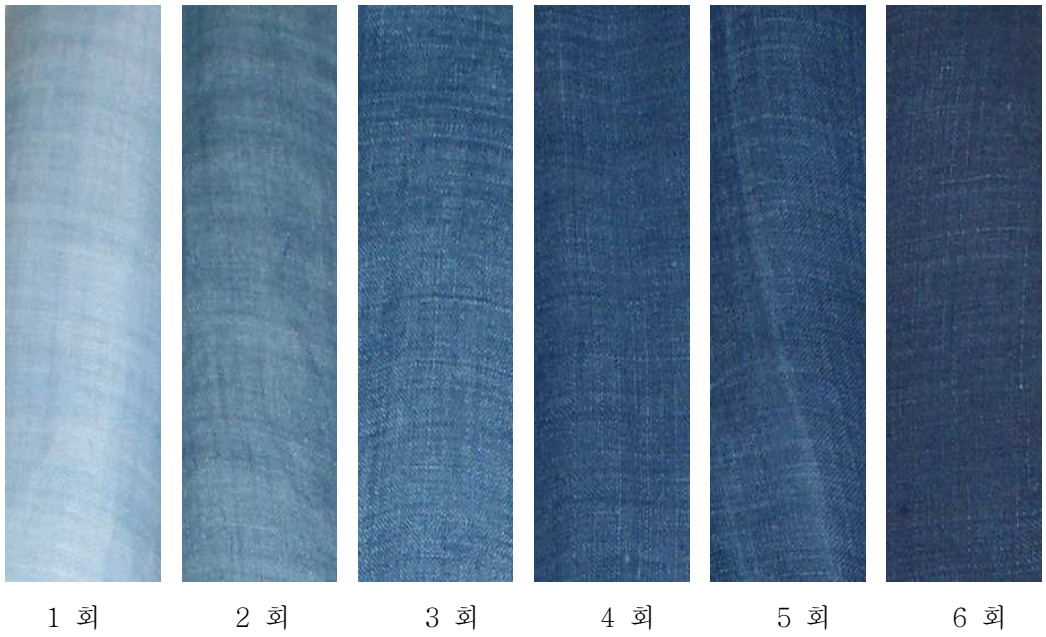


Fig 28. Dyeing of various fabrics using bio indigo.

Table 10. Color fastness of bio indigo produced from mass production system.

세탁 견뢰도(KS K 0430-2001, A-1, 40 ±2℃) : 급

	면	마
변퇴색 오염	4-5	4-5
면	4-5	4-5
모	4-5	4-5

일광견뢰도 (KS K 0700-1990, 페이드오미터, blue scale) : 급

	면	마
20 표준퇴색시간	3	3

땀견뢰도 (KS K 0715-2002) : 급

		면	마
산성	변퇴색 오염	4-5	4-5
	면	4-5	4-5
	모	4-5	4-5
알카리성	변퇴색 오염	4-5	4-5
	면	4-5	4-5
	모	4-5	4-5

