

발간등록번호

11-1543000-000155-01

친환경 미생물제초제 herboxidiene의 산업화를 위한 연구에 관한
연구

(Metabolic engineering approach for mass production of
herboxidiene and analogous as Eco-friendly herbicide)

선 문 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “친환경 미생물제초제 herboxidiene의 산업화를 위한 연구에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 7 월 27 일

주관연구기관명 : 선문대학교

주관연구책임자 : 송 재 경

세부연구책임자 : 송 재 경

연 구 원 : 이 주 호

협동연구기관명 : 국립농업과학원

협동연구책임자 : 이 창 목

협동연구기관명 : 이화여자대학교

협동연구책임자 : 윤 여 준

요 약 문

I. 제 목: 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 산업화를 위한 연구에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

● 연구개발의 목적 및 필요성

이차대사산물 유래의 천연물 의약품은 현재까지 제약 산업에서 가장 중요한 품목이나 new chemical entity의 감소로 신약개발의 속도가 둔화되고 있음. 또한 특허가 만료되는 기존 블록버스터 이차대사산물 의약품의 경우는 단기간 내의 고생산성 균주의 개발이 산업화 성공에 가장 중요한 요소이나 random mutagenesis에 주로 의존하는 고전적인 방법은 한계가 있으며, 목적하는 물질을 생산하는 식물 또는 야생 미생물 균주의 유전자 조작과 배양이 어려울 경우, 기존 대사공학을 적용하기 어려운 점 등 대량생산에는 많은 기술적 어려움이 있음. 따라서 단기간에 고생산성 균주와 개량신약의 개발을 가능하게 하는 보편적 기술의 개발이 필요하며 이에 대한 획기적인 솔루션으로서 목적 물질의 생합성 유전자집단을 최적화된 세포공장에서 안정적이고 효율적으로 발현하는 합성생물학적 접근법의 개발이 필요함.

● 연구 개발의 최종 목표

미생물유래 친환경 미생물제조제의 산업화를 위하여, 단기간 내의 생산성 향상연구를 통하여 상용화 가능성이 높은 herboxidiene을 대상으로 하여

- ① 생합성 유전자집단 확보,
- ② 고생산성 균주 개발,
- ③ 대량생산을 위한 발효 및 분리공정 개발,
- ④ 조합생합성에 의한 유도체 개발을 통한 신규 제조제의 개발,
- ⑤ herboxidiene의 제형개발을 통한 실용화를 목적으로 한다

III. 연구개발 내용 연구 내용

- S. chromofucus 전체지놈 분석, herboxidiene 생합성 유전자 분석, 분리 및 염기서열에 근거한 생합성 유전자들의 역할 및 생합성 경로 분석
- 유전공학에 의한 herboxidiene 고생산성 균주의 개발, 대사공학에 의한 생산성 향상
- Herboxidiene의 생산 및 분리정제 공정의 개발, 발효조를 이용한 herboxidiene 의 발효조건 최적화 및 발효조건 scale-up
- Herboxidiene 유도체 개발; P450 유전자 확보 및 효소에 의한 유도체 생성, glycosylation에 의한 GT 유전자 확보, 효소발현 및 herboxidiene glycoside 합성, 균주 개량에 의한 herboxidiene glycoside 생산

균주 개발 및 생산

○ 미생물제조제 제형 개발 및 산업화; 천연 제조제 기초 농업활성 측정, 실용화를 위한 허복시디엔의 작물별 성장 저해확인 및 허복시디엔을 이용한 미생물 제조제 제형 및 범위(필요에 따라 제목을 달리 할 수 있음)

IV. 연구개발결과

① Herboxidiene의 생합성 유전자 확보, 유전자 분석 및 규명

- *S. chromofuscus* genome 분석 총 9,142,143 bp, 인접 유전자 포함 herboxidiene 생합성 유전자 180 kb 확보 및 유전자 분석, 분석결과로부터 Herboxidiene 생합성과정 추정.
- 염기서열 분석을 통하여 1종 (*herA*)의 조절유전자를 예측하였고, *herA*를 과발현시킨 균주의 생산성 및 전사체 분석을 통하여 herboxidiene의 생합성 과정 중에 negative 조절 유전자의 역할을 함을 규명함.

② 고생산성 균주 개발

- 재조합된 pACC152, pASA152, pSAM152, pAfsR152 및 pSA152 *S. chromofuscus* 균주에 전이하여 각각 *S. chromofuscus* ACC152, *S. chromofuscus* ASA152, *S. chromofuscus* ASM152, *S. chromofuscus* AFSR152 및 *S. chromofuscus* SAI152 균주를 제작.
- 최적배지를 이용하여 *S. chromofuscus* SIBR내에서 1.32배까지(0.976 g/L) 증가
- *S. chromofuscus* AFS는 1.7배(1.258 g/L) 증가
- *S. chromofuscus* GIBR은 3.85배(2.849 g/L) 증가

③ 대량생산을 위한 배지 최적화, 발효 및 분리공정 개발

- 유도체 검출을 위한 시료의 전처리 과정과 HPLC 및 LC-MS 분석방법의 정립.
- 기존 배지는 54.89 mg/L herboxidiene이 생산에서 carbon/nitrogen 최적화에 따라 200.2-744.6 mg/L (3.7-13.7 배)이 생산 증가.
- Feeding에 의한 생산성 증가 최적화: Glycerol과 ProFlo 배양 후 feeding 하여 herboxidiene 1087 mg/L (19.8 배)생산.

④ 조합생합성에 의한 유도체 개발을 통한 신규 제조제의 개발

- *in vitro*에 의한 Glucosyl-herboxidiene 및 Galacosyl-herboxidiene의 합성.
- pSET152 galU 및 *yjiC*를 재조합한 pGYIBR을 전이하여 *S. chromofuscus* GYIBR 균주로 부터 herboxidiene glycoside로 생산.
- 외래 *epoF*의 발현을 통하여 신규유도체로 보이는 물질을 HPLC-ESI-MS를 통하여 검출, 생산이 매우 소량되어 명확한 구조 분석을 실시하지 못하였음.
- 메타게놈을 이용한 herboxidiene 유도체: 국내 고유 토착 미생물 메타게놈 유전자은행 스크리닝, Tributyrin 가수분해 Esterase/Lipase 등 33종 확보, 염기서열 분석, ORF 확인, 신규성 유전자 4종 확인, 대장균에서의 대량발현 및 발현조절 및 Cold-active 에스테라아제 ES2-1 발현, 효소안정성, 기질특이성 분석.

⑤ Herboxidiene의 제형개발을 통한 실용화

- 천연 제조제 기초 농업활성 측정; 애기장대 *in vitro* 제조활성 검증 및 MIC 측정, 잡초 8종에

대한 제초활성 확인 및 벼와 밀에 대한 위해성 확인

- : 국내 주요 발작물 5종 (배추, 파, 김장무, 고추, 마늘)에 대한 허복시디엔 위해성 확인 및 허복시디엔 제초제 작물별 유효 활성 농도 측정.
- 허복시디엔을 이용한 미생물 제초제 제형 실용화: 전착제 혼입을 통한 허복시디엔 제초활성 증진 확인 및 기존의 Sulfonate 성분 포함 전착제 (동부카바와 동방전착제)가 효율적 허복시디엔 제형개발에 가장 적합함을 확인.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 과제의 연구결과 국내·외 최초의 제초제 허복시디엔의 농업특징조사가 이루어졌다. 기존의 몬산토에서 개발초기에 이루어진 농업특징 조사는 작물은 국내 농경지에 직접 영향을 미치기 어려운 잡초들에 대한 부분적인 정보만이 보고되었다.
- 본 과제에서는 국내 상황에 적합한 벼, 배추, 김장무, 마늘, 파 등에 대하여 실증 실험을 통하여 실용화 가능한 작물 선별, 약해 정도 및 적정 사용 농도를 파악한 점에서 앞으로 허복시디엔 제초제의 실용화를 위한 중요한 농업 기초자료를 제공한다. 또한 미생물 제형 개발을 위하여 허복시디엔 활성 증대에 중요한 성분을 확인하였으므로, 기업체에서 제초제로 실용화하기 위한 유용한 제형 개발 정보를 제공한다.
- 국내에서 개발한 고유한 특허 유전자원을 확보하였고, 이를 사용한 허복시디엔 유도체 합성체가 차후에 이루어지면 원천 신규 특허를 확보하게 되므로 국제 경쟁력 향상에 큰 기여를 하게 될 것으로 예측된다.
- 본 연구의 최종 목적으로 배지의 최적화와 Herboxidiene 고생산성 균주를 개발하여 현재 (특허출원) 50 mg/L 수준에서 2,850 mg/L 수준까지 개발 되어 생산성은 60배 이상 향상되어 산업균주에 근접해 있어 산업화 가능하며 가능한 회사에 기술 이전할 예정이다.
- 신규 herboxidiene 유도체 개발을 위해 in vivo 및 in vitro glycosylation 이 성공적으로 이루어져 (특허출원) 균주에서 생산이 가능하며 또한 P450에 의해 herboxidiene의 aglycone 변형도 가능하며 이들에 대해 균주특허 및 물질 특허를 확보할 예정이며, 신규 herboxidienedmf 이용하여 새로운 제초제 개발 혹은 최근에 항암제로서 개발하기 위해 좀 더 연구가 필요하다.

SUMMARY

(영문요약문)

Herboxidiene is a secondary metabolite produced mainly by *Streptomyces* strain A7847. Structural features of herboxidiene include tetrahydropyran acetic acid moiety, the conjugated diene system, and an ester group.

○ Analysis of herboxidiene gene cluster

I tried to sequence of *S. chromofuscus* genome and get the information of 9,142,143 bp. The biosynthetic gene cluster (60 kb) was identified from these results. The biosynthetic pathway of herboxidiene was proposed from the analyzed gene cluster. Also the gene cluster of herboxidiene was cloned from the DNA library.

○ The overproduction of herboxidiene by media optimization

The production media was optimized with carbon and nitrogen sources In order to produce herboxidiene efficiently. The results show the enhancement of 200.2-744.6 mg/L (3.7-13.7 times) when it compared with the existing media.

○ The development of *S. chromofuscus* by genetic engineering

S. chromofuscus was engineered to make the high producer of herboxidiene. pACC152, pASA152, pSAMI52, pAfsR152 and pSAI52 were constructed and they are transferred to *S. chromofuscus*. And finally *S. chromofuscus* ACC152, *S. chromofuscus* ASA152, *S. chromofuscus* ASM152, *S. chromofuscus* AFSR152 and *S. chromofuscus* SAI152 were made from the transformants.

- *S. chromofuscus* SIBR was enhanced to the production of 0.976 g/L (1.32 times).
- *S. chromofuscus* AFSR was enhanced to the production of 1.258 g/L (1.32 times)
- *S. chromofuscus* GIBR was enhanced to the production of 2.849 g/L (3.85 times)

○ Synthesis of new herboxidiene derivatives.

- Herboxidiene glucoside and galactoside were synthesized by YjiC with UDP-glucose and UDP-galactose.
- The producer strain of herboxidiene glucoside (*S. chromofuscus* GYIBR) was constructed by the transformation of the expression vector including yjiC and galU. This strain was identified to produce herboxidiene glucoside by Mass analysis.
- The epoF was expressed in homologous and heterologous system to synthesize the new herboxidiene analogue. The new herboxidiene analogue including epoxide group was identified by Mass but was not identified by NMR yet.
- The function of herA gene was identified to express in *S. chromofuscus*. This gene is the negative regulatory gene

○ Herboxide type for industrialization

The natural compound showed effective herbicidal activity at relatively low effective concentration ($\approx 1,000 \mu\text{g/ml}$) against most important domestic biennial weeds in Korea including *Sorghum bicolor*, *Echinochloa*

crusgalli, *Digitaria sanguinalis*, *Solanum nigrum*, *Aeschynomene indica*, *Abutilon avicennae*, *Arabiosopsis thaliana* and *Xanthium strumarium*.

Herboxidiene inhibited both seed germination and stem elongation for these weeds. Addition of agricultural detergents containing sulfonate compounds to herboxidiene lowered *in vitro* effective concentration more than 5-fold.

Herboxidiene had photocytotoxicity to rice, chinese cabbage, radish, and pepper. However, herboxidiene caused no damage to garlic and various chives, suggesting herboxidiene as an important agricultural herbicide applicable to several major field crops in Korea like garlic and chives.

To investigate the enzymes that can enhance herbicidal activity, we constructed and screened esterases / lipases from "Dokdo" deep sea sediment microbial metagenomic libraries by using substrate (1% Tributyrin) hydrolysis assay. Screening of more than 42,000 individual clones identified 4 novel esterases among 32 esterase candidates. Further ORF cloning and protein expression in *E. coli* demonstrated 2 novel cold-active esterases may be useful for the ester group modification of herboxidiene at low reaction temperature.

CONTENTS

(영 문 목 차)

| | |
|---|----|
| Chapter 1. Introduction | 1 |
| 1-1. The goals of the proposed R&D | 1 |
| 1-2. The necessity of the proposed R&D | 1 |
| 1-3. Introduction of herboxidiene | 3 |
| 1-4. The contents of the proposed R&D | 4 |
| Chapter 2. The current status in the proposed R&D | 6 |
| 2-1. The international current state of the proposed R&D | 6 |
| 2-2. The domestic current state of the proposed R&D | 7 |
| Chapter 3. The results of the carried R&D | 9 |
| 3-1. Research contents and method of the proposed R&D | 9 |
| 3-2. The results of the proposed R&D | 21 |
| Chapter 4. The degree of achievement of R&D goal and the contribution of R&D results in the related areas | 71 |
| Chapter 5. The application plan of the R&D results | 75 |
| Chapter 6. The collected information about the related international technologies during the period of R&D | 76 |
| Chapter 7. Instrument | 77 |
| Chapter 8. References | 78 |

목 차

| | | |
|--------|--|----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | 1 |
| 제 1 절. | 연구개발의 최종목표 | 1 |
| 제 2 절. | 연구개발의 필요성 | 1 |
| 1. | 국내의 농약시장 현황 분석 및 전망 | 1 |
| 2. | 합성농약의 문제점 및 미생물농약 개발의 필요성 | 2 |
| 3. | 미생물유래 친환경 미생물제초제의 필요성 | 2 |
| 4. | 상용화연구의 필요성 | 3 |
| 제 3 절. | 친환경 미생물제초제 herboxidiene | 3 |
| 1. | Herboxidiene의 구조 | 3 |
| 2. | Herboxidiene의선택적제초활성 | 4 |
| 3. | Herboxidiene관련특허분석 | 4 |
| 제 4 절. | 연구개발의 범위 | 4 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 6 |
| 제 1 절. | 국 외 | 6 |
| 1. | 세계 농약 시장과 전망 | 6 |
| 2. | Herboxidiene의 전합성 (total synthesis) 연구 | 6 |
| 3. | 미생물의생산성향상연구 | 6 |
| 제 2 절. | 국 내 | 7 |
| 1. | 국내 농약 시장과 전망 | 7 |
| 2. | 국내외 미생물의 생산성 향상 연구 | 7 |
| 제 3 장 | 연구개발 수행 내용 및 결과 | 9 |
| 제 1 절 | 연구 내용 및 방법 | 9 |
| 1. | 친환경 미생물제초제 herboxidiene의 생합성 유전자집단 | 9 |
| 가. | Herboxidiene 생합성 유전자집단 확보 | 9 |
| 나. | Herboxidiene 생합성 경로 규명 | 10 |
| 다. | 최적발효(생산) 조건 검토 | 10 |
| 라. | 발효조예의 발효조건 최적화 | 10 |
| 마. | Herboxidiene 및 유도체의 분리공정 최적화 및 scale-up..... | 10 |
| 바. | 대사체 분석에 의한 herboxidiene의 생합성 경로의 속도결정단계 진단 | 10 |
| 2. | 유전공학에 의한 herboxidiene 생산성증가 | 11 |
| 가. | 생합성 전구체의 이중숙주 내 농도증가를 통한 생산성 향상 | 11 |
| 나. | Malonyl-CoA 및 metylmalonyl-CoA 세포내 농도 증가전략 | 11 |

| | |
|---|----|
| 다. CoA 및 acetyl-CoA의 세포내 농도 증가 전략 | 12 |
| 라. SAM의 세포내 농도 증가 전략 | 13 |
| 마. 조절 및 내성유전자를 통한 생산성 향상 전략 | 13 |
| 3. 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 유도체 통한 신규 미생물제조제 | 14 |
| 가. 당화반응에 의한 Herboxidiene glycoside 유도체 합성 | 14 |
| 나. 조합생합성법을 통한 유도체 합성 | 14 |
| 4. 작물별 허복시디엔 제조 활성 검증 | 15 |
| 가. 활성 검증에 사용된 국내 주요 작물 | 15 |
| 나. 천연제조제 허복시디엔과 작물 기내(in vitro) 배양 | 16 |
| 다. 천연제조제 허복시디엔 혼입 전착제 | 17 |
| 라. 허복시디엔 작물 온실 처리 | 17 |
| 5. 허복시디엔 유도체 제작을 위한 토착 메타게놈 유전자 확보 | 17 |
| 가. 미생물 메타게놈 시료 | 17 |
| 나. 미생물 메타게놈 분리 및 유전자은행 제작 | 18 |
| 다. 메타게놈 유전자은행에서 에스테라아제 스크리닝 및 클로닝 | 18 |
| 라. 신규 에스테라아제의 생화학적 및 동역학적 특성분석 | 19 |
| 제 2 절 연구 결과 | 21 |
| 1. Strpetomyces chromofurus A7847 균주의 지놈분석 | 21 |
| 가. DraftSequencing..... | 21 |
| 나. Assemble | 21 |
| 다. NewGAS System 구축 완료 | 21 |
| 2. Herboxidiene의 생합성 유전자 집단 확보 | 22 |
| 가. Herboxidiene의 생산균주 genomic libray 제작 | 22 |
| 나. Herboxidiene 생합성 유전자 집단 클론하기 위한 탐침 확보 | 22 |
| 다. Colony hybridization | 22 |
| 라. 유전자 분석과 추정되는 생합성 과정 | 23 |
| 3. Herboxidiene 추출과 분석방법의 정립 | 25 |
| 가. HPLC 및 MS 분석을 위한 시료의 전처리 방법 확립 | 25 |
| 나. HPLC 및 LC-MS 분석방법의 정립 | 26 |
| 4. 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 배지 조성에 의한 생산성 증가 | 28 |
| 가. S. chromofurus A7847 균주의 배양과 herboxidiene의 분리 | 28 |
| 나. 배지 최적화에 의한 herboxidiene 생산성 증가 | 30 |
| 5. 유전공학에 의한 생산성 증가 균주 개발 | 36 |
| 가. 생산성 증가 균주 개발 | 36 |
| 나. Herboxidiene의 생산량 분석 | 39 |
| 6. Herboxidiene glycoside의 합성 및 생산 | 41 |
| 가. in vitro 에서 herboxidiene glycoside의 합성 | 41 |
| 나. S. chromofuscus 균주에서 herboxidiene glycosides의 생산 | 43 |

| | |
|--|----|
| 7. 조합생합성에 의한 Herboxidiene 신규 유도체의 개발 | 46 |
| 가. 외래 P450 유전자의 발현을 위한 plasmid 및 균주 제작 | 46 |
| 나. 외래 P450 유전자의 발현에 따른 신규유도체의 개발 | 47 |
| 다. Streptomyces venezuelae 이종숙주로부터 신규 유도체 개발 | 48 |
| 라. 이종숙주에서 herboxidiene 배양 조건 및 추출 방법 | 49 |
| 8. Herboxidiene 조절유전자의 기능 규명 | 53 |
| 가. herA 유전자의 과발현 | 53 |
| 나. herA 유전자가 과발현된 균주의 전사체 분석 | 54 |
| 10. 천연제초제 허복시디엔의 제초 유효 활성 측정 | 56 |
| 가. 애기장대를 이용한 허복시디엔 최소 활성 농도(MIC) 측정 | 56 |
| 나. 고온 습식 멸균 처리에 의한 천연제초제 허복시디엔의 활성 검증 | 57 |
| 다. 전착제 사용에 의한 천연제초제 허복시디엔의 활성 변화 검증 | 58 |
| 라. 수도작물 벼에 대한 천연제초제 허복시디엔의 활성 검증 | 59 |
| 마. 천연제초제 허복시디엔의 종자발아억제 활성 검증 | 60 |
| 바. 국내 유해 잡초에 대한 천연제초제 허복시디엔의 경엽처리 활성 검증 | 61 |
| 사. 국내 주요 작물에 대한 천연제초제 허복시디엔의 경엽처리 약해 검증 | 62 |
| 11. 천연제초제 허복시디엔 유도체 제작을 위한 토착 원천 에스테라아제 확보 | 66 |
| 가. 메타게놈 유전자은행 스크리닝 및 클로닝 | 66 |
| 나. 에스테라아제 유전자 분석 및 대장균 이종발현 | 66 |
| 다. 신규 에스테라아제 ES2-1의 생화학적 특성분석 | 68 |
| | |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 71 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 | 75 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 76 |
| 제 7 장 연구시설·장비 현황 | 77 |
| 제 8 장 참고문헌 | 78 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 최종목표

미생물유래 친환경 미생물제초제의 산업화를 위하여, 단기간 내의 생산성 향상연구를 통하여 상용화 가능성이 높은 herboxidiene을 대상으로 하여

- ① 생합성 유전자집단 확보,
- ② 고생산성 균주 개발,
- ③ 대량생산을 위한 발효 및 분리공정 개발,
- ④ 조합생합성에 의한 유도체 개발을 통한 신규 제초제의 개발,
- ⑤ herboxidiene의 제형개발을 통한 실용화를 목적으로 한다

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 국내외 농약시장 현황 분석 및 전망

□ 세계 농약 시장과 전망

- 세계 작물보호용 농약시장은 2004년도 기준으로 318억 USD로서 전체 정밀화학산업 (7,200억 USD) 의 4.4%이며 2003년보다 명목 성장율로 12.5% 증가되었고 실질 성장률도 4.8% 증가되었음. 그이유로는 작물 재배 면적의 증가에 따른 병해충 및 잡초의 발생이 많았기 때문임.
- 향후 세계 농약 시장은 곡물 생산량의 감소와 단가 상승으로 2003년부터는 작물재배 면적의 증가로 시장이 증가하게 되어, 2004년도 시장 상황은 2003년 대비 실질 성장률이 4.8% 수준으로 증대되었음. 이런 경향을 고려할 때 2013년도에는 총매출액 규모가 380억 USD에 달할 것으로 예상된다.
- 세계적으로 고품질 먹거리에 대한 요구가 증가하고 이에 필요한 농약의 사용이 꾸준히 증가될 것이며 각국의 농업여건, 즉 미국의 농업법안이나 EU지역의 공동 농업정책 등으로 인하여 농약 사용이 증가할 것으로 예상됨. 또한 동남아시아와 남미지역의 경제가 회복임에 따라 작물보호용 농약 시장 증가에 기여할 것으로 예상됨.
- 특히, 환경문제의 관심이 고조됨에 따라 환경친화적인 미생물농약의 개발이 가속화되어 매년 10% 이상의 성장률을 보여 2013년도에는 화학농약 시장을 잠식하거나 또는 별도의 시장으로 확대되어 25억 USD 이상의 시장을 형성할 것으로 예상된다.

□ 국내 농약 시장과 전망

- 국내 농약 시장은 원제업과 완제업 시장으로 나누어 볼 때, 2003년도 원제 시장규모는 국내 출하와 수출금액을 포함하여 약 969억원이고 완제업은 9,280억원 규모로 전체 10,249억원으로 형성되어 있으며 원제는 감소하는 한편 완제는 서서히 증가하는 경향임.
- 수출입 현황을 보면 수입이 수출보다 10배 이상 많아 2003년도를 제외하면 평균 2억7천만 USD 수준을 보이고 있음. 완제품은 원제보다 수출입 규모가 매년 증가하고 있지만 2003년도에 수입이 3천6백만 USD, 수출이 90만 USD 수준으로 미미한 실정임.
- 한편, 환경친화적인 농약 사용이 증가될 것으로 예상되므로 우리나라 농약시장은 이러한 신규 미생물

농약들의 출시로 꾸준히 성장할 것으로 판단되어 2013년도에는 1조3천억원의 시장이 형성될 것으로 예상되며, 국내 농산업의 품질향상과 생산성 향상에 근간을 이루는 고수의 산업으로 그 위상을 굳힐 것으로 전망된다.

2. 합성농약의 문제점 및 미생물농약 개발의 필요성

- 전 세계적으로 합성농약은 농작물의 병해충 방제 과정에서 사용되는 유효성분의 잔류 및 대사물질에 의한 인축 독성 및 환경오염 등 사회적인 문제를 일으키고 있다.
- 또한 보다 안전한 합성농약을 사용하지 않은 고품질의 유기농 먹거리에 대한 수요가 증가함에 따라 친환경적이며 독성이 적은 미생물농약 개발의 중요성 및 시급성이 대두되고 있다.
- 이러한 문제점을 해결하기 위하여 국제적으로 합성농약의 사용량을 줄여나가고 있으며, OECD 회원국의 경우 원제 생산량을 2013년 까지 2004년 기준으로 40% 축소하기 위하여 제도적으로 규제하고 있다.
- 인축 독성 및 환경오염 등 합성농약의 문제점을 해결하면서 병해충으로부터 농작물을 보호할 수 있는 기술적 방안으로 주로 방선균 등 토양 미생물로부터 생산되는 이차대사산물인 미생물농약이 유력하게 제시되고 있다.

3. 미생물유래 친환경 미생물제초제의 필요성

- 산업적으로 제초제 시장은 전체 농약 시장의 40% 이상을 점유하고 있는 중요한 품목이며, 현재까지 유기합성된 화학적 제초제는 농업 생산성에 많은 기여를 하였으나 대부분의 잡초에 있어서 제초제에 대한 저항성 발생으로 인하여 더욱 강력한 새로운 제초제의 개발이 요구되고 있으며 또한 잔류독성 등의 환경오염 문제점이 있다.
- 따라서 강한 제초활성을 가지면서 식물체 이외의 미생물에 대해서는 독성이 없으며, 잡초와 작물간 높은 선택성을 보이고, 또한 자연적으로 생분해성인 친환경적 제초제의 개발의 필요하다.
- 현재까지 개발된 대부분의 농업용 미생물농약은 미생물 특히 토양미생물인 방선균유래이며, 따라서 친환경적 미생물제초제의 개발을 위해서는 미생물 자체를 이용하거나 또는 미생물의 대사산물을 이용하는 미생물유래 미생물농약인 미생물제초제의 개발 및 산업화 연구가 절실하다.
- 방선균이 생산하는 미생물유래 제초활성물질로서 산업적으로 개발된 대표적인 물질은 bialophos이며 (Fig.1) 이러한 성공은 광범위 스펙트럼, 강력한 제초활성, 발효에 의한 대량생산의 성공 등에서 원인을 찾을 수 있다.

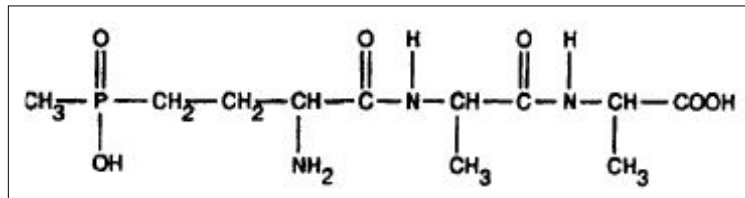


그림 1 토양미생물인 방선균유래의 대표적인 미생물제초제인 bialophos의 구조

- 따라서 bialophos와 동일한 광범위한 스펙트럼을 특성으로 하며 미생물 발효에 의한 대량생산이 가능한 물질을 선정하여 대량생산과 유도체 생산을 통한 신규물질의 개발 시 친환경 미생물제초제의 산업

화 가능성은 매우 높다.

4. 상용화연구의 필요성

- 미생물농약 관련 산업은 기술집약적 산업으로, 국내농업의 미생물농약 산업에 대한 의존도가 매우 높은 현시점에서 주요한 농산업의 기반기술임. 그럼에도 불구하고 현재 국내에서 사용되고 있는 미생물농약들은 외국에서 개발되어 산업화된 것으로 국내 농산업 기반산업의 외국기술에 대한 종속을 심화시키고 있다.
- 이와 같은 산업적 요구에 의거하여, 최근에 미생물농약의 개발을 위한 집중적인 연구투자가 수행되어 왔음. 그럼에도 불구하고 국내의 산업화 연구를 통하여 국내외에서 상용화된 물질이 없음. 이는 미생물농약의 산업화를 위한 연구보다는 물질 스크리닝과 효과검정에 중심을 둔 기초연구에 투자한 결과임. 또한 농용 제초제등 미생물농약은 의약품과는 달리 시장가격은 낮으나, 생산단가는 의약품과 동일하다는 한계가 있으므로 상용화에 어려움이 있음. 따라서 단기간 내에 미생물제초제 등 생물농약의 상용화를 위해서는, 기존의 의약품 신약개발의 연구와는 차별화된 새로운 접근법이 필요하며, 또한 생물농약의 상용화를 위한 적극적이며 집중적인 연구개발이 절실하다.
- 따라서, 현재 생물농약으로서의 효과가 이미 검증되었고, 산업화에 근접하여 상용화 가능성이 높은 물질을 대상으로 한 상용화 연구가 절실함. 국외에서 이미 상용화가 시도되고 있는 이들 물질을 대상으로 국내연구진이 확보하고 있는 선진대사공학 기술을 이용하여, 국외연구진과 적극적인 경쟁을 통해 생물농약의 상용화를 추진할 필요성이 있음. 이러한 방법이 국내외에 실질적으로 상용화하여 시판할 수 있는 농용 생물농약 개발의 가능성을 높이는 효과적인 접근법이 될 것이다.

제 3 절. 친환경 미생물제초제 herboxidiene

1. Herboxidiene의 구조

- Herboxidiene은 토양 방선균인 *Streptomyces chromofuscus* A7847 (ATCC 49982)로부터 생산되는 폴리케타이드 (polyketide) 계열의 화합물로서 (Fig. 2) 1992년 미국 Monsanto사에 의해서 발견되었다. [J. Antibiot. 1992. 45(6):914-921].

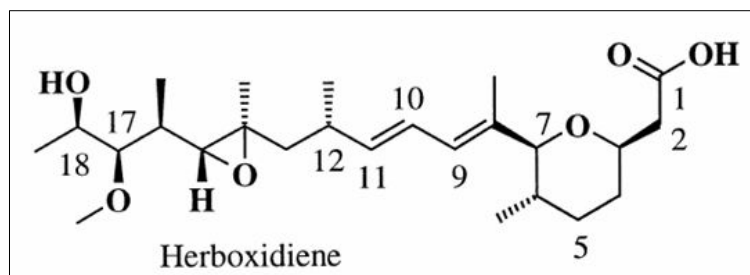


Fig. 2 Herboxidiene의 구조

2. Herboxidiene의 선택적 제초활성

- Herboxidiene은 유채, 야생메밀, 나팔꽃 등의 광범위한 잡초를 대상으로 매우 높은 활성을 보이며, 반면

에 작물인 벼, 콩, 밀 등에는 전혀 영향을 주지 않는 뛰어난 선택성을 보이는 우수한 제초제이다 [J. Antibiot. 1992. 45(6):914-921].

- 35 g/hectare의 농도로 처리하였을 경우 언급한 잡초들의 성장을 90% 저해하였으며, 7 g/ha의 낮은 농도에서도 75%의 방제효과를 보임. 또한 5.6 kg/ha의 높은 농도에서도 밀 등의 작물에는 무해한 것으로 보고 있다 (Table 1).
- 이와 같이 herboxidiene은 제초활성과 선택성이 매우 우수하므로 농업용 미생물제초제로서 개발 가치가 매우 높으며, 현재는 발효에 의한 생산성이 낮아 농용 제초제로서의 상용화가 늦어지고 있는 실정임. 또한 보다 다양한 유도체의 개발을 통하여 신규 미생물제초제 또는 의약품 항암제로의 개발 가능성도 매우 높다.

Table 1. Herboxidiene의 whole plant에 대한 post-emergence activity

| Rate (kg/hectare) | % Inhibition | | | | | | | |
|----------------------|--------------|------|-------------------|------------------|-------|------|-------|------------------|
| | Soybean | Rape | Wild buckwheat | Morning glory | Wheat | Rice | Maize | Hemp sesbania |
| 5.592 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 |
| 1.118 | 75 | 100 | 100 | 100 | 0 | 75 | 100 | 100 |
| 0.279 | 60 | 100 | 98 | 99 | 0 | 25 | 100 | 99 |
| 0.069 | 20 | 98 | 98 | 99 | 0 | 10 | 90 | 90 |
| 0.017 | 10 | 75 | 75 | 20 | 0 | 10 | 50 | 75 |

3. Herboxidiene 관련 특허 분석

- Herboxidiene은 1992년 Monsanto 사에 의해 처음 보고 되었으나 제초제로서의 특허는 등록되지 않았으며, 1997년 최초 보고된 herboxidiene의 생산균인 *S. chromofuscus* A7847 외 새로운 *Streptomyces* 균주로부터 분리된 동일한 화합물과 유도체들이 일본의 Kyowa Hakko Kogyo 사에 의해 항암제로서 특허가 등록되어 있다. [Herboxidiene derivatives and their preparation from *Streptomyces* GEX1 culture. Eur. Pat. Appl. (1997), 13 pp. EP 781772].
- 따라서 본 과제를 통하여 *S. chromofuscus* A7847의 herboxidiene 대량생산 균주 및 공정개발 성공 시 특허의 제한 없이 대량생산에 의한 상업화가 가능할 것으로 판단된다.

제 4 절. 연구개발의 범위

- Herboxidiene 생합성 유전자집단 및 생합성 경로 규명
- Herboxidiene 생합성 유전자들의 분리 및 염기서열 분석
- 염기서열에 근거한 생합성 유전자들의 역할 및 생합성 경로 분석
- Herboxidiene 고생산성 균주의 개발
- Random mutation에 의한 herboxidiene 고생산성 균주 선별
- 대사공학에 의한 생산성 향상
- 대사공학과 돌연변이법의 접목을 통한 최종 고생산성 균주의 확립

- Herboxidiene의 대량 생산 및 분리정제 공정의 개발
 - 소형 발효조를 이용한 herboxidiene 및 유도체들의 발효조건 최적화
 - 중대형 발효조를 이용한 herboxidiene 및 유도체들의 발효조건 scale-up
 - Herboxidiene 및 유도체들의 분리공정 최적화 및 scale-up

- Herboxidiene유도체 개발 및 활성연구
 - 조합생합성 (combinatorial biosynthesis)에 의한 유도체 생성
 - 전구체 유도 생합성 (precursor-directed biosynthesis)에 의한 유도체 생성
 - 순수 분리된 herboxidiene 유도체 및 부분 정제된 화합물들의 미생물학적 활성, 독성 평가

- 미생물제초제 제형 개발 및 산업화 연구
 - 생균제 제형 연구 및 방제효과 조사
 - 추출물제 안정성 및 산업화 연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국 외

1. 세계 농약 시장과 전망

- 세계 작물보호용 농약시장은 2004년도 기준으로 318억 USD로서 전체 정밀화학산업 (7,200억 USD) 의 4.4%이며 2003년보다 명목 성장율로 12.5% 증가되었고 실질 성장률도 4.8% 증가되고 있다. 그 이유로는 작물 재배 면적의 증가에 따른 병해충 및 잡초의 발생이 많았기 때문이다. 이런 경향을 고려할 때 2013년도에는 총매출액 규모가 380억 USD에 달할 것으로 예상되고 있다.
- 세계적으로 고품질 먹거리에 대한 요구가 증가하고 이에 필요한 농약의 사용이 꾸준히 증가될 것이며 각국의 농업여건, 즉 미국의 농업법안이나 EU지역의 공동 농업정책 등으로 인하여 농약 사용이 증가할 것으로 예상된다.
- 동남아시아와 남미지역의 경제가 성장함에 따라 작물보호용 농약 시장 증가에 기여할 것으로 예상된다. 특히, 환경문제의 중요성이 높아짐에 따라 환경 친화적인 미생물농약의 개발이 가속화되어 매년 10% 이상의 성장률을 보여 2013년도에는 화학농약 시장을 잠식하거나 또는 별도의 시장으로 확대되어 25억 USD 이상의 시장을 형성할 것으로 예상된다.

2. Herboxidiene의 전합성 (total synthesis) 연구

- Herboxidiene은 우수한 제조활성과 잠재적인 항암활성으로 대량생산이 요구되나 현재 미생물의 발효에 의한 대량생산에 대한 연구는 보고 되지 않고 있으며, 유기합성적 방법에 의한 전합성과 유도체 합성에 대한 연구가 다국적 제약기업인 Novartis 사와 일부 대학에서 진행 중이다.

3. 미생물의 생산성 향상 연구

- 최근 방선균 유전체 분석 프로젝트와 microarray, proteomics와 같은 'omics'기술의 발전으로 방선균의 유전정보와 조절기작을 유전체(genome), 전사체(transcriptome), 단백질체(proteome) 수준에서 관찰함으로써 방선균 연구가 비약적으로 발전하고 있다. 방선균 *S. coelicolor* [Nature, 2002, 417: 141]와 *S. avermitilis* [Nat. Biotechnol. 2003, 21: 526] 게놈프로젝트 완료로 생합성 경로 및 조절기작 규명이 가능해졌으며 이를 바탕으로 한 유용물질의 생산성 향상을 위한 체계적인 대사공학기법 적용의 기반이 마련되었다.
- 최근에는 전통적 균주 개량법과 genome shuffling을 동시에 활용한 보다 효율적인 균주 개량법이 제안되기도 하였다 [Nature, 2002, 415: 64]. 또한 유전체 분석기술의 발전에 힘입어 야생 생산균주의 유전자 조작과 배양이 어려워 신약으로 개발되기 어려운 화합물의 유전자원이 축적됨에 따라 고전적 방법으로 개량된 고생산 균주에 유용물질의 생합성 유전자를 이종 발현하여 대량생산하려는 시도가 보고되었다 [J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 480-488].
- 그러나 두 가지 방법 모두 고전적 균주개량법에 의존하며 유전자 수준에서의 정확한 고생산의 원인규명이 어려우므로 생산성 향상에 한계가 있으며 모든 유용물질의 대량생산에 보편적으로 사용가능한 다목적 이종숙주의 개발에 적용하기 어려운 문제점이 있다.

제 2 절. 국 내

1. 국내 농약 시장과 전망

- 국내 농약 시장은 원제업과 완제업 시장으로 나누어 볼 때, 2003년도 원제 시장규모는 국내 출하와 수출금액을 포함하여 약 969억원이고 완제업은 9,280억원 규모로 전체 10,249억원으로 형성되어 있으며 원제는 감소하는 한편 완제는 서서히 증가하는 경향이다. 수출입 현황을 보면 수입이 수출보다 10배 이상 많아 2003년도를 제외하면 평균 2억7천만 USD 수준을 보이고 있다. 완제품은 원제에 비하여 수출입 규모가 매년 증가하고 있지만 2003년도에 수입이 3천6백만 USD 인데 비하여 수출은 90만 USD 수준으로 미미한 실정이다.
- 반면 국내에서는 환경친화적인 농약 사용이 증가될 것이 확실하고 이런 경향에 따라 추정하면 국내 농약시장은 신규 미생물농약들의 출시로 꾸준히 성장할 것으로 판단된다. 2013년도에는 1조3천억원의 관련 신규 미생물 농약시장이 형성될 것으로 예상되며, 국내 농산업의 품질향상과 생산성 향상에 근간을 이루는 고수익 산업으로 그 위상을 굳힐 것으로 전망된다.

2. 국내의 미생물의 생산성 향상 연구

- 현재까지 국내에서 herboxidiene의 합성 및 발효에 의한 생산 또는 생합성 유전자 및 생합성 경로에 대한 연구는 전혀 보고된 바 없다.
- 미생물 유래 생리활성물질의 생합성에 대한 학문적 수준에서의 연구는 1990년대 중반이후 일부 대학과 정부출연연구소에서 활성화되기 시작하였으나, 대부분 생합성 유전자의 확보와 생합성 경로 규명 및 방선균 조절기작에 초점을 맞춘 기초적 연구이다.
- 유전자원을 활용한 유용 생리활성물질의 산업적 생산에 관한 연구는 극소수의 대학 연구팀에서 개발되고 있는 실정임. 특히 조합생합성을 이용한 생리활성물질의 유도체 생산과 대사공학을 통한 방선균 유래 유용물질의 생산성 향상에 관한 국제논문발표 등 가시적 연구결과는 본 과제의 연구책임자의 실험실에서만 보고되고 있다.
- 체계적인 대사공학을 동물 의약품 등 생리활성물질의 산업화를 위한 기업에서의 연구는 전혀 이루어지지 않고 있다.
- 최근에 본 과제의 참여연구원들은 본 과제의 참여기업인 진캠과 국내 벤처기업인 제노텍과 공동연구를 통하여 폴리케타이드 계열 항암제인 doxorubicin 생산 균주인 *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 균주의 전체 게놈의 유전자 분석을 완료하였음. *S. peucetius* ATCC27952는 이미 분석된 *Streptomyces coelicolor* 및 *Streptomyces avematilis* 와 게놈과 유사성을 보여주고 있으며, 전체 게놈은 8.1 Mb, GC content는 70.59% 전형적인 방선균 게놈 염기서열을 보여주고 있음. 본 결과를 토대로 doxorubicin 생산 증가와 관련된 조절기작 유전자 (global regulatory, specific regulatory), doxorubicin 생합성 전과정 유전자 (60 kb), precursor 일차대사 생합성 유전자 (glycolysis, acetyl-CoA 합성 유전자, ACP 관련 유전자), 내성 관련 유전자, SAM synthase, quorum sensor 관련 조절 기작 및 합성 유전자 등의 유전자들이 분석되어 일부 유전자를 이용하여 생산의 5-10 배 정도 생산 증가를 보여주고 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 내용 및 방법

1. 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 생합성 유전자집단 및 경로규명과 공정개발

가. Herboxidiene 생합성 유전자집단 확보

- 미생물의 2차 대사산물의 생합성 유전자들은 보통 염색체상에 집단 (cluster)을 이루고 있는 특징이 있으므로, 타겟 화합물의 생산에 관여하는 하나의 유전자를 클로닝하면 chromosomal walking에 의해 전체 생합성 유전자 집단을 확보할 수 있다. DNA 염기서열 분석법이 크게 발전하고 일반화되면서 일단 유전자 집단을 클로닝하면, 염기서열분석에 필요한 시간과 노력은 많이 줄어들었으나 약 9 Mbp에 해당하는 방선균의 genome으로부터 타겟 유전자 집단을 선별하고 확인하는 작업은 방선균 내 여러 가지 2차 대사산물의 생합성 유전자 집단이 동시에 존재하므로, 다양한 탐침 (probe)을 적절히 사용하는 효율적인 전략이 필요하다 (Fig. 3).

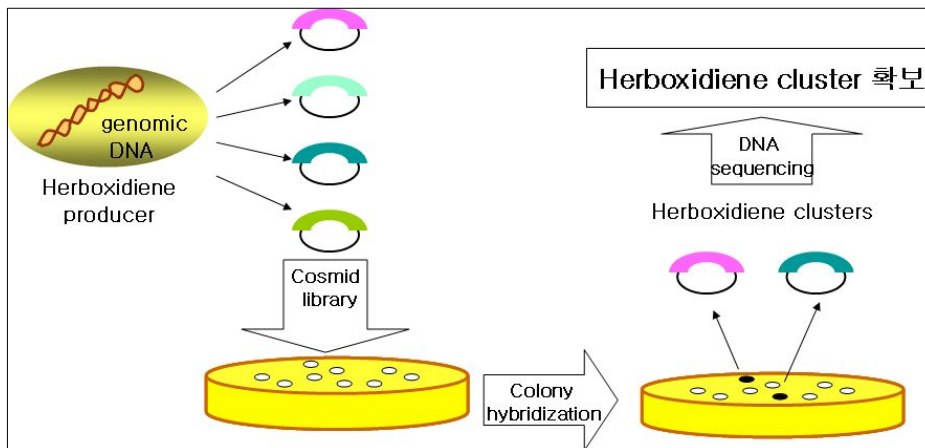


Fig. 3 Herboxidiene 생합성 유전자집단의 분리 및 분석 전략

● Polyketide synthase (PKS) 유전자를 탐침으로 사용하는 전략

Herboxidiene은 폴리케타이드 계열 화합물이며, 현재 수십 종의 폴리케타이드 화합물의 생합성 유전자의 염기서열이 보고되어 있으며 이들 생합성 유전자들 중 polyketide synthase (PKS) 부분을 비교해 보면, 염기서열과 domain 구성이 매우 유사한 것을 알 수 있음. 특히 PKS domain 중 ketosynthase (KS) domain의 염기서열은 모두 종류의 PKS에서 약 70-80%의 높은 유사성을 보이므로 기존 PKS 유전자의 KS domain을 탐침으로 사용하면 목적하는 herboxidiene 폴리케타이드 생합성 유전자 집단을 비교적 쉽게 확보할 수 있을 것임. 그러나, 보통 방선균에는 여러 가지의 2차 대사산물의 생합성 유전자 집단이 동시에 존재하므로 대상 방선균으로부터 특정 생합성 유전자 집단을 다른 2차 대사산물의 유전자 집단과 효율적으로 분리하여 선별하기 위해서 다양한 PKS 유전자의 탐침을 적절히 조합하여 적용하는 전략을 사용한다.

나. Herboxidiene 생합성 경로 규명

- 일반적인 polyketide 화합물의 생합성 유전자집단의 구성과 생합성 경로를 토대로 herboxidiene 생합성 경로를 예상할 수 있다
- 확보된 생합성 유전자를 각각 disruption이나 deletion을 통하여 그 중간체를 분석함으로써 이들 화합물에 관여하는 생합성 경로를 규명함. 하지만 wild-type에서 transformation 등의 유전자조작이 어려운 경우, 이들 생합성 유전자 cluster를 이종숙주에서 발현하여 유전자조작을 통해 생합성 경로를 규명할 계획이다.