제 4 장 결 론

1. *M. aminisulfidivorans* MP^T의 chromosomal DNA로부터 FMO 유전자를 포함하는 1.7kb DNA fragment를 얻어 재조합 플라스미드 pBlue 1.7을 만들었다. 이를 *E. coli* DH5a 에 형질전환 하여 LB agar 배지에 배양한 결과 짙은 푸른색의 colony를 형성하였다. 이 colony의 푸른색 물질을 분석한 결과 인디고임을 확인하였다.
2. 세포대사 초기에 탄소원으로 glucose를 첨가하였을 때 효율이 증가하는지를 확인하고자 실험을 수행한 결과, tryptophan 배지에 비하여 glucose를 첨가한 경우 인디고의 생산량이 감소하였다. 또한 lactose와 fructose를 각각 100 mM을 첨가한 실험에서는 lactose를 첨가 시 37.4 mg/l, fructose 첨가 시 144.6 mg/l의 인디고를 생산 하였다. lactose 와 fructose 역시 인디고 생산에 큰 영향을 미치지 않았다.
3. 바이오 인디고 생산에 사용되어진 tryptophan배지 내의 아미노산의 조성을 조사한 결과, 시스테인(Cys), 아스파르트산(Asp) 및 아르기닌(Arg)이 다른 아미노산들과는 상대적으로 적은 양을 포함하고 있어 시스테인, 아스파르트산, 아르기닌의 첨가하여 인디고와 인디루빈의 생산비율 변화를 관찰한 결과, 시스테인이 첨가된 경우 76 : 24, 아르기닌과 시스테인이 첨가된 경우 75 : 25, 시스테인과 아스파르트산이 첨가된 경우 54 : 46, 아르기닌, 아스파르트산 및 시스테인이 첨가된 경우 28 : 72의 생산비 변화가 관찰되었다. 이 결과에 따라 아미노산이 첨가된 경우 인디루빈의 생산비율이 증가됨을 확인하였으며, 시스테인을 포함하는 아미노산이 첨가된 경우에서 특히 인디루빈의 비율이 증가되었다.

4. 중심합성계획법을 통하여 배양 배지의 최적 조성을 산출한 결과 tryptophan 2.48 g/l, yeast extract 5.20 g/l, NaCl 14.1 g/l로 나타났다. 그러나 기존의 tryptophan 배지와 산출된 값에 근거한 배지에서 인디고 생산량을 비교한 결과, 기존의 배지에서는 평균 835 mg/l의 바이오 인디고를 생산 하였고, 새로운 배지에서는 평균 800 mg/l의 바이오 인디고를 생산 하였다. tryptophan의 가격과 생산량 등을 고려한 결과, 인디고 생산에 가장 효율적인 배지의 조성(tryptophan 2 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l)을 확인하였다.
5. 반응조 내의 인디고 농도를 유지하기 위하여 water-organic solvent의 2상 시스템을 제작하였고, 2상 시스템을 이용한 바이오 인디고 생산 실험 결과 최종적으로 3 g/l 의 tryptophan 배지에서 1394.39 mg/l 의 인디고를 생산하였다.
6. 연속식 반응기를 이용한 실험에서는 배양 10시간 이후 온도를 30℃에서 35℃로 증가시켰을 때 인디고의 생산량이 약 19% 증가하였으며, 초기 pH를 7.0 ~ 7.2로 조절하고 배양 10시간 이후의 pH를 7.0 ~ 7.2로 조절 하였을 때 인디고 생산량이 가장 높았다. 최종적으로 3 g/l 의 tryptophan 배지에서 배양 시작 20시간까지 인디고 생산량이 점차 증가하였고, 20시간 이후 인디고 생산량은 평균 1,386 mg/l 로 안정화 되었고 120시간까지 순간 최대 1,437 mg/l 를 생산하였고 평균 5,642 mg/l/day 의 바이오 인디고를 생산하였다. 그러나 120 시간 이후 생산량이 급격하게 감소하였는데, 이는 FMO의 활성이 120시간 이후 급격하게 감소되었다.
7. 3000L 반응기를 이용한 인디고 생산실험은 산업에의 응용여부를 확인하고자 사료용 tryptophan, 천일염, 수산용 ampicillin 및 yeast extract를 대체하기 위해서 맥주제조 과정에서 발생하는 건조효모를 이용하여 인디고 생산 배지를 만들었다. 배양 결과 최종적으로 914 mg/l의 인디고를 생산 하였다. 이 결과를 100 % tryptophan 을 사용한 경우와 비교한 결과

tryptophan으로부터 인디고로의 전환율이 92 %로 동일하였다.

8. 전통적인 쪽 염색 방법을 참고하여 직물을 염색한 결과 세탁 견뢰도 4-5, 일광 견뢰도 3, 땀 견뢰도 4-5의 견뢰도 결과를 나타내었으며, 식물에서 추출한 인디고를 이용한 경우 보다 우수한 견뢰도 시험 결과를 나타냈다.