다. 최적발효(생산) 조건 검토

- 배지조성 및 발효조건에 따른 *S. chromofuscus* A7847의 균체량, herboxidiene의 생산성을 조사한다.
- 먼저 flask 배양을 통하여 최적 배지성분의 검토를 위하여 herboxidiene의 생산능이 우수한 탄소원의 선정은 기본배지에 각종의 탄소원 (D-(-)Fructose, Glucose, Lactose, D-(+)-Maltose, Mannitol, Soluble starch, D-Sorbitol, Sucrose, Glycerol 등)을 1%(w/v) 씩 첨가하고 항진균 활성을 측정하여 선정하며, 질소원은 각종의 유기질소원과 무기질소원으로 부터 항균활성을 측정하여 선정한다.
- 또한 선정된 배지 조성 중 높은 활성을 나타내는 배지의 질소원들을 일정한 비율로 조절하여 활성을 측정하여 가장 우수한 성분을 선정하며, 금속염의 영향을 알아보기 위해서 각종 금속염(CaCO₃, NaCl, KCl, CuSO₄, K₂HPO₄, CaCl₂, FeCl₂, CoCl₂ 등)을 0.1%(w/v)이 되도록 첨가하여 생산에 미치는 영향을 조사한다.

라. 발효조예의 발효조건의 최적화

- 250ml baffled flask 및 1L baffled flask에서의 결정된 최적발효 조건을 바탕으로 산업적인 규모의 배양을 위해 소형 fermentor (1L, 5L)에서 최대생산조건을 조사하고, 세포의 성장과 항생물질의 생산성에 미치는 영향을 조사하여 실험실수준에서의 최적발효조건을 결정한다.

마. Herboxidiene 및 유도체의 분리공정 최적화 및 scale-up

- *S. chromofuscus* A7847을 대량 배양하여 발효액은 ethyl acetate으로, 균사체는 acetone 등을 이용하여 추출한 후 용매분별추출, column chromatography, crystallization을 수행하여 항생물질들을 분리공정을 최적화하고 생산을 위하여 scale-up 조건을 조사한다.

바. 대사체 분석에 의한 herboxidiene의 생합성 경로의 속도결정단계 진단 및 증폭

- 일반적으로 생합성 단계 중 속도결정단계를 결정하기 위하여 LC/ESI-MS/MS를 이용하여 생합성 중간체들을 프로파일링하면, 생합성 과정의 속도결정단계를 진단할 수 있다. 속도결정단계에 해당하는 생합성 유전자를 과발현 하여 최종 생성물인 생산성을 크게 향상시킬 수 있었으며 이러한 전략은 질량분석기를 이용하여 생합성의 속도결정단계를 진단하고 생산성을 향상시킬 수 있는 간단하며 효율적 방법이다.
- 일반적으로 polyketide는 생합성 과정 중 polyketide synthase (PKS)에 의한 aglycone의 생합성 단계

보다는 그 후에 일어나는 post-PKS 변형단계 즉, Fig.5에서와 같이 oxidation, methylation 등의 단계가 전체 생합성 경로의 속도결정단계일 가능성이 높으며 대사체 분석을 통하여 정확한 속도결정단계의 진단 후 해당 생합성 유전자의 과발현을 통하여 상당한 생산성 향상을 기대할 수 있다.

- 본 연구팀은 실제로 *Streptomyces venezuelae*에 의해 생성되는 항생제인 methymycin과 pikromycin의 생합성 중간체들을 프로파일링한 결과, 당화과정 이후의 중간체들 (YC-17과 narbomycin)이 축적되어있는 것을 관찰할 수 있었으며, 즉 당화이후의 hydroxylation 단계가 속도결정단계임을 확인할 수 있었음. 속도결정단계에 해당하는 pikC hydroxylase를 야생균주에서 과발현 하여 최종 생성물인 methymycin/neomethymycin 그리고 pikromycin의 생산성을 크게 향상 시킬 수 있었다 (Fig. 4).

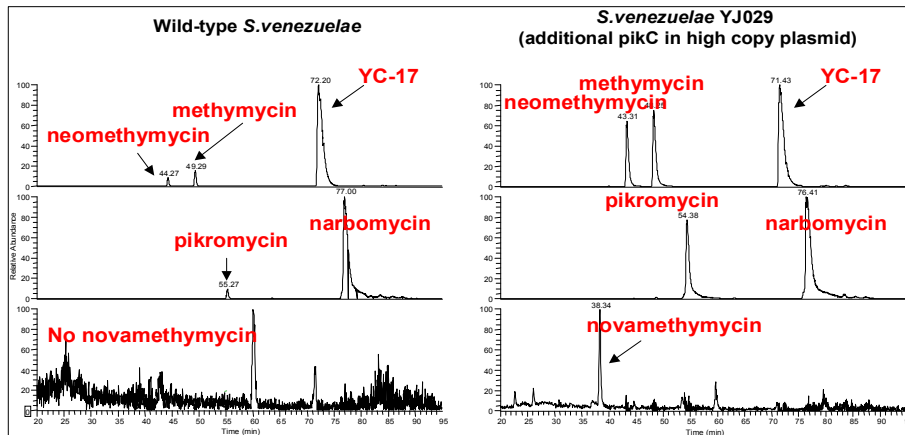


Fig. 4 생합성 유전자의 증폭에 의한 pikromycin 생산성 향상의 예

- 이러한 결과는 질량분석기를 이용한 간편하고 효율적인 생합성의 속도결정단계의 진단과 대사공학에의 응용에 의한 생산성 향상의 좋은 예를 보여준다 [Enzyme and Microbial Technology 2006, 39, 4778-4782].

2. 유전공학에 의한 herboxidiene 생산성 증가

가. 생합성 전구체의 이종숙주 내 농도증가를 통한 생산성 향상

- Herboxidiene은 전형적인 polyketide 이차대사물로서 생합성 전구체로서는 Fig.5와 같이 일차대사산물인 malonyl-CoA와 methylmalonyl-CoA가 사용됨. 또한 methyl group donor로서 S-adenosyl methionine (SAM)을 사용함. 따라서 대사공학을 통하여 malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA 및 SAM의 공급을 증가하면 herboxidiene의 생산성을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.
- 기존의 *S. coelicolor* 등의 방선균에서 알려진 전구체들의 생합성 유전자를 이용하여 과발현하여 생산성 증가할 수 있는 전략을 사용할 계획이다.

나. Malonyl-CoA 및 methylmalonyl-CoA 세포내 농도 증가 전략

- 일반적으로 방선균은 *E.coli*에 비해 세포내 malonyl-CoA의 농도가 약 100-200배 이상 높으므로 풍부한 생합성 전구체를 공급할 수 있을 것으로 기대됨. 그러나 이의 세포내 농도를 높일 수 있으면 추

가적인 생산성의 향상이 예상되므로 대사공학적 전략이 필요하다.

- 따라서 본 연구에서는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 과발현을 통해 이종숙주 내 malonyl-CoA의 농도를 높이고 생산성 향상을 유도하고자 한다.
- ACC의 효소 반응은 Fig. 5과 같이 두 단계로 진행된다.
 - 1단계 반응은 ATP에 의하여 bicarbonate가 phosphorylation 되어 carboxyphosphate 중간체를 형성된 후, carboxyl group이 효소에 결합되어있는 biotin (enzyme-biotin)에 전달되어 carboxybiotin이 형성됨.
 - 2단계 반응은 carboxyltransferase에 의해 carboxyl group이 biotin으로부터 acetyl-CoA에 전달되어 malonyl-CoA가 형성됨.

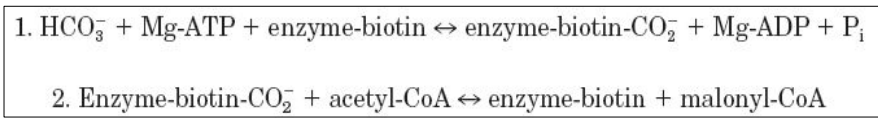


Fig. 5 Acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 효소반응

- Fig. 6의 1단계 반응에 관여하는 ACC의 α -subunit인 AccA2의 유전자와 2단계의 반응에 관여하는 β -subunit인 AccB의 유전자, 그리고 기능은 알려져 있지 않으나 ACC의 활성화에 필수적인 ϵ -subunit인 AccE의 유전자가, 방선균으로서 최초로 genome sequence가 완료되어 공개된 *S. coelicolor*에서 클로닝되어 기능이 밝혀졌다 [J. Biol. Chem. 2002, 277, 31228-31236]. 본 연구에서는 이들 AccA2, AccB, AccE의 유전자들의 이종숙주 내 발현을 통해 세포내 malonyl-CoA의 농도를 높이고 생산성을 향상시키고자한다 (Fig. 6).

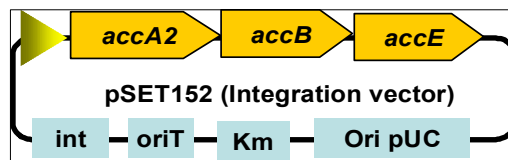


Fig. 6 ACC pathway의 발현벡터의 예

- 유산한 전략으로 methylmalonyl-CoA의 세포내 농도증가를 위하여 propionyl-CoA로부터의 경로 유전자인 propionyl-CoA carboxylase 유전자를 과발현하여 생산성을 향상시키고자 한다.

다. CoA 및 acetyl-CoA의 세포내 농도 증가 전략

- *E. coli*의 pantothenate kinase의 유전자인 *panK*를 과발현 시킬 경우, 세포내 coenzyme A의 농도와 acetyl-CoA의 농도가 증가함으로써 이들을 생합성 전구체로 사용하는 최종 대사산물의 생산성이 향상되는 보고가 있다 [Metab. Engineer. 2004, 6, 294-299].
- 즉, acetyl-CoA의 세포내 농도 증가 시, malonyl-CoA의 농도 증가 또한 기대되며 이는 target 화합물인 herboxidiene의 생산성 향상에 긍정적 영향을 줄 수 있으므로 *panK* 유전자를 이종숙주 내에서 과발현하여 생산성을 향상시키고자 함 (Fig. 7).

- 실제로 본 연구팀은 polyketide 계열 화합물을 생산하는 방선균에 *panK* 유전자를 과발현하면 생산성이 현저히 증가하는 결과를 확인하였다.

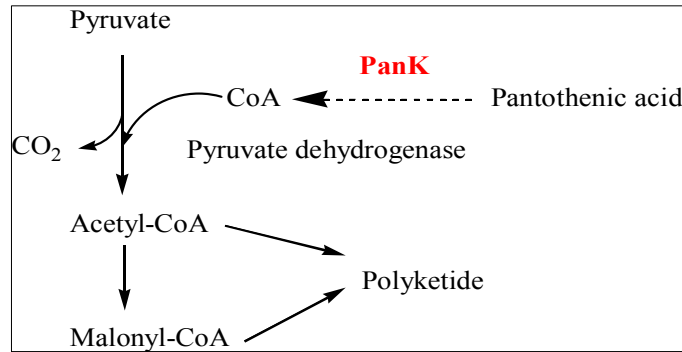


Fig. 7 PanK 과발현에 의한 생산성 향상 전략

라. SAM의 세포내 농도 증가 전략

- S-adenosylmethionine (SAM)은 세포내에서 일반적으로 methyl group donor로 작용하며, herboxidiene 생합성 과정 중에도 methyl group을 전구체로서 공급하는 역할을 함 (Fig. 8)

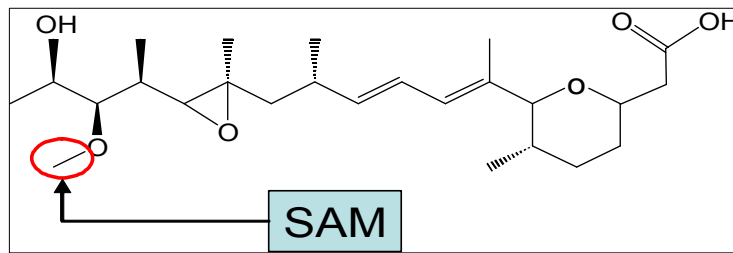


Fig. 8 Herboxidiene 생합성 전구체로서의 SAM의 역할

- 또한 SAM은 methyl donor로서의 역할 외에도, 현재까지 알려지지 않은 기전을 통해 방선균의 이차대사산물의 생산을 향상시키는 신호전달물질로서의 역할을 하는 것으로 보고 되고 있음. 실제로 *S. coelicolor*의 배양 시 SAM을 배지에 첨가하거나, SAM synthetase인 *metK* 유전자를 과발현하면 *S. coelicolor*의 주요 대사산물인 actinorhodin의 생산이 증가하는 것으로 보고 되고 있다 [*J. Bacteriol.* 2003, 185, 601-609].
- 따라서 본 연구에서도 방선균 유래의 SAM synthetase인 *metK* 유전자를 생합성 유전자집단과 함께 과발현함으로써 herboxidiene의 생산성을 향상시킬 계획이다.

마. 조절 및 내성유전자를 통한 생산성 향상 전략

- 방선균내 존재하는 global 조절유전자 및 경로 특이적(pathway-specific) 조절유전자를 이용하여 생산성 향상을 유도하고자 함 (Fig. 9). 이중 방선균에서도 작동하는 global 조절유전자를 선별하고, PCR을 이용하여 개발된 최적의 발현제어 시스템 내로 global 조절유전자를 클로닝함으로써, 고생산성 형질전환체를 제작하고자 한다.

- 또한 herboxidiene 생산균주인 *S. chromofuscus* A7847의 자체 global 조절유전자를 클로닝하고 이를 과발현하여 생산성을 향상시키고자 한다.
- herboxidiene 생합성 유전자집단 내의 경로 특이적 조절유전자 또는 내성유전자를 선별하여 이들을 이용하여 자연생산균주의 과발현하여 생산성을 향상시키고자 한다.

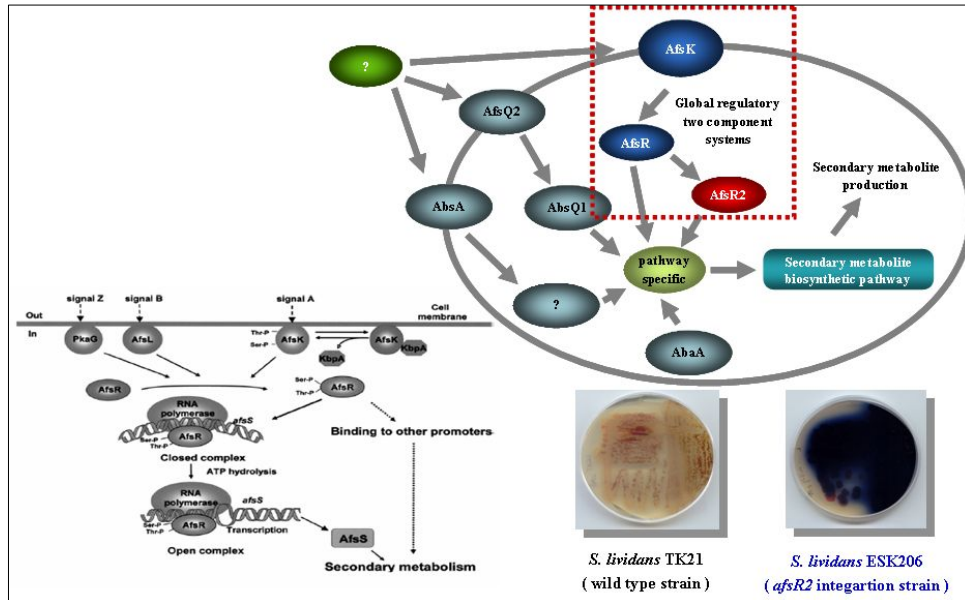


Fig. 9 방선균 조절유전자의 작용기작 및 이를 이용한 항생제 생산성 향상의 예

3. 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 유도체생산을 통한 신규 미생물제조제의 개발

가. 당화반응에 의한 Herboxidiene glycoside 유도체 합성

Herboxidiene은 제조제로 현재 field test 중에 있으며, 제조제 외에 anticancer 및 anticardiovascular 생물학적 활성을 가지고 있는 여러 연구팀이 관심을 가지고 있다. 현재 herboxidiene이 in vitro 및 in vivo 방법에 의해 glycosylation을 하여 신규 herboxidiene을 합성한다.

in vitro 방법으로는 현재 유연한 당화효소인 YjiC 효소 및 여러 확보된 당화효소를 이용하여 UDP-glucose 및 여러 가지 NDP-sugar와 반응하여 glycosylation 여부를 확인한다.

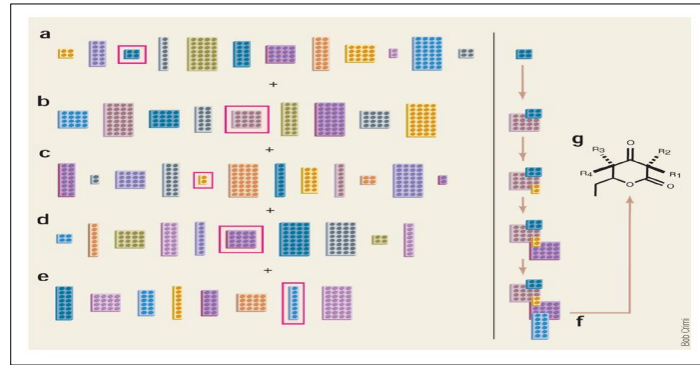
in vivo 방법으로는 in vitro 에서 당화반응이 확인된 효소를 방선균 발현벡터와 관련된 당합성 효소를 재조합하여 in vitro 에서 생산할 수 있도록 한다.

나. 조합생합성법을 통한 유도체 합성

(1) 벡터 시스템의 개발

조합생합성법은 여러 가지 천연 생리활성물질의 생합성경로 중 각 단계에 관여하는 생합성 유전자들을 조합 (제거, 치환, 조합, 이중숙주발현 등)하여 발현함으로써 목적하는 분자구조를 생합성 및 재구성 할 수 있는 기술임. 조합생합성법은 천연 생리활성물질의 대량 생산 및 신규 유도체 생성에 매우 효과적인 기술로, 화학적 합성법 또는 자연에서의 추출법 등으로 대량생산이 어려운 천연물 유래 생리활성물질의 대량생산을 가능

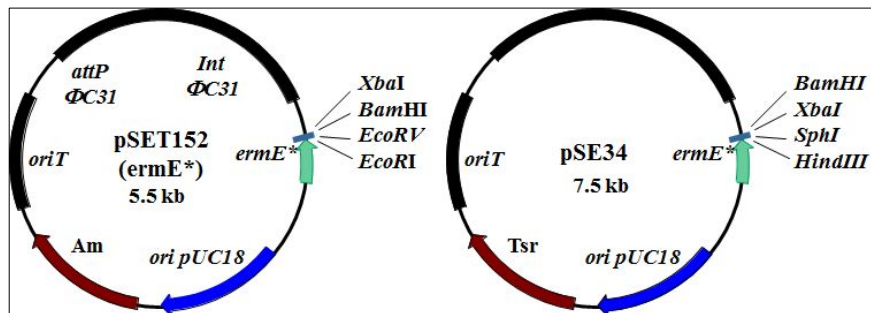
하게 하는 유일한 해결책이며, 화학적 합성법으로 구조 변형이 어려운 복잡한 구조의 천연화합물의 다양한 유도체 생성을 가능하게 한다.



조합생합성의 개념도

(2) 조합생합성에 의한 신규 유도체 생성을 위하여 안정적으로 효소의 삽입을 위한 조합생합성용 vector system을 개발.

Integration vector로서 *Streptomyces* chromosome의 phage-attachment site인 *attB* site에 선택적으로 integration하는 pSET152 벡터를 골격으로 강력한 promoter인 *Perme**를 클로닝하여 pSET152 (*ermE**)를 제작하였으며, high copy plasmid vector인 pSE34 벡터를 골격으로 강력한 promoter인 *Perme**를 클로닝하여 pSE34 (*ermE**)를 제작하였음.



조합생합성용 vector의 제작

4. 작물별 허복시디엔 제조 활성 검증

가. 활성 검증에 사용된 국내 주요 작물

미국 몬산토(Monsanto)에서는 *Streptomyces chromofuscus* A7847균에서 분리한 허복시디엔의 제조제 특성을 노지환경에서 확인하여 보고하였다 (Wideman et al., 1992). 초기 노지실험에서 허복시디엔은 밀에는 전혀 영향을 미치지 않으면서도 몇 종류의 잡초에 대한 post-emergence inhibition 효과를 보였다. 그러나 이들의 실험은 국내에서 많이 재배되지 않는 밀(wheat)을 위주로 하였으며, 국내에서 피해를 입히는 토착 잡초들과 주요 발작물들에 대한 자료는 보고되지 않았다. 본 과제에서 이루고자 하는 허복시디

엔의 대량생산을 위한 최적화 연구 이전에 소규모 생물검증으로 제초제 활성을 정량화하고 국내 농업환경에 적합한 실용화 정보 축적이 선결되어야하므로 제 2협동과제에서는 제1세부과제에서 분리한 *S. chromofuscus* 균의 허복시디엔을 표준물질로 이용하여 이 물질의 활성농도(MIC, minimum inhibition concentration)와 실용화 과정에서 필요한 농업특성을 분석하였다.

농업특성 분석을 위하여 국내에서 실제로 농민들에 의해 많이 재배되는 작물 종자를 이용하여 활성을 검증하였고, 잡초는 국내 토양에서 농업 생산량 감소를 일으키는 주요 잡초들을 선별하여 허복시디엔의 제초제 특성을 확인하는데 이용하였다. 사용한 작물은 벼(Rice, 동진벼), 밀(Wheat, 밀양밀), 배추(Chinese cabbage, 서울배추, 아시아종묘), 고추(Pepper, 부강고추, 흥농종묘), 무(Radish, 토광무, 송백무, 한농), 파(Shallot / Scallion, 흑대파, 동원농산종묘; 흑금장, 대성종묘; 장열파(일본제), 해성종묘; 신희파, 해성종묘; 석창외대파, 농우씨앗; 금장의대파, 농우씨앗; 전주황, 동부팜한농; 천주대고, 농우), 마늘(Garlic, 의성마늘 종구) 등의 종묘를 이용하였다. 각 작물들의 성장 속도와 최적 환경이 서로 상이하므로 온실에서 파종시기를 달리하여 중간 정도 성숙한 유묘를 최소 50모씩 허복시디엔으로 잎과 줄기에 공히 처리하였다.

국내에는 총 750여종의 잡초가 알려져 있다. 논 토양 76종, 밭 토양 112종, 과수원 233종, 목초지 329종 등이 그러하다. 이 가운데 중복된 종을 제외하면 433종의 잡초가 국내 작물 생산량에 실제적인 영향을 미치는 것으로 분석된다. 본 연구과제에서는 이 중 번식속도가 빨라 농경지를 우점하는 잡초로 알려진 벼과(또는 화분과)에 속하는 돌피 (*Echinochloa crusgalli*), 바랭이 (*Digitaria sanguinalis*), 수수 (*Sorghum bicolor*)를 그리고 가지과의 까마중 (*Solanum nigrum*), 콩과에 속하는 자귀풀 (*Aeschynomene indica*), 삼과에 속하는 어저귀 (*Abutilon avicennae*), 도꼬마리 (*Xanthium strumarium*), 십자화과에 속하는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)등 총 8종에 대한 허복시디엔 제초활성을 검증하였다. 식물 분자생물학의 모델 식물로 이용되는 애기장대를 제외한 7종은 국내 작물 생산량을 감소시키는 주된 잡초로 알려져 있다 (농촌진흥청, 2005).

나. 천연제초제 허복시디엔과 작물 기내(in vitro) 배양

방선균에서 분리한 허복시디엔(분자량 438)은 선문대학교에서 Preparative HPLC를 통해 분리하였으며 유기용매를 lyophilize로 제거한 뒤, 이를 알칼리 멸균수 (~pH9.0)에 녹여서 사용하였다. 최종 희석 농도는 500~4,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 범위로 사용하였다 (Fig. 10).



Fig 10. 허복시디엔의 화학적 구조와 에스테르 결합 위치

애기장대(*Arabidopsis thaliana* col-0), 벼(rice, 동진벼)와 밀(wheat)의 종자는 국립농업과학원 농업생명자원부에서 확보하였고, 국내에서 생산량 감소를 일으키는 주요 토착 잡초 종자는 국립농업과학원 농업생물부에서 구하였다. 각 종자들은 사용 전 16 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고 80% 에탄올을 사용하여 5차례 세정하여 곰팡이와 잡균들을 제거하였다. 기내배양을 위하여 마젠타 병에 준비한 4.43 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 비율로 비타민을 포

함한 식물 성장용 Murashige & Skoog Basal Medium (MS with vitamins) 배지에 멸균한 종자를 치상하였다. 종자 발아 억제 효과를 확인하기 위하여 서로 다른 농도의 허복시디엔이 포함된 고체 및 액체 식물 MS 배지를 이용하여 발아 시험을 하였다.

다. 천연제초제 허복시디엔 혼입 전착제

국내에서 사용되는 농약용 전착제와 천연 허복시디엔의 상호반응을 알기위해 시중 농약상에서 전착제 4종을 혼용하여 허복시디엔 활성을 검증하였다. 사용한 혼입 전착제와 그의 유효 성분은 Table 2 와 같다. 전착제와 허복시디엔 희석은 20리터당 10~20mL 비율로 제조회사의 규격을 따랐다.

Table 2. 허복시디엔에 혼입한 전착제와 유효 성분표

| 전착제 품명 | 유효성분 |
|---------|---|
| 동부카바 액제 | Alkylaryl polyethoxylate, Alkylsulfonated alkylate sodium salt (60%), Solvent (40%) |
| 동방전착 액제 | Polyoxy ethylene alkyl arylether(10%), Sodiumligno sulfonate(20%), 부동액, 용제 (70%) |
| 실루엣 액제 | Siloxane (30%), 보조제, 용제, 증량제 (70%) |
| 케어스 유탁제 | Paraffin (24%), 계면활성제, 증량제 (76%) |

종자의 발아는 식물 배양 배지에 허복시디엔을 혼합한 경우와 허복시디엔에 직접 접촉한 경우로 나누어 종자 발아율을 측정하였다. 직경 55mm 여과지(Whatman No. 2)를 깎아 유리 Petri dish에 시료를 아세톤으로 용해시켜 2000, 1000, 500, 250 및 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도가 되도록 희석하여 1ml씩 처리하여 Fume hood에서 아세톤을 완전히 건조시킨 후, 증류수를 1ml씩을 넣고 애기장대 종자 20립씩을 치상하여 파라필름을 이용하여 밀봉한 후 25 $^{\circ}\text{C}$ (14h/10h, Light/Dark) 생육 상에서 7일 후에 발아율과 성장율을 조사하였다.

라. 허복시디엔 작물 온실 처리

허복시디엔 처리를 위한 잡초 및 작물은 항온실 배양을 통하여 확보하였다. 350cm² 사각 플라스틱 포트에 원예용상토(부농산업사)를 충진한 후, 바랭이를 포함한 3종의 화본과 잡초와 어저귀를 포함한 4종의 광엽잡초 등 7종의 잡초를 파종하여 온실조건(30/20 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$, Light /Dark=14/10h)에서 9일 동안 생육시켰다. 아세톤(1ml)을 이용하여 허복시디엔을 용해시킨 후, 다시 약제 조제액(Acetone 60%, 0.1% Tween-20) 13ml을 첨가하여 최종 처리농도가 4000, 2000, 1000, 500, 250 및 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 농도가 되도록 희석 조제하여 laboratory spray gun을 이용하여 입면과 줄기에 충분히 살포 되도록 분무 처리하였다. 처리한 포트는 hume hood에서 약액을 완전히 건조시킨 후 동일한 온실조건에서 관리하면서 처리 4일 및 7일 후에 외형적인 증상 및 약효를 '약해 기준표 (효과없음; 0, 완전방제; 100)에 의해 달관 조사하였다.

5. 허복시디엔 유도체 제작을 위한 토착 메타게놈 유전자 확보

가. 미생물 메타게놈 시료

천연 미생물 제조제 허복시디엔의 화학 구조에 esterification 위치가 존재하므로 이 부위에 대한 ester group이 변환된 유도체 형성을 위한 특이활성 에스테라아제 확보를 독도 심해 미생물 메타게놈에서 선별하였다. 독도 심해 퇴적토는 해양연구원이 2009년 5월동안 울릉도와 독도 사이의 심해바닥 2,008m(St12-2; GPS 36°39.2', 130°36.9')와 2,038m(St21; GPS 36°37.2', 130°42.5')에서 채취한 해저 표면에서 약 4~7m 깊이의 퇴적토 시료 2곳을 분양 받아 이용하였다. 시료 St12-2는 메탄하이드레이트가 포함된 시료였으며, St21은 메탄하이드레이트가 포함되지 않은 심해 퇴적토였다. 퇴적 토양은 -70°C에 frozen 상태로 보관하여 필요한 경우 질편(~15g)을 녹여 메타게놈 분리에 이용하였다(Fig. 11).

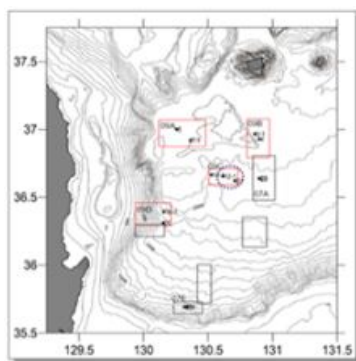


Fig. 11. 동해 독도 심해퇴적토의 시료를 채취한 지역을 나타내는 심해지도

나. 미생물 메타게놈 분리 및 유전자은행 제작

메타게놈 분리의 효율을 높이기 위하여, 녹은 퇴적토 질편은 phosphate buffer와 bead 가 포함된 상태에서 lysozyme을 10mg 넣고 37°C에서 30분간 처리한 후, vortex mixer에서 20분간 진탕처리하고 이후 PowerMax Soil DNA isolation kit (MOBIO, CA)에서 제공하는 방식을 따라 전체 DNA를 분리하였다. 메타게놈 DNA는 CHEF(Clamped Heterogeneous Electric Field)을 사용하여 15kb 이상의 고분자 DNA로 전개하고 (2sec→20sec ramp, 6V/cm, 120°, 0.5XTBE buffer, 14°C), 퇴적토에 많이 포함된 polyphenol 계 오염 물질을 제거하기 위하여 전기영동에 사용된 gel은 2% polyvinylpyrrolidone을 포함한 gel-patch 방식을 이용하였다. Ethidium bromide로 gel을 염색한 뒤, 약 15~45kb 구간의 DNA band를 절취하여 dialysis tube (10kDa cutoff, Spectraphore)에 넣은 후 60V하의 동일 0.5XTBE buffer에서 2시간 전기영동하여 gel에 포함된 메타게놈 DNA를 electroelution 하였다.

정제된 메타게놈 DNA는 End-repair 반응(End-It Kit, Epicentre, USA)으로 끝부위를 평활시키고 이를 fosmid vector pCC1-Epi 벡터에 상온에서 2시간 동안 ligation (FastLink Ligation system, Epicentre) 시켰다. Ligation 산물을 Phage λ package extract를 사용하여 package 과정을 수행하였고, 만들어진 phage들은 대장균 *E. coli* Epi300 숙주에 감염시켜 대장균 내에서 cloning 복제가 정상적으로 이루어지는 클론들만을 chloramphenicol (20μg/ml 농도) 배지에서 선별하여 유전자 은행 제작을 완성하였다. 대장균에 클로닝 된 유전자 형태로 구축한 해양 심토 메타게놈 유전자은행은 LB-Chloramphenicol-glycerol 배지를 기본배지로 하여 384-well plate에 개별 클론으로 접종하여 총 42,000여 클론(평균 insert 크기 ~35kb)의 심해토양 메타게놈 유전자은행을 작성하여 -70°C에 장기 보존하였다.

다. 메타게놈 유전자은행에서 에스테라아제(Esterase) 스크리닝 및 클로닝

허복시디엔 유도체를 생성하기 위한 메타게놈 유래 신규 Esterase는 tributyrin (1%)를 포함한 LB plate

에 각각의 메타게놈 클론들을 5일간 (28°C) 배양하면서 clear zone이 형성되는 것을 바탕으로 기능별로 스크리닝 하였다. Esterase 기능을 가진 fosmid에 포함된 insert를 대상으로 기능을 가진 ORF만을 분리하기 위하여 Insert DNA를 포함한 전체 fosmid를 고압의 힘을 가하여(HydroShear) 평균 크기가 3.5kb 이하의 단편으로 변경하고, 잘려진 단편들은 T4 DNA polymerase, Polynucleotide kinase를 사용하여 end-filling 하였다. 처리된 이들 단편을 pZero vector(Invitrogen)에 blunt-end ligation 하고 electroporation을 통하여 대장균 DH5α에 도입하여 2차 스크리닝용 shot-gun 라이브러리를 구성하였다. 이후 LB/Kan/Tributyryn 배지에서 양성을 보인 shotgun 클론들에서 pUC-universal primer와 BigDye system을 사용하여 contig 염기서열을 분석하고, DNASTar(LaserGene), VectorNTI(Invitrogen)와 Mega5 프로그램을 통하여 염기서열을 분석하고 Multiple sequence alignment를 수행하였다.

선발된 신규성이 높은 esterase 기능을 검증하기 위하여 메타게놈에서 분리한 유전자 ORF를 대상으로 단백질 발현을 시도함. 각각의 ORF PCR primer를 제작하였고, HighPrime Taq polymerase (Takara, Japan)로 증폭된 산물은 reading-frame에 따라 대장균 발현 벡터 pET21a/b/c 에 directional in-fusion 함 (In-Fusion cloning kit, Clone Tech, USA). Junction 부위의 염기서열을 확인염기서열이 정확한 것을 확인한 후, plasmid를 대장균 BL21(DE3)에서 단백질을 과다 발현 시킴 (20°C, 0.5mM IPTG, 12hr). 발현된 단백질을 분리정제 하기 위하여 50mL 배양액을 원심분리를 통해 세포만을 수득하였고, 이를 10mL lysis buffer (50mM NaH₂PO₄ (pH8.0), 300mM NaCl, 10mM Imidazole)에 재현탁한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄함. 파쇄한 세포를 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 수득하여, 조효소액으로 이용함. 조효소액에서 6xHis-Tag 가진 발현 단백질을 Ni-NTA resin (Qiagen U.S.A)로 분리함 (washing buffer; 50mM NaH₂PO₄ (pH8.0), 300mM NaCl, 20mM Imidazole, Elution buffer; 50mM NaH₂PO₄ (pH8.0), 300mM NaCl, 250mM Imidazole)). YM10 membrane (Amicon Ultra, Millipore Co.)을 이용한 한회여과를 통하여 발현 단백질을 농축하였다.

라. 신규 에스테라아제의 생화학적 및 동역학적 특성분석

Native PAGE gel (12% Resolving gel, 4% Stacking gel)에서 분리한 단백질을 boiling 하지 않고 12μg 을 각 2개의 같은 batch PAGE gel에 electrophoresis하여, 하나의 gel은 coomassie brilliant blue로 staining 하여 발현 단백질의 band를 확인하고 나머지 하나의 gel은 20% isopropanol 에 20min, Distilled water에 10분씩 2반복하여 wash하였다. 이 gel을 1.3% agar media (1.3% agar media, 1% tributyrin, 25mM Tris-HCl(pH8.0) 10mM CaCl₂, 0.1% tween80)에 올려놓고 마르지 않도록 sealing한후 상온에 보관. 약 4시간 후에 clear zone을 확인하였다. 에스테라아제 기능은 *p*-Nitrophenyl butyrate(pNPC4) 또는 *p*-Nitrophenyl decanoate(pNPC10)을 기질로 사용하여 유리되는 *p*-Nitrophenyl의 양을 측정하였다. pNPC4 기질(0.1mM)과 순수 정제된 에스테라아제(0.12μg)를 Tris 완충액(50mM, Tris·Cl pH8.5, 반응액 400μl)하에서 30°C, 3min. 동안 반응시킨 후, 2M acetone 200μl으로 65°C에서 반응을 중단시키고 OD_{405nm}에서 흡광도를 측정하였다. 온도변화에 따른 활성변화는 보통의 경우 pNPC4 (0.1mM)를 기질로 사용하였고, pH 변화에 따른 활성변화 측정 시 pNPC4의 alkaline autohydrolysis 때문에 pNPC10 (0.1mM)를 대신 반응 기질로 이용하였다. 효소 동역학적(kinetics) 파라미터(parameter) 측정은 10분간 30°C에서 pre-incubation 시킨 96-well plate의 각 well에 효소(0.12μg)와 다양한 농도의 기질을 최종 200μl가 되게 (최종 완충용액 농도는 50mM TrisCl (pH8.5)) 섞은 다음 35°C, 1min. 단위로 405nm 흡광도를 조사함 (Victor3, Perkin Elmer, USA). 사용한 기질 농도는 0~5mM 범위로 함. pNP 표준물질은

사용하여 위 조건에서 Molar Extinction Coefficient를 측정함 ($\epsilon=17,456 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). 동역학적 파라미터 k_{cat} , K_m 은 pNP 생산 속도(V_0)를 plotting한 Michaelis-Menten equation의 Hanes-Woolf data fitting (Hanes, 1932)을 통하여 구하였다.

제 2 절 연구 결과

1. *Strpetomyces chromofurus* A7847 균주의 지놈분석

가. Draft Sequencing

Roche 454 GS FLX을 이용하여 평균 길이 426.3bp의 282,912개 454 data를 얻을 수 있었으며 분석된 모든 염기의 수는 120,602,726bp 이다. 이는 예상되는 전장유전체 크기(~8Mb)를 기준으로 13.3x(genome coverage) 수준이다.

Roche 454 GS FLX로 분석된 draft data

| Data Type | Total Read | Total Base | Avg. | Cov. |
|-----------|------------|---------------|---------|-------|
| 454 Data | 282,912 | 120,602,726bp | 426.3bp | 13.2x |

나. Assemble

분석된 모든 454 data 를 GS Assembler로 어셈블을 수행한 결과 353개의 contig를 확인할 수 있었으며 contig 길이의 합은 총 9,142,143 bp 이었다.

GS assembler(Newbler)의 어셈블 결과

| | | | |
|-----------------------|--------------|---------------------|-------------|
| Sum of Contig Length | 9,142,143 bp | Max. of Contig Size | 175,929 bp |
| Number of Contig | 353 contigs | Min. of Contig Size | 105 bp |
| Avg. of Contig Length | 25,898.4 bp | bp of Quality > 40 | 8,898,806bp |
| N50 | 60,730 bp | % of Quality > 40 | 97.34 % |

다. NewGAS System 구축 완료

Draft Sequencing 분석결과 얻어진 353개 contig 서열에 대해 제노텍의 automatic annotation system (NewGAS)을 이용하여 유전자를 예측 및 분석하고 결과를 활용할 수 있는 환경을 구축하였다.

General Feature

| | |
|-----------------------|--------------|
| Project Name | Sch |
| TOTAL SIZE | 9,129,061 bp |
| G+C | 71.1 % |
| Protein Coding Region | 86% |
| Transfer RNAs | 70 |
| Ribosomal RNAs | 4 |

| Protein Coding Genes | |
|---|-------|
| ...Conserved with protein function assigned | 5,243 |
| ...Conserved with unknown protein function | 1,899 |
| ...Nonconserved | 1,359 |
| ...Total | 8,501 |

2. Herboxidiene의 생합성 유전자 집단 확보

가. Herboxidiene의 생산균주 genomic library 제작

- Herboxidiene의 생산균주인 *Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982 유전자 library를 만들기 위해 전체 지놈을 확보하였다.
- 확보된 genomic 유전자를 *Sau3A1* 효소에 부분적으로 40–50 Kb 크기가 가장 많은 상태로 최적화하여 cosmid vector인 SuperCos에 삽입하여 확보되었다.

나. Herboxidiene 생합성 유전자 집단 클론하기 위한 탐침 확보.

생합성 유전자는 herboxidiene 생합성 과정에 핵심 효소인 β -ketoacylsynthase 및 acyltransferase gene fragment를 목표 탐침으로 하고 각각의 유전자를 확보하기 위한 PCR primer의 제작과 각각의 primer로부터 탐침으로 사용될 PCR 결과물을 얻었음. 각각 탐침은 유전자 서열분석 결과 이미 잘 알려진 β -ketoacylsynthase 및 acyltransferase 유전자 서열과 60–80%의 일치율을 보여주고 있다.

1. Forward primer: KS-BF: TGC TCG TCC TCG CTG GTC GC
Reverse primer: KS-BR: GCG CCT CGA TCG GGT CGC CG

2. Forward primer: AT-BF: CGC AGG GCG AGA TCG CCG
Reverse primer AT-BR: GAG AAG AAC GGC ACG

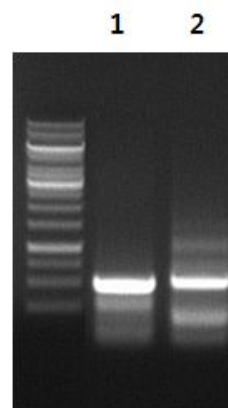


Fig. 12 PCR product obtained from KS-BF and KS-BR

다. Colony hybridization

- 확보된 두개의 탐침 β -ketoacylsynthase 및 acyltransferase 유전자를 이용하여 50여개의 colony를 확보하였고, 최종 12개의 cosmid를 선별하였다.

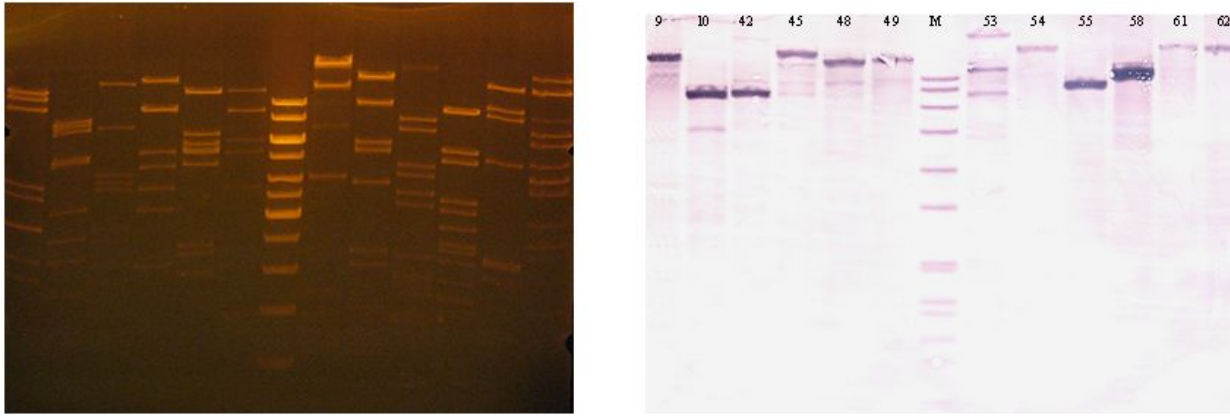


Fig. 13 Colony hybridization 결과 확보된 cosmid

- 그중에 pHER61 cosmid를 부분 분석 결과 herboxidiene과 유사할 것으로 추정되는 polyketide synthase (mmpV, mmpE), 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (mupB and mupG), Valyl-tRNA synthetase 등이 확인하였다.

라. 유전자 분석과 추정되는 생합성 과정

- Herboxidiene 의 생합성 유전자 확보

Herboxidiene 생합성 유전자를 확보하기 위해 생산 균주인 *Streptomyces chromofuscus*의 지놈을 부분 분석하여 Herboxidiene 생합성 유전자는 herA, herB, herC, herD, herE, herF 및 herG를 포함하여 총 180 kb의 유전자가 확보되었음. Herboxidiene 생합성의 각각 기능은 herA (regulatory gene), herBCD (polyketide synthase typeI), herE (epoxidase), herF(methyltransferase) 및 herG(P450)으로 분석되어지고 있으며, 일부 떨어져 있는 부분에 orf10 acetyltransferase, orf14 PKS typeIII 및 orf15 P450 등이 있다.



Fig. 14 Herboxidiene 생합성 유전자 지도

Table 3. Herboxidiene 생합성 유전자 기능 분석

| Gene | Funtions |
|------|--|
| orf4 | Possible nitrogen fixation protein |
| orf5 | Nife Hydrogenase i large subunit |
| orf6 | Nife Hydrogenase i small subunit |
| orf7 | Hydrogenase nickel incorporation protein |
| orf8 | Oxidoreductase domain protein |
| orf9 | Xylose isomerase domain-containing protein |

| | |
|-------|---|
| herA | Transcriptional regulator, LacI family protein |
| herB | Polyketide synthase typeI |
| herC | Polyketide synthase typeI |
| herD | Polyketide synthase typeI |
| herE | Epoxidase |
| herF | Methyltransferase |
| herG | Cytochrome P450 hydroxylase |
| orf10 | Putative acetyltransferase |
| orf11 | hypothetical protein |
| orf12 | abhydrolase |
| orf13 | hypothetical protein |
| orf14 | Type-III PKS |
| orf15 | Cytochrome P450 |
| orf16 | Glycine betaine ABC transport system permease protein |
| orf17 | Putative ABC transporter permease |
| orf18 | Putative esterase |
| orf19 | Glycine betaine/L-proline ABC transporter, ATPase subunit |
| orf20 | Proline aminopeptidase |

- 예상되는 herboxidiene의 생합성 과정

Herboxidiene은 총 9개의 module에 의해 합성되며, 대부분의 macrolide 형태로 합성되지만 herboxidiene은 hexagonal로 합성되며, opoxidation과 hydroxylation 및 methylation에 의해 최종 산물인 heboxidiene이 합성된다.