제 5 장 참고 문헌

1. Maugard T, Enaud E, de La Sayette A, Choisy P, Legoy MD, "Beta-glucosidase-catalyzed hydrolysis of indican from leaves of *Polygonum tinctorium*." 2002. Biotechnol Prog. 18, 1104-1108.
2. Doukyu, R. W., Arai, T., Aono, R. "Effects of organic solvents on indigo formation by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 grown with high levels of indole." 1998, Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 1075-1080.
3. Doukyu, R. W., Nakano, T., Okuyama, Y., Aono, R. "Isolation of an *Acinetobacter* sp. ST-550 which produces a high level of indigo in a water-organic solvent two-phase system containing high levels of indole." 2002, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 543-546.
4. Murdock, D., Ensley, B. D., Serdar, C., Thalen, M. "Construction of metabolic operons catalyzing the De Novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*." 1993, Bio Technol. 11, 381-386.
5. Yen, K. M., Karl, M. R., Blatt, L. M., Simon, M. J., Winter, R. B., Fausset, P. R., Lu, H. S., Harcourt, A. A., Chen, K. K. "Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase." 1991, J. Bacteriol. 173, 5315-5327.
6. Bhushan, B., Samanta, K., Jain, R. K. "Indigo production by naphthalene -degrading bacteria." 2000, Lett. Appl. Microbiol. 31, 5-9.
7. Choi, H. S., Kim, J. K., Cho, E. H., Kim, Y. C., Kim, J. I., Kim, S. W. "A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*." 2003, Biochem. Biophys. Res. commun. 306, 93093-93096
8. Karoly, E. D., Rose, R. L. "Sequencing, Expression, and

- Characterization of cDNA Expressed Flavin-Containing Monooxygenase 2 from Mouse" 2001, *J. Biochem Mol Toxicol* 15; 300-308
9. Fraaije, M. W., Kamerbeek, N. M., Van Berkel, W. J. H., Janssen, D. B., " Identification of a Beayer-Villiger monooxygenase sequence motif" 2002, *Lett. FEBS* 518; 43-47
 10. Furnes, B., Schlenk, D., " Evaluation of Xenobiotic N- and S-Oxidation by Variar Flavin-Containing monooxygenase 1 (FMO1) Enzymes" 2004, *Toxicological sciences* 78; 196-203
 11. Nakaniwa, T., Tada, T., Takao, M., Sakia, T., Nishimura, K., "An *in vitro* evaluation of a thermostable pectate lyase by using error-prone PCR" 2004, *J. Molecular catalysis* 27;127-131
 12. Nakamura, K., Martin, M. V., Guengerich F. P., "Random mutagenesis of Human Cytochrome P450 2A6 and screening with indole Oxidation Products" 2001, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395; 25-31
 13. Puchalska, M., Polec-Pawlak, K., Zadrozna, I., Hryszko, H., Jarosz, M., "Identification of indigoid dyes in natural prganic pigments used in historical art objects by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry" 2004, *J. Mass Spectrom* 39; 1441-1449
 14. Wu, Z. L., Podust, L. M., Guengerich, F. P., "Expansion of substrate specificity of cytochrome P450 2A6 by random and site-direct metagenesis" 2005, *J. Biological Chemistry* 280; 41090-41100
 15. Podgornik, H., Poljansek, I., Perdih, A., "Transformation of indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes" 2001, *Enzyme and Microbial Technology* 29; 166-172
 16. Gillam, E. M. J., Aguinaldo, A. M. A., Notley, L. M., Kim, D. H.,