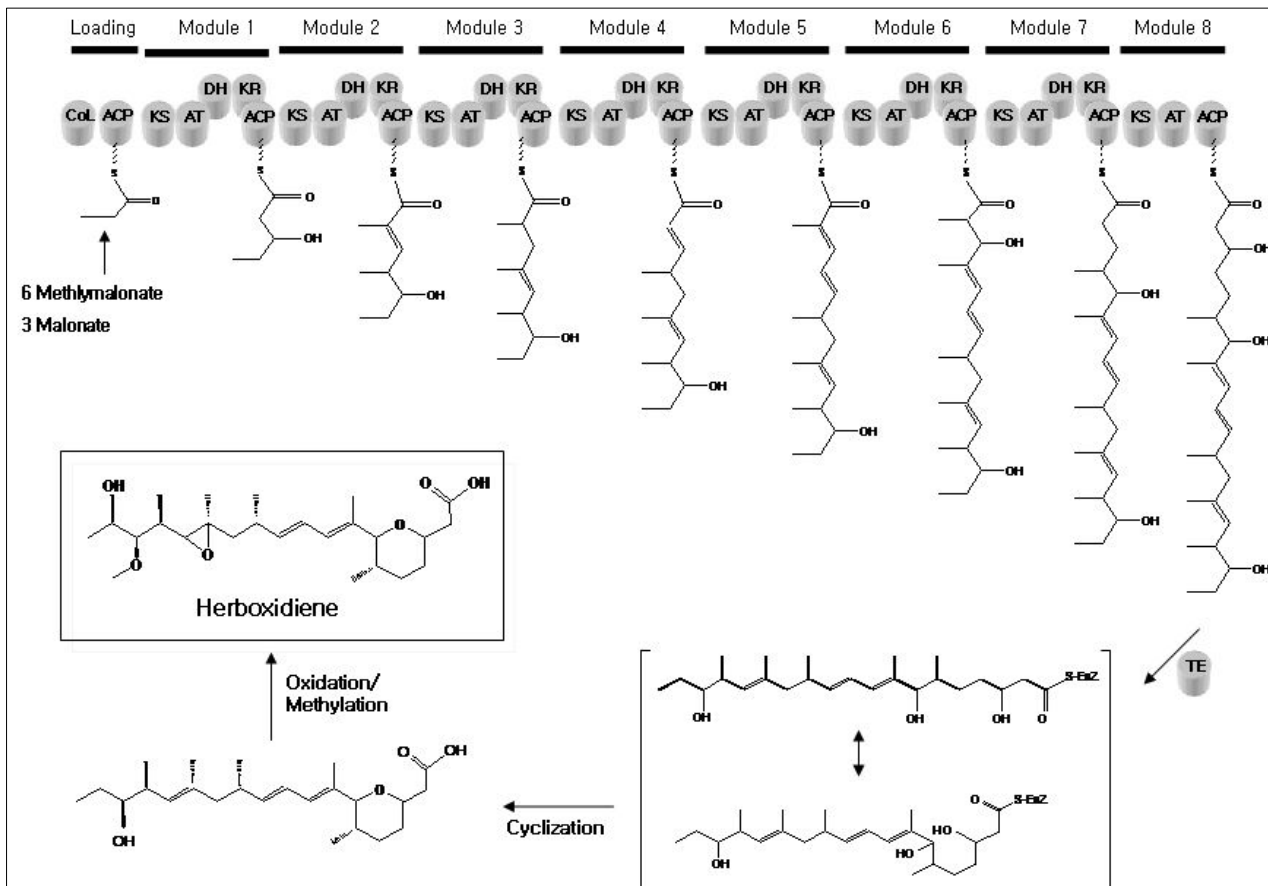


Fig. 15 Herboxidiene의 예상 생합성 유전자집단 및 생합성 경로

3. Herboxidiene 추출과 분석방법의 정립

가. HPLC 및 MS 분석을 위한 시료의 전처리 방법 확립

(1) Herboxidiene의 유도체 개발 후, 이를 분석하기 위해서는 herboxidiene의 시료 추출방법의 최적화가 필요하였음. 이에 본 연구실에서 현재 다른 폴리케타이드 화합물에 대하여 확보하고 있는 추출방법과 시료의 전처리 방법을 herboxidiene에 도입하고 최적화하여 시료의 추출방법을 확립하였음.

(2) 현재의 herboxidiene의 추출방법은 herboxidiene의 야생생산균주인 *S. chromofuscus* A7847을 진탕배양한 배양액에 유기용매인 ethylacetate 또는 butanol을 혼합한 이후, 유기용매만을 추출하는 방법을 사용하고 있었음. 그러나, 이러한 추출방법으로는 HPLC 분석에서 시료의 불순물로 인한 오염이 많아 새로운 유도체에 의한 peak분석 및 MS 분석에 어려움이 있어 신규유도체의 분석에 어려움이 있었음 (Fig. 16).

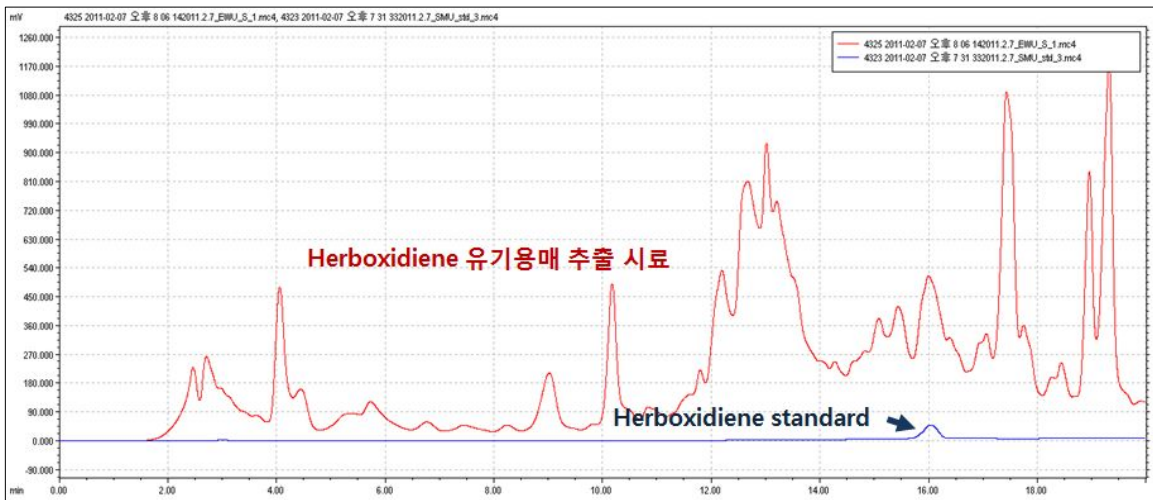


Fig. 19 유기용매로 추출한 herboxidiene 시료의 HPLC 크로마토그램

(3) 따라서, 본 연구실에서는 이미 다른 폴리케타이드 화합물의 전처리에 사용하고 있는 solid phase extraction (SPE) 전처리 기술 (Fig. 18)을 이용하여 시료의 불순물을 제거하고 신규유도체의 분석을 진행하고자 하였음. SPE 기술은 유기용매를 이용하여 이미 추출한 추출물을 카트리지를 통과시켜 표적물질 이외의 불순물을 제거하여 분석에 용이함을 주기위한 기술로 Fig. 18와 같은 단계를 거쳐서 수행됨.

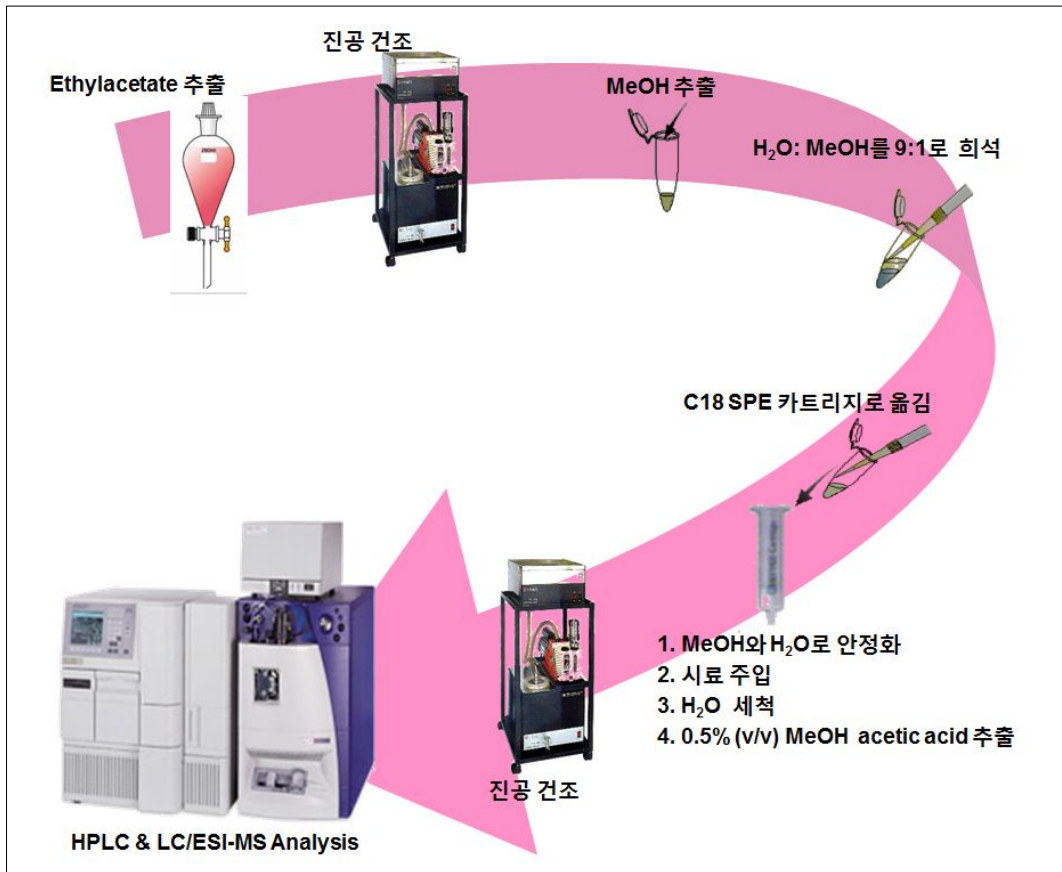


Fig. 20 SPE를 이용한 herboxidiene 시료의 전처리 과정의 확립방법

(4) herboxidiene의 SPE 전처리는 다음과 같은 순서로 진행하였음. 카트리지를 안정화시키기 위하여 3ml의 100% 메탄올과 3ml의 100% 물을 통과시킨 후, herboxidiene 유기용매 추출 시료를 주입하고, 3ml의 100% 물로 불순물이 씻겨 나갈 수 있도록 통과시킨 후, 최종적으로 5% Methanolic acetic acid (MeOH + 0.5% acetic acid)를 이용하여 시료를 녹였음. 이때 C18 카트리지 (Agilent Technologies)를 사용하였다.

나. HPLC 및 LC-MS 분석방법의 정립

(1) 시료의 전처리 후, 그림 17과 같은 HPLC 크로마토그램을 얻었다. 이는 SPE 전처리 과정을 거치기 전인 그림 1과 비교했을 때, 유기용매 추출로 인한 불순물이 대부분 제거된 것을 보여주는 결과임. 이에 따라서 HPLC 분석을 통하여 herboxidiene 유도체의 분석을 가능하게 할 시료의 전처리 과정을 확립하였다.

(2) HPLC 분석으로는 herboxidiene의 신규 유도체 분석에 어려움이 있을 가능성이 있으므로, LC-ESI/MS 분석을 통하여 herboxidiene과 신규유도체의 분자량 및 fragmentation 패턴을 통하여 신규 유도체의 생성여부 및 구조를 예측하고자 하여 LC-ESI/MS 분석 방법을 확립하였다.

(3) *S. chromofuscus* A7847로부터 확보한 herboxidiene을 LC-ESI/MS를 이용하여 분석하였다 (Fig. 19). herboxidiene의 분자량 M/Z 455.85를 이용하여 분석하였으며, retention time 30분에 herboxidiene이 검출되는 것을 확인하였다 (Fig. 20).

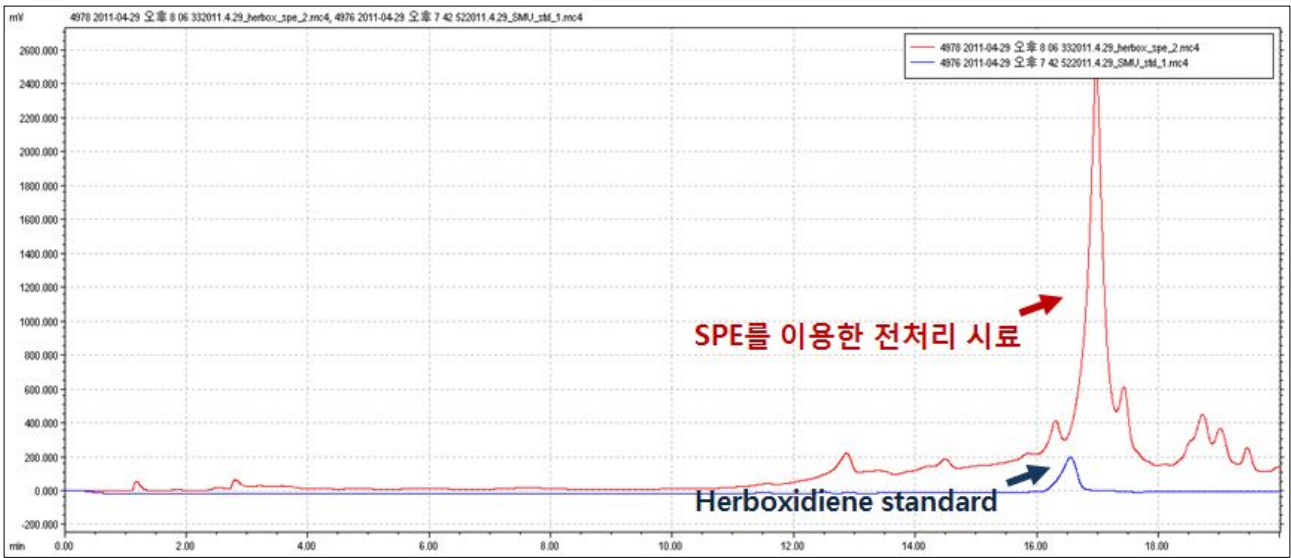


Fig. 21 SPE를 이용하여 시료의 불순물을 제거한 HPLC 크로마토그램

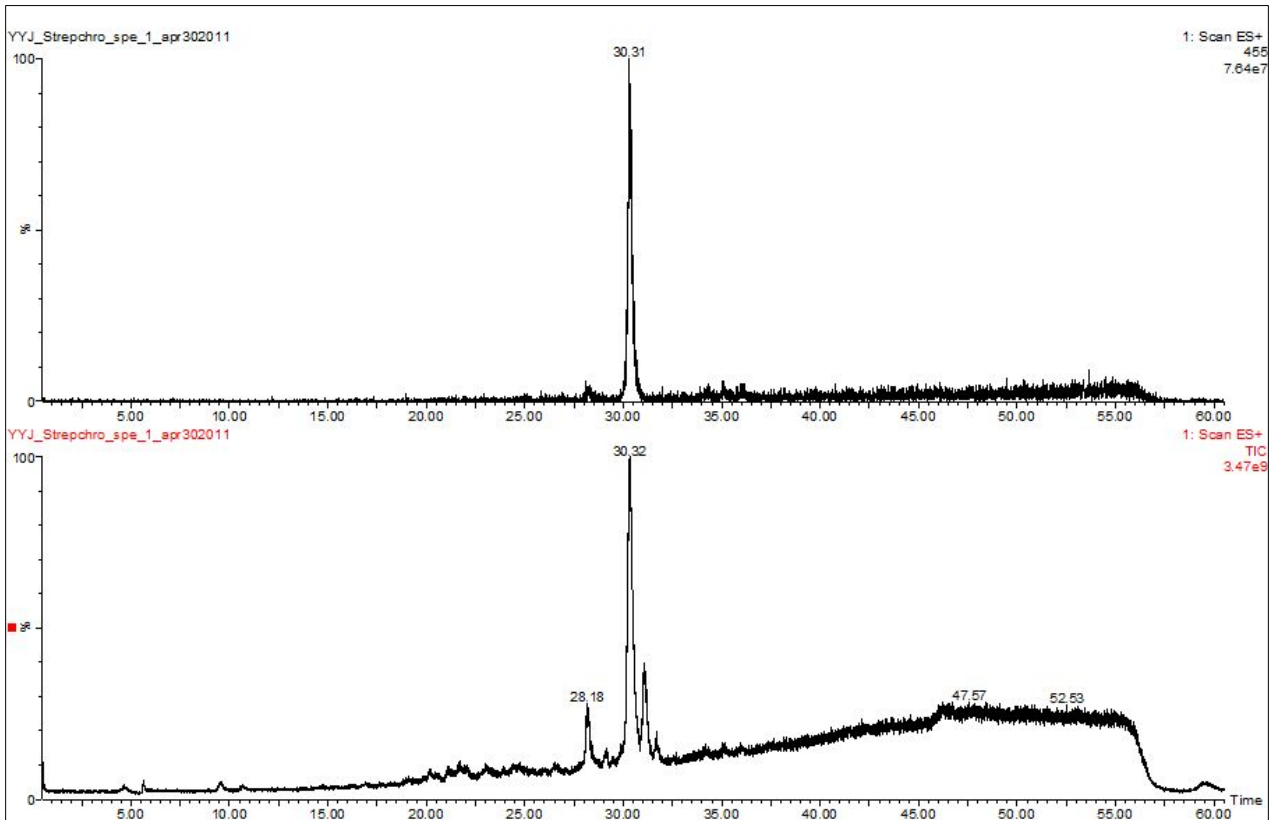


Fig. 22 Herboxidiene의 LC-ESI/MS 분석 크로마토그램

(4) 신규 유도체로 예상되는 물질의 자세한 구조 분석을 위하여 herboxidiene의 Iontrap-MS/MS 분석을 수

행하였음. Ammonium adduct에 해당하는 (m/z 값: 417.42, 399.42, 331.08, 299.25) fragmentation pattern을 확인하였다 (Fig. 21). 신규 유도체의 확인은 m/z 값의 변화를 통하여 확인이 가능할 것으로 사료된다.

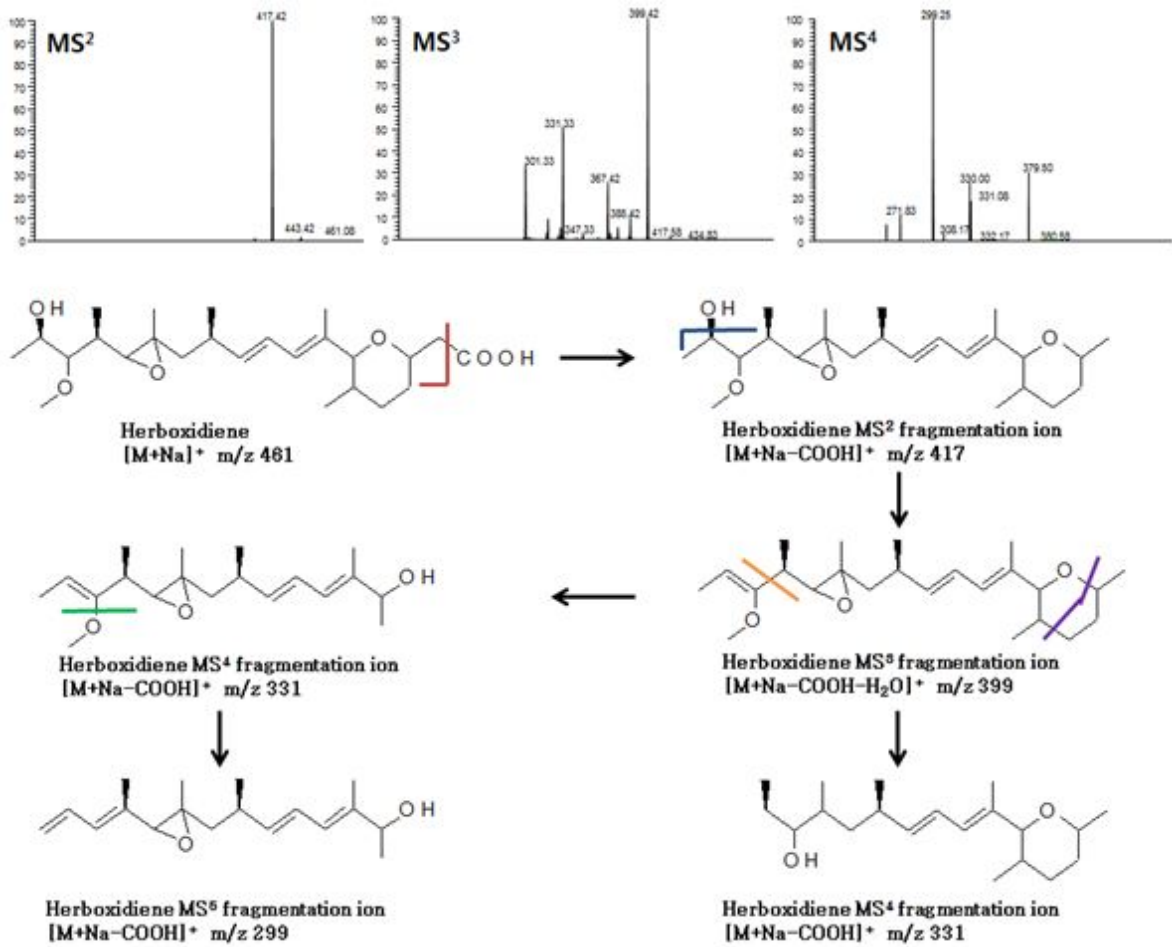


Fig. 23 허복시디엔의 Iontrap-MS/MS 분석

4. 친환경 미생물체초제 herboxidiene의 배지 조성에 의한 생산성 증가

가. *Strpetomyces chromofurus* A7847 균주의 배양과 herboxidiene의 분리

- ATCC에서 분양받은 *Strpetomyces chromofurus* A7847 균주는 polyketide 계열의 체초제인 herboxidiene을 생산하는 균주이다.
- 아래 그림은 3일 및 7일째 고형배지에서 *Strpetomyces* sp A7847 균주의 morphology이며 *Strpetomyces* sp A7847 균주에서 추출된 herboxidiene은 Fig. 22 분리조건에 의해 HPLC에 의해 분석할 수 있다.

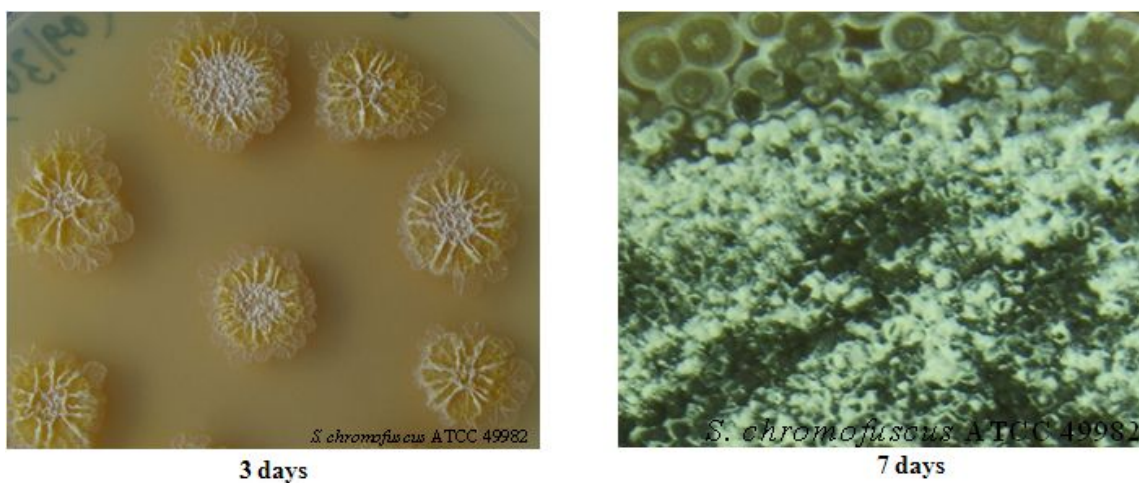


Fig. 22 Morphology of *Streptomyces chromofuscus* A7847 on ISP2 plate after 3 and 7 days.

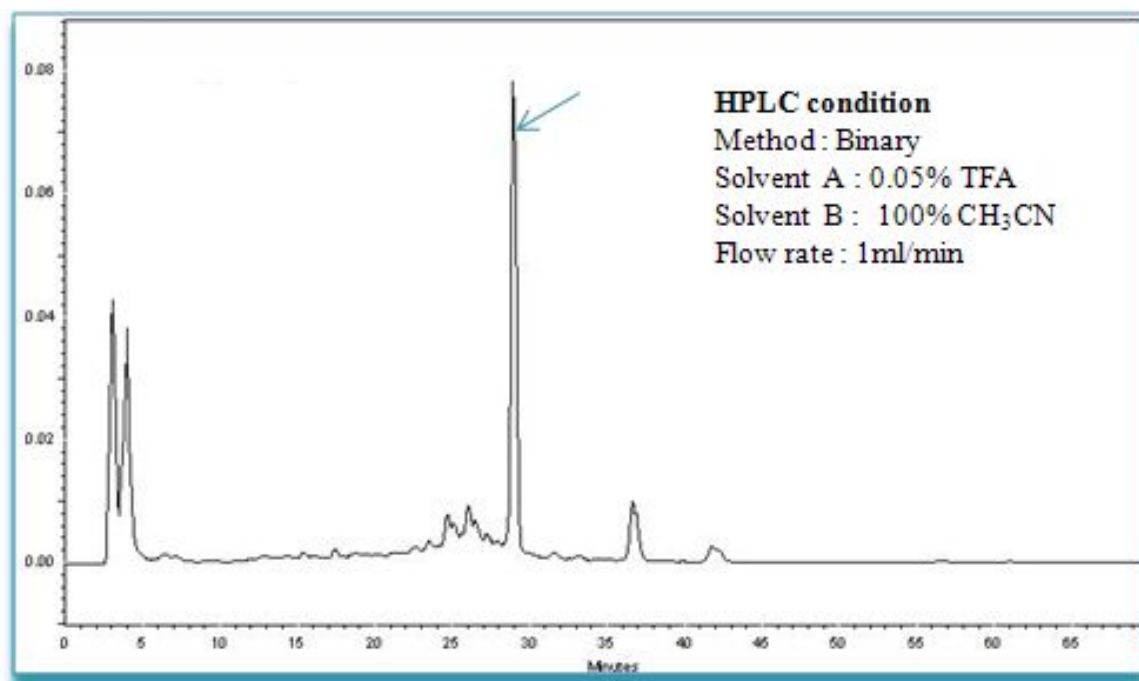


Fig. 23 Typical HPLC traces of herboxidiene produced by *S. chromofuscus*. The peak corresponding to herboxidiene is indicated by an arrow.

나. 배지 최적화에 의한 herboxidiene 생산성 증가

(1) Seed 균주 배양

Strpetomyces chromofurus A7847 균주는 일반적으로 seed 배양을 위해 500 mL baffled flask에 ISP2 (yeast extract 0.4%, malt extract 1%, glucose 0.4%) 50 mL을 shaking 배양기에 pH 7.2, 235 rpm으로 28°C에 36시간을 배양한다.

(2) Herbodiene 생산을 위한 배양

Seed 균주를 4%씩 4개의 다른 carbon source (Corn starch, maltose, glycerol 및 sucrose)에 배양하여 생산성을 비교하였다.

배양은 500 mL baffled flask에 50 mL의 각기 배지에 shaking 배양기에 pH 7.2, 235 rpm으로 28°C에 5일을 배양한다.

Herboxidiene의 생산성은 Table 4 배지결과 carbon source에 따라 27.6–582.5 mg/L이 생산되며 glycerol이 가장 생산성이 높다 (Fig. 24).

Table 4. Carbon source의 최적화에 의한 herboxidiene 생산

| Media Number | Carbon sources 3.5% | Nitrogen source 0.8% | MINERALS (%) | Production of herboxidiene (mg/L) |
|--------------|---------------------|----------------------|---|-----------------------------------|
| 1 | Corn starch | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 54.89 |
| 2 | Maltose | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 37.22 |
| 3 | Glycerol | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 582.6 |
| 4 | Sucrose | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 27.6 |

Seed 균주를 4%씩 위에서 이미 carbon source 최적화한 배지에 4개의 다른 nitrogen source (peptome, ProFlo, triptone soybean flour)에 배양하여 생산성을 비교하였다.

배양은 500 mL baffled flask에 50 mL의 각각 배지에 shaking 배양기에 pH 7.2, 235 rpm으로 28°C에 5일을 배양한다.

Herboxidiene의 생산성은 Table 5 배지결과 carbon source에 따라 200.2–582.5 mg/L이 생산되며 ProFlo nitrogen source을 사용했을 때 가장 생산성이 높다 (Fig. 25).

Table 5. Nitrogen source의 최적화에 의한 herboxidiene 생산

| Media Number | Carbon sources 3.5% | Nitrogen source 0.8% | MINERALS (%) | Production of herboxidiene (mg/L) |
|--------------|---------------------|----------------------|---|-----------------------------------|
| 5 | Glycerol | Peptone | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 300.0 |
| 6 | Glycerol | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 582.6 |
| 7 | Glycerol | Tryptone | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 200.2 |
| 8 | Glycerol | Soybean flour | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 388.7 |

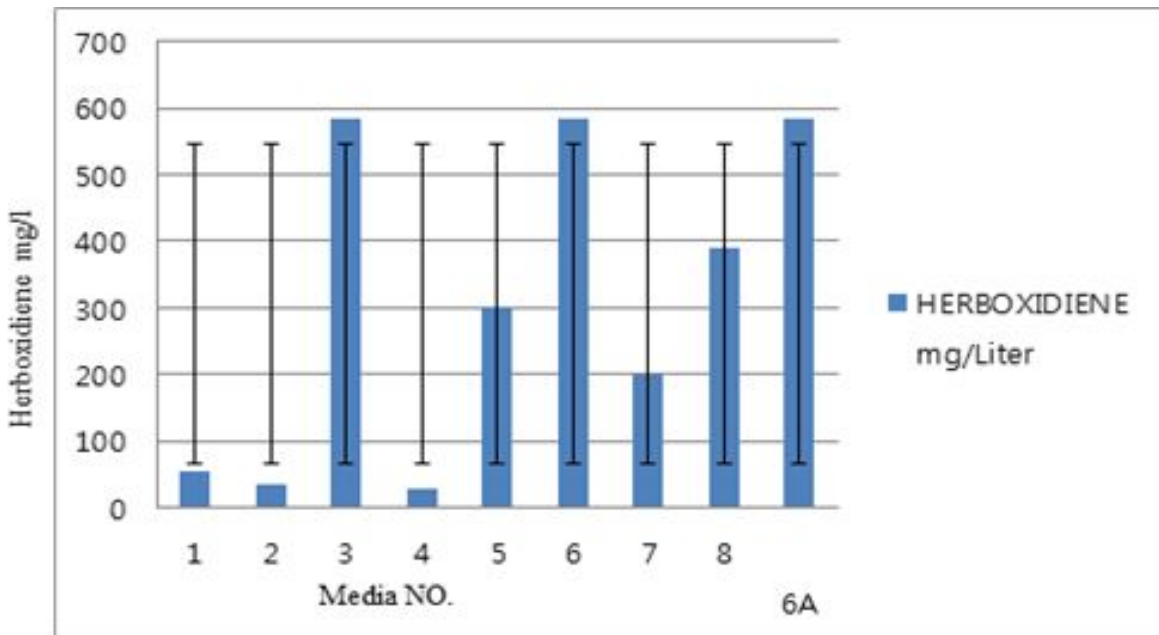


Fig. 24 Carbon/nitrogen source 최적화에 따른 herboxidiene의 생산량 비교.

Seed 균주를 4%씩 위에서 이미 carbon/nitrogen source 최적화한 배지에 2개의 다른 mineral source에 배양하여 생산성을 비교하였다.

Herboxidiene의 생산성은 Table 6 배지 결과 생산성이 비슷하다.

Table 6. Mineral source의 최적화에 의한 herboxidiene 생산

| Media Number | Carbon sources 3.5% | Nitrogen source 0.8% | MINERALS (%) | Production of herboxidiene (mg/L) |
|--------------|------------------------|-------------------------|---|-----------------------------------|
| 6 | Glycerol | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, KNO ₃ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | 582.6 |
| 6A | Glycerol | ProFlo | Except KNO ₃ other all the minerals of media NO. 6 were added | 585.0 |

Seed 균주을 4%씩 위에서 이미 carbon/nitrogen source 최적화한 배지에 glycerol 농도에 따른 herboxodiene의 생산성을 비교하였다.

Herboxidiene의 생산성은 배지 결과 glycerol 5%일 때 생산성이 가장 높다 (Table 7/Fig. 25).

Table 7. Glycerol 농도에 따른 herboxidiene 생산

| Media Number | Carbon sources | Nitrogen source 0.8% | MINERALS (%) | Production of herboxidiene (mg/L) |
|--------------|------------------|-------------------------|---|-----------------------------------|
| 6A | Glycerol 3.5% | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |
| 6A1 | Glycerol 5.0% | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |
| 6A2 | Glycerol 6.0% | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |
| 6A3 | Glycerol 7.0% | ProFlo | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |

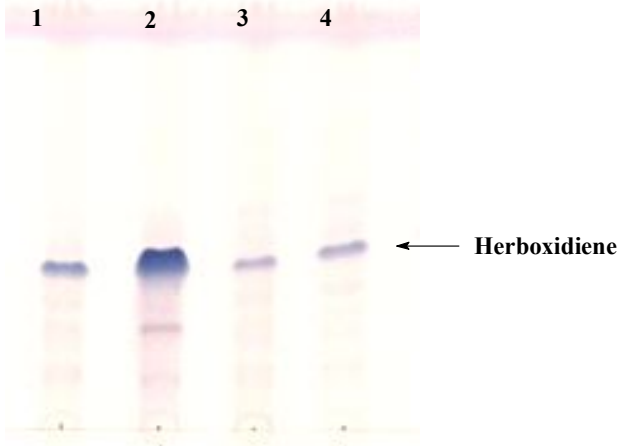


Fig. 25 Glycerol 농도에 따른 herboxidiene의 생산량 비교 TLC. Lane 1: glycerol 3.5%, Lane 2: glycerol 5%, Lane 3: glycerol 6%, Lane 4: glycerol 7%

Seed 균주를 4%씩 위에서 carbon/nitrogen source 최적화한 배지에 ProFlo 농도에 따른 herboxodiene의 생산성을 비교하였다. Herboxidiene의 생산성은 배지 결과 ProFlo 0.25%일 때 생산성이 가장 높다 (Table 8/Fig. 26).

Table 8. ProFlo 농도에 따른 herboxidiene 생산

| Media Number | Carbon sources (w/v) 5.0% | Nitrogen source (w/v) | MINERALS (%) | Production of herboxidiene (mg/L) |
|--------------|---------------------------|-----------------------|---|-----------------------------------|
| 6A1 | Glycerol | ProFlo 0.8% | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |
| 6A4 | Glycerol | ProFlo 0.6% | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |
| 6A5 | Glycerol | ProFlo 0.4% | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |
| 6A6 | Glycerol | ProFlo 0.25% | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KH ₂ PO ₄ 0.2, NaCl 0.05, CaCO ₃ 0.015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001 and Fe-EDTA 0.018 | Tested on TLC |

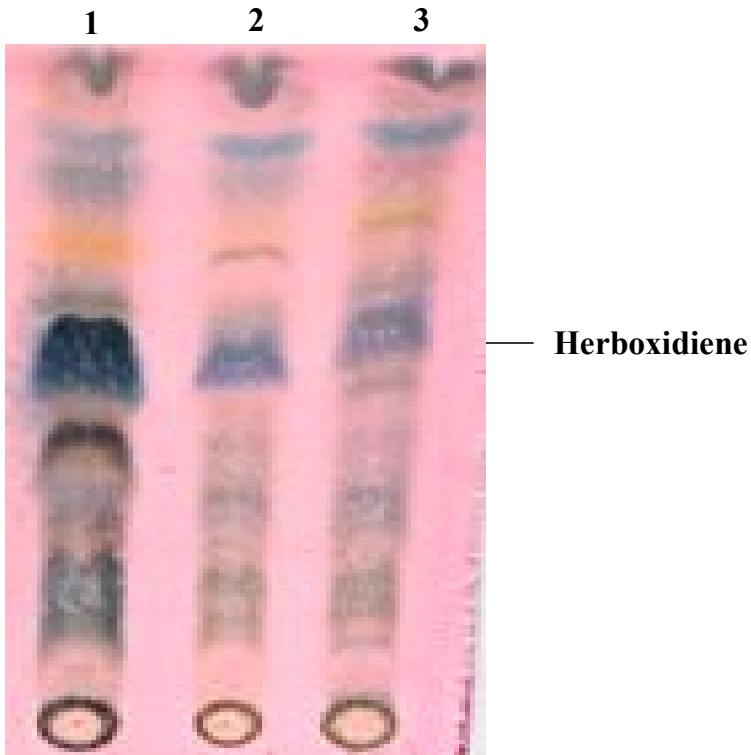


Fig. 26 Proflo 농도에 따른 herboxidiene의 생산량 비교 TLC. Lane 1: Proflo 0.25%, Lane 2: Proflo 0.4%, Lane 3: Proflo 0.6%.

기존 알려져 있는 배지 medium No 1 배지는 54.89 mg/L herboxidiene이 생산되며 최적화된 배지 media No 6A6의 경우 약 13.5가 증가된 744.6 mg/L의 생산성 증가를 보여준다.

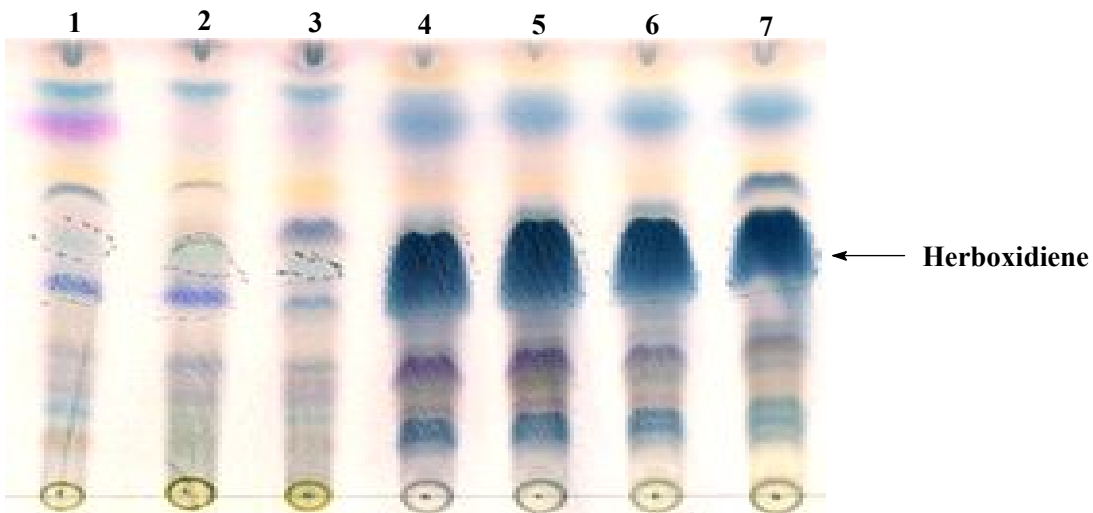


Fig. 27 최적화된 배지와 기존 생산 배지에 따른 herboxidiene의 생산량 비교 TLC. Lane 1, 2 및 3: control media (medium No 1), Lane 4,5,6 및 7 최적화된 배지 (medium No 6A6)

최적화된 배지에 시간에 따른 균체량 (dry mass)과 pH를 측정하였음. 균체는 20 hr 간격으로 0 - 120 시간동안 측정한 결과 4.5mg, 47mg, 57mg, 57.2mg, 33.4mg 및 32.1mg으로 60-80시간에 균체양이 가장 높으며, pH는 7.2, 6.93, 6.54, 6.36, 6.30, and 6.42로 약간 산성으로 변하고 있음을 보여준다 (Fig. 28).

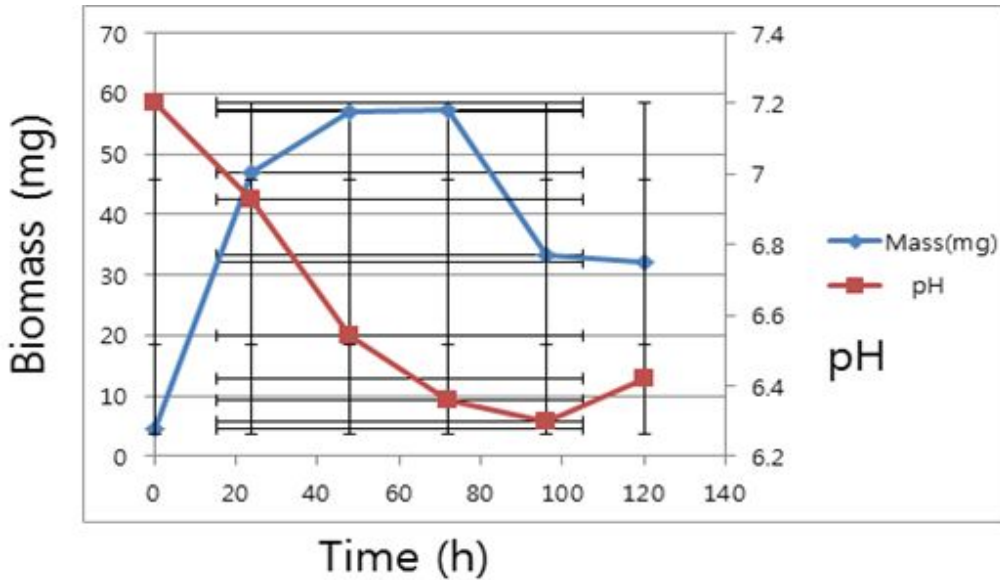


Fig. 28 *Streptomyces chromofucus*의 batch 발현시 시간에 따른 pH의 변화와 균체의 양

• Feeding에 의한 생산성 증가.

Seed 균주를 4%씩 위에서 carbon/nitrogen source 최적화한 배지 No 6A6에 24 h, 36 h 및 48 h 각각 배양 후 Glycerol 2.5%, ProFlo 0.125% 및 Glycerol과 ProFlo 2.5%-0.125%을 feeding 한 후 농도 herboxodiene의 생산성을 비교하였다.

Herboxidiene의 생산성은 배지 결과 Glycerol과 ProFlo 2.5%-0.125%을 36시간 배양 후 feeding 하였을 경우 herboxidiene 생산성이 가장 높으며, 1087 mg/L 생산이 됨 (Table 9/ Fig. 29). 알려진 생산균주와 비교하여 총 19.8배의 생산성 증가를 보여주고 있다.

Table 9. Fed-batch 발효에서 nitrogen, carbon 및 nitrogen/carbon feeding 효과

| Flask containing media No.6A6 | Fed at 24 h (w/v)(%) | Fed at 36 h (w/v)(%) | Fed at 48 h (w/v)(%) | Production of Herboxidiene (mg/L) |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1 | - | - | - | 744.6 |
| 2 | Glycerol-2.5 | - | - | 660.5 |
| 3 | - | Glycerol-2.5 | - | 709.5 |
| 4 | - | - | Glycerol-2.5 | 587.0 |
| 5 | ProFlo-0.125 | - | - | 629.4 |
| 6 | - | ProFlo-0.125 | - | 511.5 |

| | | | | |
|----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 7 | - | - | ProFlo-0.125 | 759.2 |
| 8 | Glycerol:ProFlo (2.5:0.125) | - | - | 919.9 |
| 9 | - | Glycerol:ProFlo (2.5:0.125) | - | 1086.9 |
| 10 | - | - | Glycerol:ProFlo (2.5:0.125) | 875.9 |

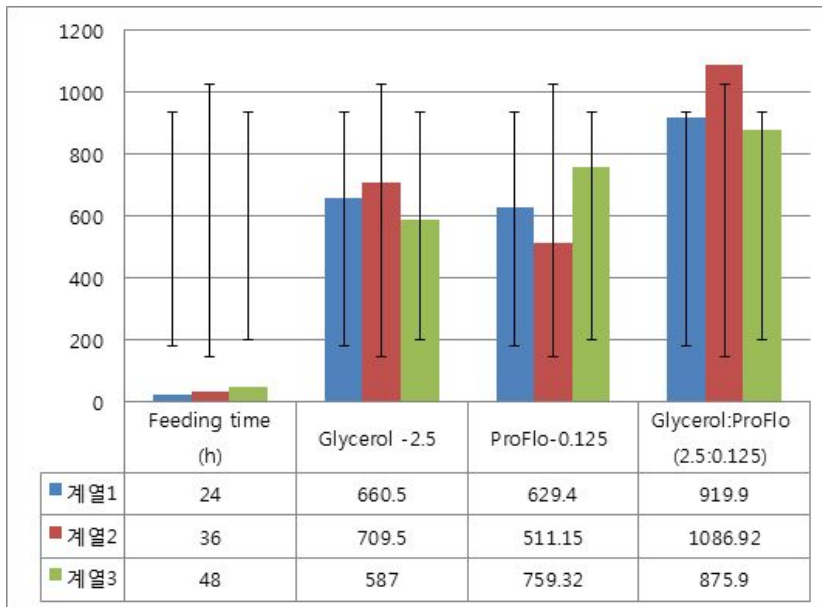


Fig. 29 Fed-batch 발효에서 시간별 nitrogen, carbon 및 nitrogen/carbon feeding 효과

5. 유전공학에 의한 생산성 증가 균주 개발

이형발현에 의해 이차대사산물의 생산을 증가시키기 위해 박테리아 균주를 조작하고 개량하는 것이 가능하다. 지금까지 연구된 결과 중에 positive한 유전자인 S-아데노실메티오닌 합성효소(MetK) 및 조절유전자인 afsR이 이형발현에 의해 이차 대사산물 생산을 향상시킬 수 있다. S-아데노실메티오닌 합성효소(MetK)의 다른 스트렙토마이세스 중 유래 2차 대사산물의 생산에 대한 효과는 이미 알려져 있다(Lee PC et al., Mol Microbiol, 43, 1413-1430, 2002; Maharjan S. et al., Biotechnol Lett, 30:1621-26, 2008). 다면발현성의 조절단백질 afsR은 스트렙토마이세스 내 다양한 2차 대사산물 생산을 조절한다. Streptomyces lividans, S. clavuligerus, S. griseus 및 S. venezuelae 내 afsR-sp의 과발현이 actinorhodin, clavulanic acid, streptomycin 및 pikromycin의 과생산을 유발한다는 것은 이미 알려져 있다 (Parajuli N et al., Res Microbiol, 156:707-12, 2005; Maharjan S et al., Biotechnol Lett, 30:1621-26, 2008).