- Mundkowski, R. G., Volkov, A. A., Arnold, F. H., Soucek, P., DeVoss, J. J., Guengerich, F. P., "Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450" 1999, *Biochemical and Biophysical research communications* 265; 469-472
17. Rui, L., Reardon, K. F., Wood, T. K., " Protein engineering of toluene *ortho*-monooxygenase of *Burkholderia cepacia* G4 for regiospecific hydroxylation of indole to form various indigoid compounds" 2004, *Appl microbiol Biotechnol* 66; 422-429
18. Xu, H., Petersen, E. I., Petersen, S. B., el-Gewely, M.R., "Random mutagenesis libraries: optimization and simplification by PCR" 1999, *Biotechniques* 27(6); 1102-1108
19. Lim, H. K., Chung, E. J., Kim, J. C., Choi, G. J., Jang, K. S., Chung, Y. R., Cho, K. Y., Lee, S.W., "Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*" 2005, *Appl Environ Microbiol* 71(12); 7768-7777
20. McClay, K., Boss, C., Keresztes, I., Steffan, R.J., "Mutations of toluene-4-monooxygenase that alter regiospecificity of indole oxidation and lead to production of novel indigoid pigments" 2005, *Appl Environ Microbiol* 71(9); 5476-5483
21. Ensley, B. D., Ratzkin, B. J., Osslund, T. D., Simon, M. J., Wackett, L. P., Gibson, D. T., "Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo" 1983, *Science* 14; 222(4620) :167-9
22. Drewlo, S., Bramer, C. O., Madkour, M., Mayer, F., Steinbuchel, A., "Cloning and expression of a *Ralstonia eutropha* HF39 gene mediating indigo formation in *Escherichia coli*" 2001, *Appl Environ Microbiol* Apr 67(4); 1964-1969.
23. Royo, J. L., Moreno-Ruiz, E., Cebolla, A., Santero, E., "Stable

- long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit" 2005, J Biotechnol 116(2):113-24
24. Furuya, T., Takahashi, S., Ishii, Y., Kino, K., Kirimura, K., "Cloning of a gene encoding flavin reductase coupling with dibenzothiophene monooxygenase through coexpression screening using indigo production as selective indication" 2004, Biochemical and Biophysical Research Communications 313(3); 570-575
25. Gandra, N., Frank, A. T., Gendre, O. L., Sawwan, N., Aebisher, D., Liebman, J. F., Houk, K. N., Greer, A., Gao, R., "Possible singlet oxygen generation from the photolysis of indigo dyes in methanol, DMSO, water, and ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate" 2006, Tetrahedron 62(46); 10771-10776
26. Berry, A., Dodge, T. C., Pepsin, M., Weyler, W., "Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo" 2002, J Ind Microbiol Biotechnol 28(3); 127-33
27. Meyer, A., Wursten, M., Schmid, A., Kohler, H. P., Witholt, B., "Hydroxylation of indole by laboratory-evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase" 2002, J Biol Chem 13; 277(37); 34161-34167
28. Choi, K. Y., Kim, D., Koh, S. C., So, J. S., Kim, J. S., Kim, E., "Molecular cloning and identification of a novel oxygenase gene specifically induced during the growth of *Rhodococcus* sp. strain T104 on limonene" 2004, J Microbiol 42(2); 160-162
29. Tanyildizi, M. S., Elibol, M., ÖZER, D., "Optimization of growth medium for the production of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* using response surface methodology" 2006, J. chem. technol. biotechnol 81(4); 618-622
30. 김진권, "재조합 유전자를 이용한 천연 indigo 생산" 2003, 조선대학교 생물신소재학과 석사학위 논문

31. 최창용, 장미경, 공병기, 최혜영, 나상권, 이동병, 나재운, “*Polygonum Tinctoria*와 합성 인디고 염료의 물리화학적 특성 비교” 2002, Applied Chemistry 6(2); 595-598
32. 진성룡, 이명학, 김성동, “면 데님 가먼트의 인디고 염색” 2000, 한국섬유공학회지 37(6)
33. 장은숙, 채용안, “Effect of indole on the cell growth and synthesis of indirubin in suspension culture of *Polygonum tinctorium* LOUR” 1991, Korean J. Medicinal 3(2); 96-99
34. Walter Weyler, Sol M. Resnick, "Microorganism with ability to degrade indole and enzymes therefrom" 2003, Patnet: US 6,642,031 B2
35. Myers, R. H., Montgomery, D. C., "Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 1st edn." 1995, Wiley-Interscience: New York