(가) 생산성 증가 균주 개발

- Herboxidiene은 polyketide 계열의 천연물로서 acetyl-CoA와 propionyl-CoA의 축합에 의해 생산되기 때문에 이들이 축합하기 위해서는 malony-CoA와 methylmalonyl-CoA 선구물질이 필요하며 이들 생합성 유전자 증폭에 의해 생산성 증가를 할 수 있다 (Fig. 30).

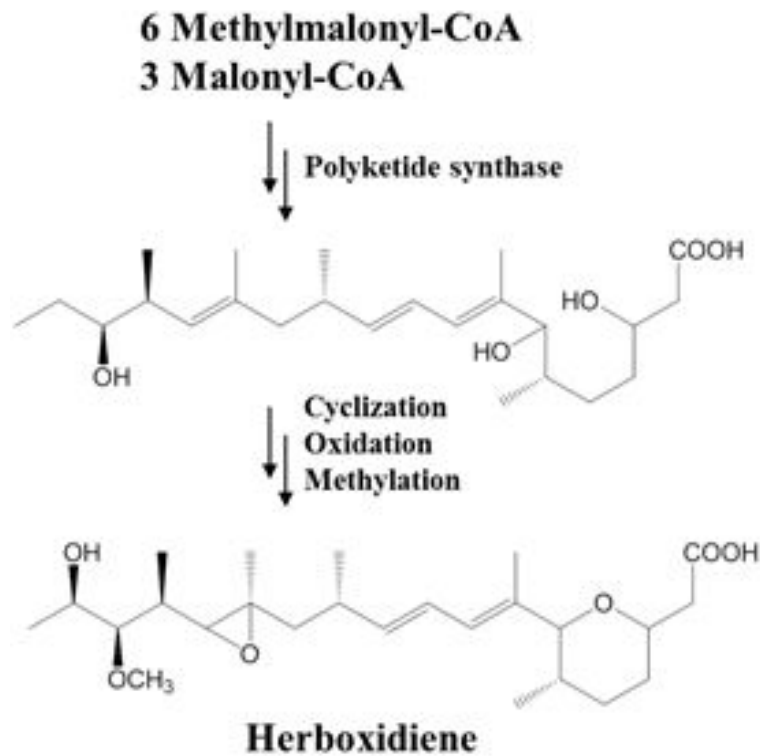


Fig. 30 malony-CoA와 methylmalonyl-CoA 선구물질로부터 herboxidiene의 합성.

- Malony-CoA 생합성 유전자는 3개의 유전자가 관여하여 합성된 3개의 유전자가 발현할 수 있는 pACC152를 pSET152 발현벡터로부터 재조합 된 것을 사용하였다 (그림 24).
- Methylmalony-CoA 생합성 유전자는 3개의 유전자가 관여하여 합성된 3개의 유전자가 발현할 수 있는 pPCC152를 pSET152 발현벡터로부터 재조합 된 것을 사용하였다.
- 선구물질 생산 유전자인 malony-CoA 생합성과 methylmalony-CoA 생합성 유전자에 조절기작 유전자인 afsR 및 metK1 유전자를 재조합된 pASA152 및 pSA152를 생산성 증가에 사용하였다.
- 재조합된 pACC152, pASA152, pSAM152, pAfsR152 및 pSA152 벡터를 herboxidiene 생산균주인 *Strpetomyces chromofurus* A7847 균주에 전이하여 각각 *S. chromofurus* ACC152, *S. chromofurus* ASA152, *S. chromofurus* ASM152, *S. chromofucus* AFSR152 및 *S. chromofurus* SAI152 균주를 제작하였음. 그중에 *S. chromofurus* ASM152, *S. chromofucus* AFSR152 및 *S. chromofurus* SAI152 균주는 유전자 전이가 PCR에 의해 확인하였다.
- 다음 table은 균주를 개발하기 위해 사용된 벡터 및 개발된 균주에 대한 목록이다.

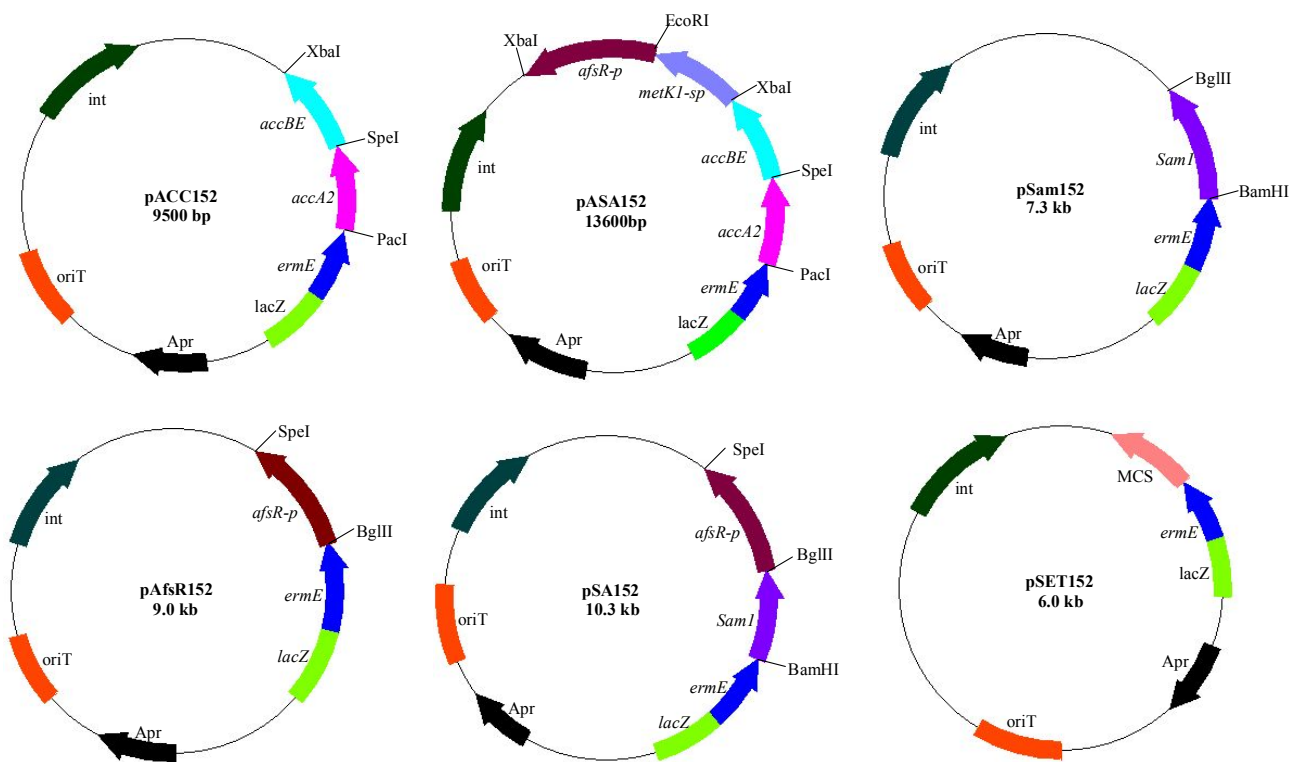


Fig. 31 Herboxidiene의 생산증가를 위한 precursor 생합성 유전자 및 조절기작 유전자가 포함된 재조합 발현벡터 (a) pACC152, (b) pASA152, (c) pSAM152, (d) pAfsR152, (e) pSA152, 및 (f) pSET152.

Table 10. 본 연구에서 균주개량에 사용된 벡터와 균주.

| Strain or plasmid | Description | Sources or reference |
|-------------------------------|--|----------------------------|
| Bacterial strain | | |
| <i>S. chromofuscus</i> 49982 | Wild type herboxidiene producer | ATCC |
| <i>S. chromofuscus</i> SIBR | pIBR25 with <i>metK I-sp</i> expressed into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> GIBR | pIBR25 with <i>afsR-sp</i> expressed into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> IBR25 | Expression of pIBR25 vector into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> ACC | pSET152 with <i>ACCase</i> integrated into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> ASA | pSET152 with <i>ACCase</i> , <i>metK I-sp</i> and <i>afsR-sp</i> were integrated into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> AS | pSET152 with <i>metK I-sp</i> and <i>afsR-sp</i> were integrated into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> SAM | pSET152 with <i>metK I-sp</i> integrated into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> AFS | pSET152 with <i>afsR-sp</i> integrated into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>S. chromofuscus</i> pGYIBR | pIBR25 with <i>YjiC</i> and <i>galU</i> expressed into <i>S. chromofuscus</i> | This study |
| <i>E. coli</i> | | |
| XL1 Blue | General cloning host | Stratagene PBL company |
| JM110 | General cloning host | Stratagene Lajolla CA, USA |
| Plasmid | | |
| pIBR25 | Streptomyces expression vector, with <i>ermE*</i> promoter and <i>Tsr^r</i> | iBR, SunMoon University |
| pSIBR | pIBR 25 based recombinant plasmid harboring <i>metK I-sp</i> | iBR, SunMoon University |
| pGIBR | pIBR 25 based recombinant plasmid harboring <i>afsR-sp</i> | iBR, SunMoon University |
| pSET152 | Streptomyces integration vector, with <i>ermE*</i> promotor and <i>Apr^r</i> | iBR, SunMoon University |
| pSAM152 | pSET 152 based recombinant plasmid harboring <i>metK I-sp</i> | iBR, SunMoon University |
| pAFS152 | pSET 152 based recombinant plasmid harboring <i>afsR-sp</i> | iBR, SunMoon University |
| pSA152 | pSET 152 based recombinant plasmid harboring <i>metK I-sp</i> and <i>afsR-sp</i> | iBR, SunMoon University |
| pACC152 | pSET 152 based recombinant plasmid harboring <i>ACCase</i> | iBR, SunMoon University |
| pASA152 | pSET 152 based recombinant plasmid harboring <i>ACCase</i> , <i>metK I-sp</i> and <i>afsR-sp</i> | iBR, SunMoon University |
| pGYIBR | pIBR 25 based recombinant plasmid harboring <i>YjiC</i> and <i>galU</i> | This study |

(나) Herboxidiene의 생산량 분석

- Herboxidiene의 생산량을 확인하기 위해, 야생형 *S. chromofurus* 및 형질전환체를 ISP 액체 배지 2로부터 수득한 후 36시간 배양한 균사와 같이 28°C에서 235 rpm으로 8일간 생산배지 No.6A6을 함유하는 칸막이 플라스크 내에서 배양하였다. 헤르복시디엔의 발효 생산을 매일 조사하였다. 브로스 샘플을 원심분리하고 Whatman 여과지로 여과한 후, 여과액을 동등한 부피의 에틸 아세테이트로 추출하였다. 에틸 아세테이트 추출물을 역상 C18 칼럼(4.6x250 mm, 50 µm; KANTO Reagents, 일본)을 사용하여, 이원상태에서 1 ml/분의 유속(Rt 28분)으로 0.05%의 트리플루오로아세트산 및 100%의 아세토나이트릴로 구성된 용매 시스템을 써서 고속액체크로마토그래피(HPLC)로 분석하였다. 생산물을 ESI-QTOF mass, 1H-NMR, 및 13C-NMR 분석으로 확인하였다. *S. chromofurus* 및 형질전환체 내 Herboxidiene 생산물을 표준 헤르복시디엔의 교정 곡선과 비교하여 나타내었다.
- 야생형 *S. chromofurus*와 8일째 되는 날 비교하였을때, *S. chromofuscus* SIBR내에서 1.32배까지(0.976 g/L) 증가하였고, *S. chromofuscus* AFS는 1.7배(1.258 g/L)로 더 높았고, *S. chromofuscus* GIBR은 3.85배(2.849 g/L)로 가장 높았다.
- 그러나, *S. chromofuscus* SAM, *S. chromofuscus* IBR25, *S. chromofuscus* ACC, *S. chromofuscus* ASA 및 *S. chromofuscus* AS에서는 유효한 변화를 관찰할 수 있다.

Table 11. *S. chromofurus* 및 형질전환체에서 Herboxidiene의 생산량

| Strains | Production (Fold / Amount g/L) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>S. chromofuscus</i> ATCC 49982 | 0.74 |
| <i>S. chromofuscus</i> SIBR | 1.32-fold/0.976 |
| <i>S. chromofuscus</i> GIBR | 3.85-fold/2.849 |
| <i>S. chromofuscus</i> IBR25 | 0.95-fold/0.70 |
| <i>S. chromofuscus</i> ACC | 0.057-fold/0.042 |
| <i>S. chromofuscus</i> ASA | 0.87-fold/0.64 |
| <i>S. chromofuscus</i> AS | 0.89-fold/0.66 |
| <i>S. chromofuscus</i> SAM | 1.01-fold/0.74 |
| <i>S. chromofuscus</i> AFS | 1.7-fold/1.258 |

6. Herboxidiene glycoside의 합성 및 생산

Herboxidiene은 제초제로 현재 field test중에 있으며, 제초제 외에 anticancer 및 anticardiovascular 생물학적 활성을 가지고 있기 때문에 여러 연구팀이 관심을 가지고 있다. 현재 herboxidiene이 in vitro에서 glycosylation이 확인한 후에 생산 균주인 Streptomyces chromofucus에서 직접 생산할 수 있는 균주 개발하는 전략을 이용하였다.

가. in vitro 에서 herboxidiene glycoside의 합성

(1) Glucosyl-herboxidiene의 합성

Herboxidiene에 glycosylation을 하기 위해 Bacillus licheniformis ATCC 14580에서 확보된 glucosyltransferase YjiC와 YdhE 효소에 의해 Glucosyl-herboxidiene을 합성 하였다.

Glucosyltransferase yjiC와 ydhE 유전자를 pET302/NT-His 벡터에 클론하여 E. coli BL21에서 발현하여 SDS-PAGE에서 발현여부 확인하였다.

발현된 두개의 glucosyltransferase YjiC와 YdhE을 herboxidiene과 UDP-glucose를 in vitro에서 반응한 결과 YjiC는 당화된 Glucosyl-herboxidiene이 합성이 되었지만 YdhE는 전혀 반응성을 보여주고 있지 않고 있다.

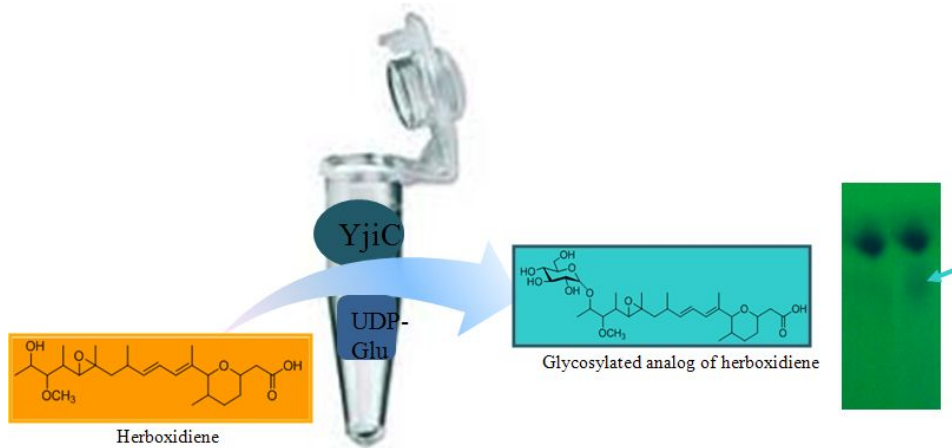


Fig. 32 *In vitro* enzyme assay of both glucosyltransferases was carried out separately at 37°C to transfer glucose moiety from UDP-glucose to herboxidiene in the presence phosphate buffer and MgCl₂.

- HPLC 분석 결과 YjiC는 일부의 herboxidiene이 glycosylated된 유도체 합성이 되는 것을 볼 수 있지만 YdhE 당화효소는 전혀 반응이 가지 않았음을 확인하였다.

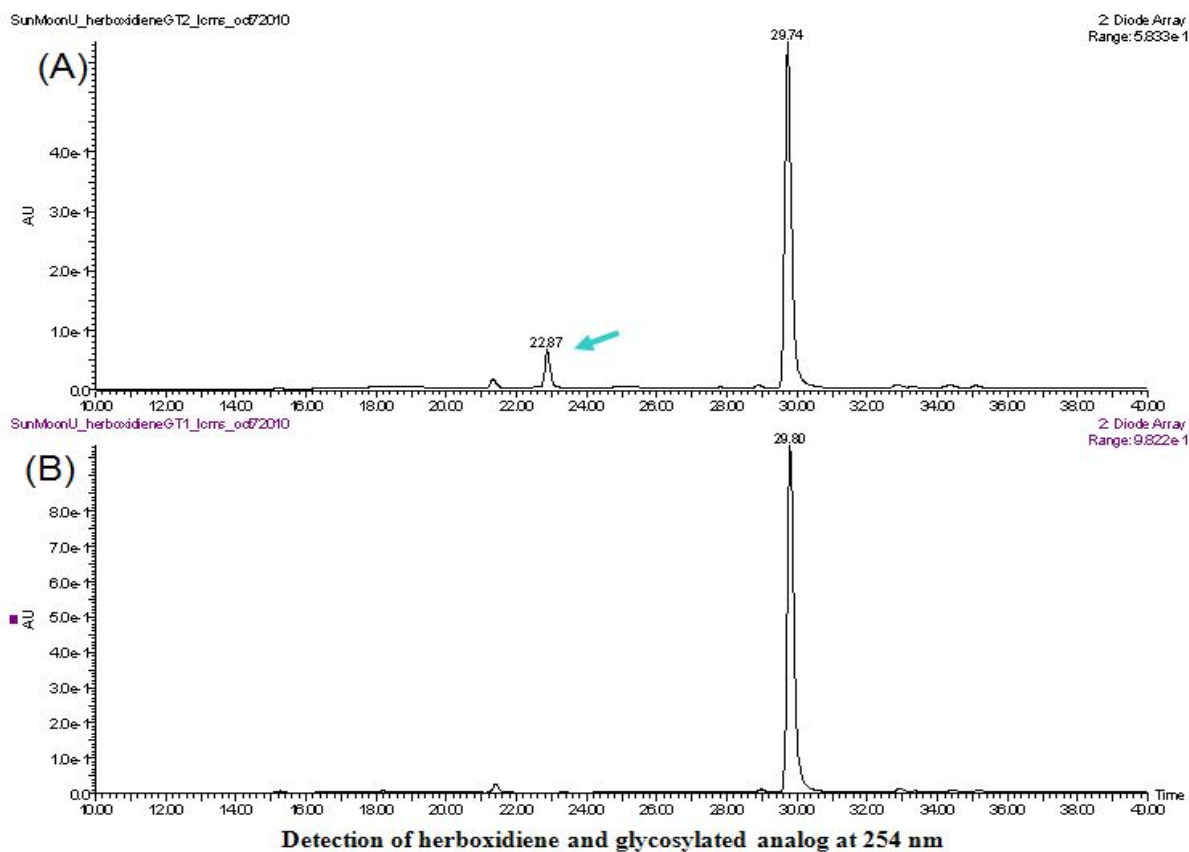


Fig. 33 Glycosylated herboxidiene의 HPLC 분석. (A) Glycosylated analog of herboxidiene was obtained only from the enzyme assay of YjiC. (B) Expected product was not detected when YdhE was used

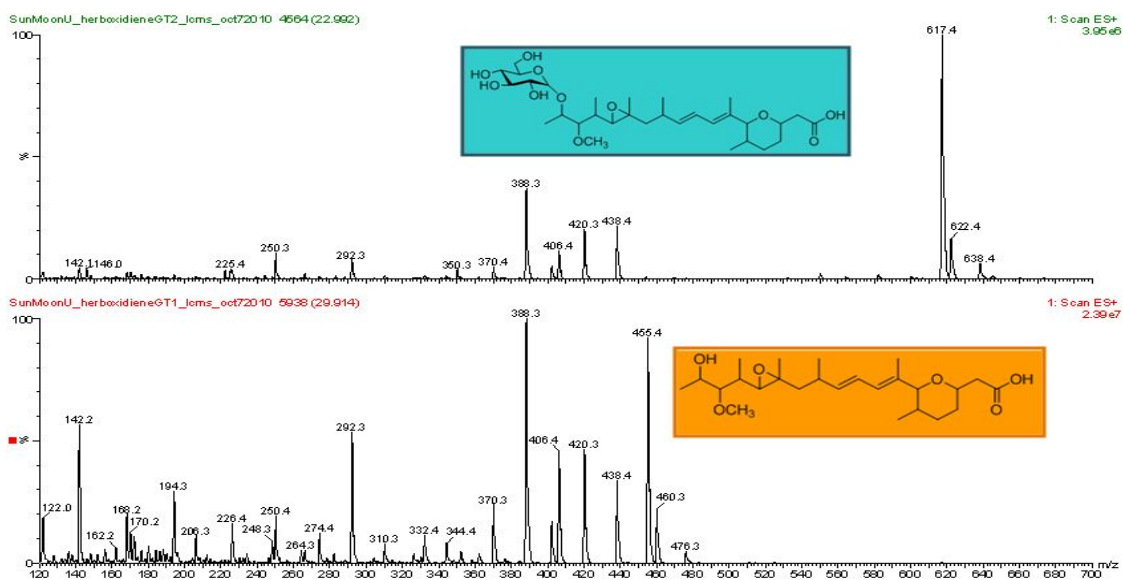


Fig. 34 Glycosylated herboxidiene의 mass 분석.

(2) Galactosyl-herboxidiene의 합성

Herboxidiene에 galactosylation을 하기 위해 *Streptomyces peucetius*에서 확보된 glycosyltransferase MshA 효소에 의해 Galactosyl-herboxidiene을 합성 하였다.

Glycosyltransferase mshA 유전자를 pET302/NT-His 벡터에 클론하여 *E. coli* BL21에서 발현하여 SDS-PAGE에서 발현여부 확인. 발현된 효소 MshA를 UDP-glucose와 UDP-galactose로 확인한 결과 UDP-galactoseaks이 herboxidiene에 당화하여 galactosyl-herboxidiene이 합성이 되었다.

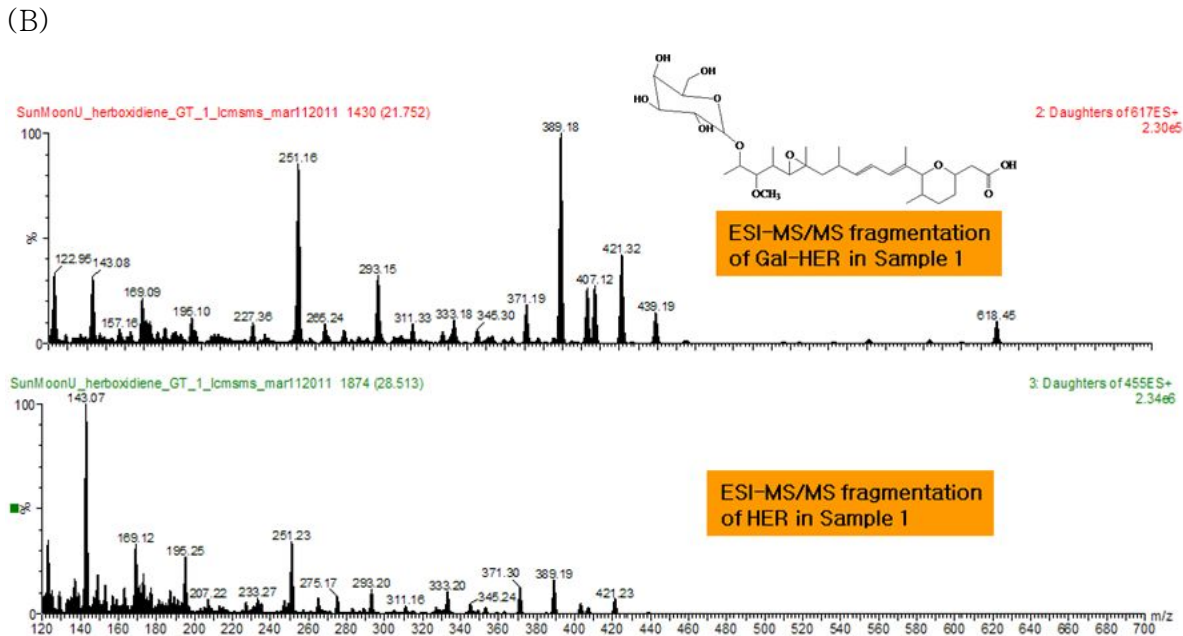
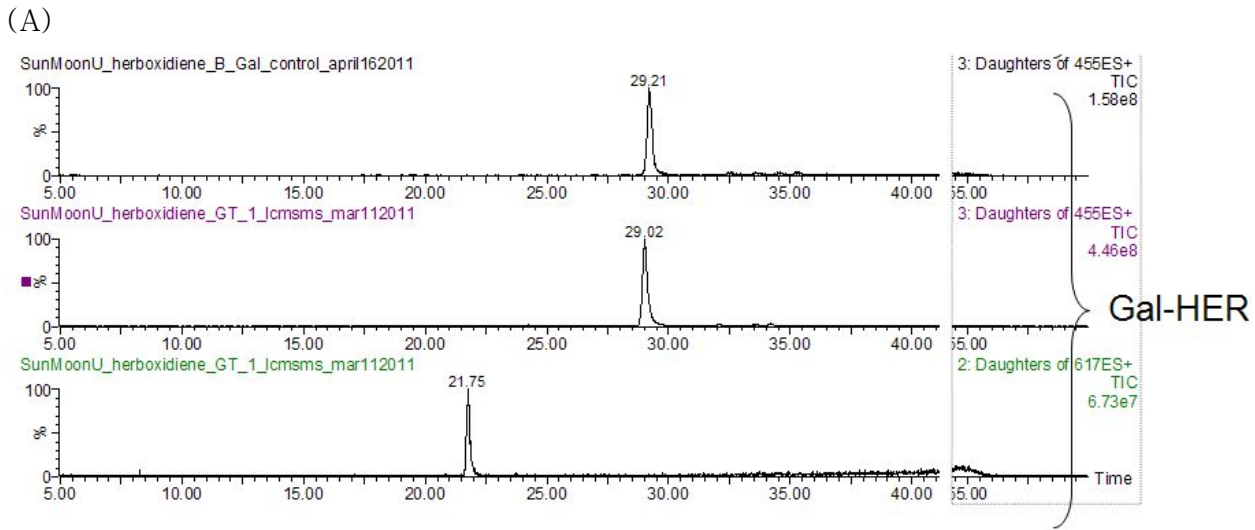
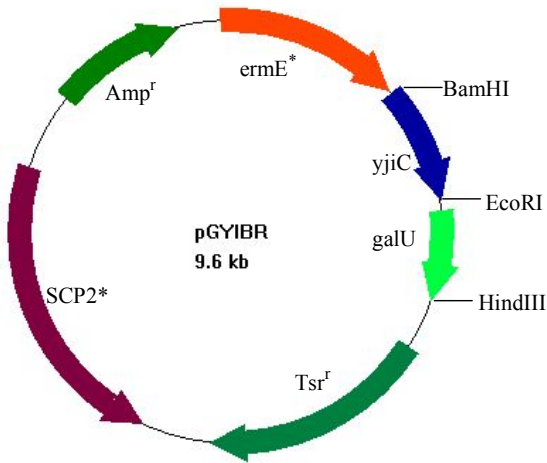


Fig. 35 Galactosyl-herboxidiene의 HPLC 및 MS 분석

나. *S. chromofuscus* 균주에서 herboxidiene glycosides의 생산

*S. chromofuscus*에서 직접 herboxidiene glycosides을 생산하기 위해 방선균 발현벡터인 pSET152 에 UDP-glucose 의 양을 늘려주기 위해 UDP-glucose synthase 유전자와 (galU) 당화효소 유전자 (yjiC) 를 재조합한 pGYIBR을 재조합하여 *S. chromofuscus*에 전이하여 균주를 제작하였다 (Fig. 36).

(A)



(B)

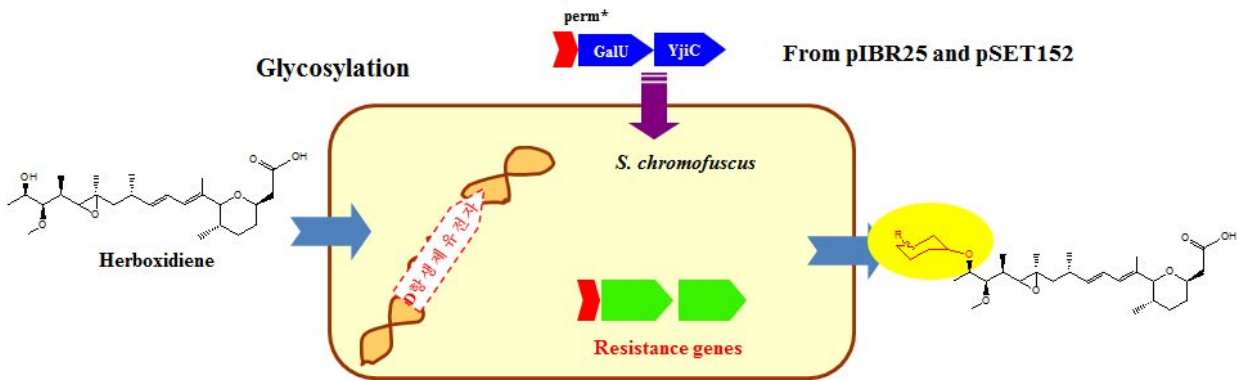


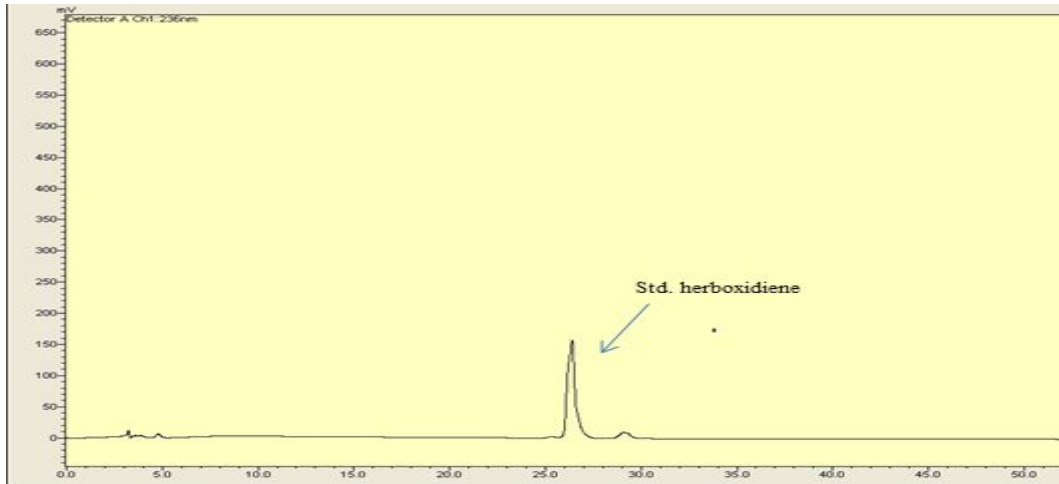
Fig. 36 (A) 벡터 pGYIBR의 맵, (B) Herboxidiene glycoside의 방선균내에서 생산 전략

제작된 균주는 야생균주와 같은 방법으로 배양하였으며, 배양액을 C₁₈-reversed phase HPLC 에 분석 하였다.

분석결과 herboxidiene 100으로 보았을 때 30% 정도가 herboxidiene glycoside로 추정되는 새로운 피크를 얻었으며 (Fig. 37), 새 피크를 mass 분석한 결과 herboxidiene glycoside로 확인하였다 (Fig. 38

및 Fig. 39).

(A)



(B)

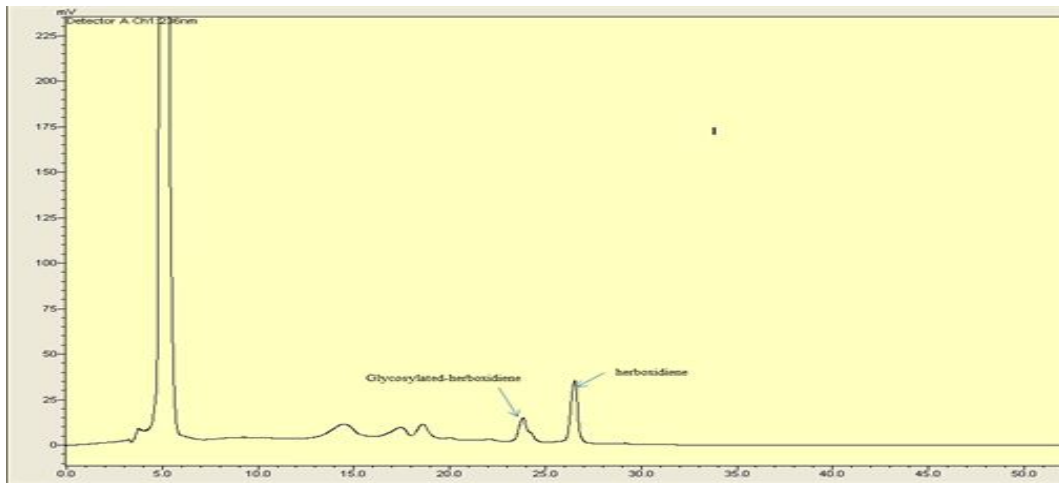


Fig. 37 (A) 야생균주에서 얻은 herboxidiene, (B) 제작된 균주에서 얻은 herboxidiene과 herboxidiene glycoside.

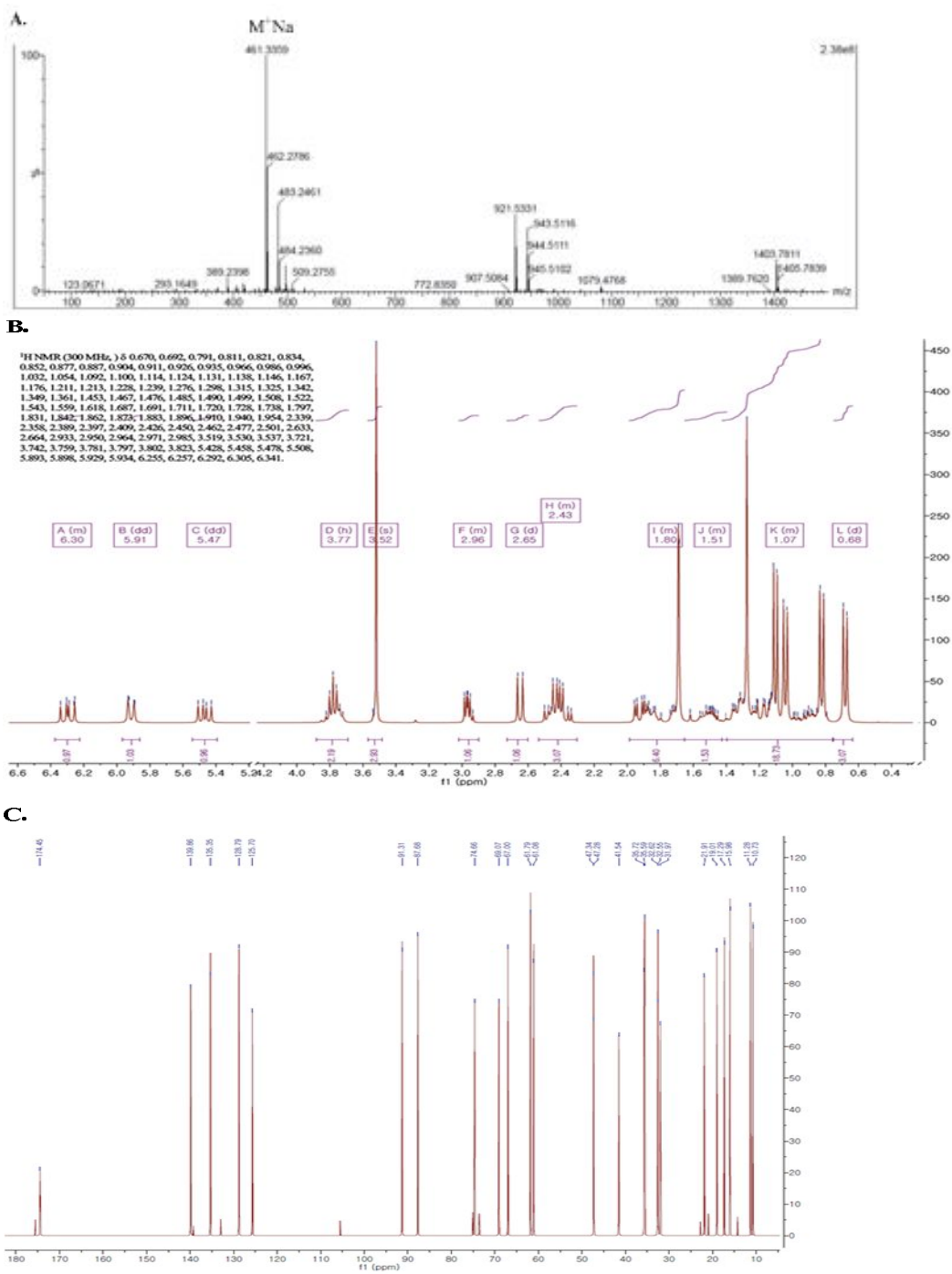


Fig. 38. (A) 표준샘플의 herbexidiene Mass 분석, (B) ¹H NMR 및 (C) ¹³C NMR.

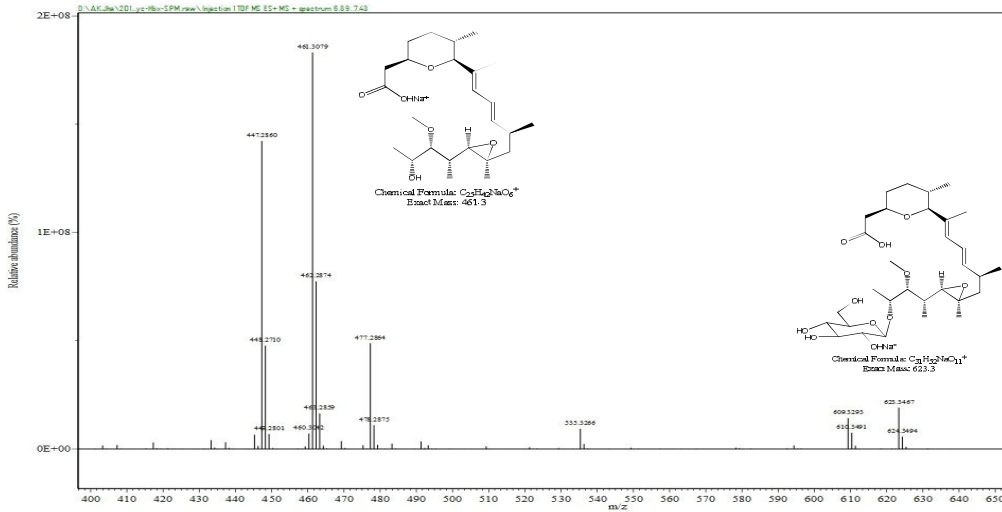


Fig. 39 새로운 피크의 Mass 분석.

7. 조합생합성에 의한 Herboxidiene 신규 유도체의 개발

가. 외래 P450 유전자의 발현을 위한 plasmid 및 균주 제작

PKS에 의해 생성된 폴리케타이드의 골격인 aglycone은 산화(oxidation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation) 등의 post-PKS tailoring 과정을 통해 최종적으로 생리활성을 가지게 되며, 이 과정의 변화는 생합성 과정에서 유도될 수 있는 골격구조의 다양성 및 추가적인 작용기의 변화를 가져오게 됨.

본 연구팀에서는 이미, *Streptomyces venezuelae*의 post-PKS 변형 단계중 하나이며, 생리활성에 큰 영향을 주는 oxidation에 관여하는 유전자인 *pikC* (hydroxylase)의 조합생합성을 통하여 다양한 신물질 생성 기술을 확립하였음. 즉, 조합·발현을 통하여 pikromycin 생합성 유전자 집단이 삭제된 *S. venezuelae* mutant 균주에 olendomycin을 feeding하여 oxidation된 olendomycin 신규 물질의 생산을 확인하였으며, 당 합성에 관여하는 des 유전자 집단이 삭제된 *S. venezuelae* mutant 균주에 erythromycin 생합성 유전자 집단의 hydroxylase인 *eryF*와 oleandomycin 생합성 유전자의 oxidase인 *oleP*를 조합생합성 발현 벡터를 이용하여 각각 이중 조합·발현 하였고, 그 결과로 신규 물질이 생산됨을 확인하였음 (Fig. 40) [Adv. Synth. Catal. 2005, 347:1369-1378].

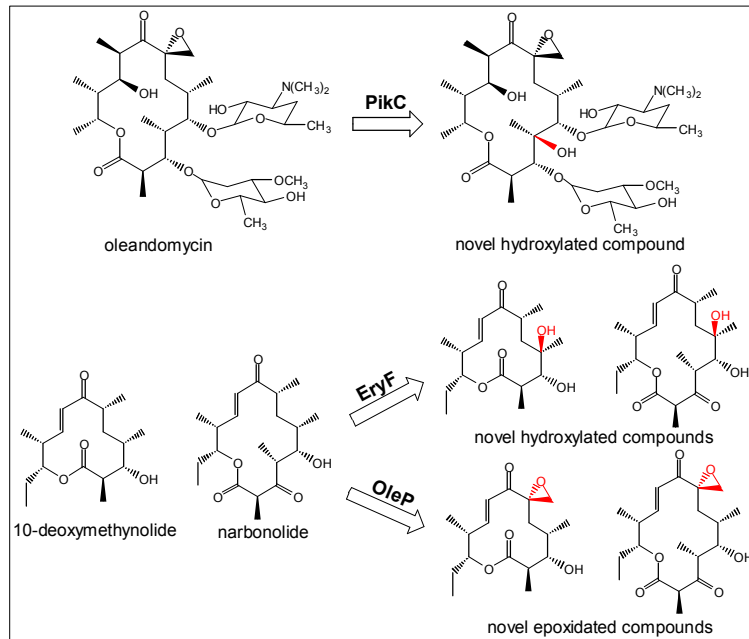


Fig. 40 이중 PKS의 조합생합성에 의한 polyketide 유도체생산의 예

따라서, 위의 내용을 바탕으로, 외래 P450 유전자를 *S. chromofuscus*에서 발현하여 herboxidiene 신규 유도체를 생산하고자 하였음.

외래 유전자에는 erythromycin 생합성 유전자 집단의 hydroxylase인 *eryF*, pikromycin 생합성 유전자 집단의 hydroxylase인 *pikC*, oleandomycin 생합성 유전자의 oxidase인 *oleP*, 그리고 monensin 생합성 유전자 집단의 epoxidase인 *monCI*과 epothilone 생합성 유전자 집단의 epoxidase인 *epoF*를 pSET152 (*ermE**)와 pSE34 (*ermE**)벡터에 각각 클로닝하였음 (Fig. 41).

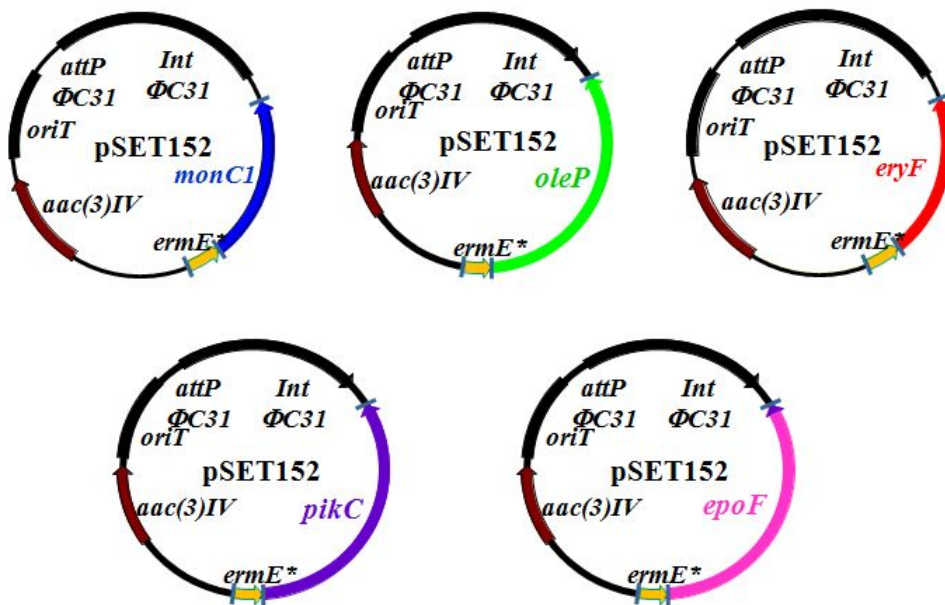


Fig. 41. 5가지 외래 P450 유전자의 plasmid 제작

제작한 plasmid를 *S. chromofuscus* A7847로 도입하여 형질전환된 균주를 제작하였다.

나. 외래 P450 유전자의 발현에 따른 신규유도체의 개발

1) *Streptomyces chromofuscus* 형질전환균주에서 신규 유도체 개발

가) herboxidiene 배양 조건 및 추출 방법

- *S. chromofuscus* A7847에서 herboxidiene의 생산 확인을 위하여 두가지 배지를 이용하여 배양하였음. 첫째로, herboxidiene 생산액체배지 (3.5% corn starch, 0.8% Pro Flo, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% KH_2PO_4 , 0.2% KNO_3 , 0.05% NaCl, 0.015% $CaCO_4$, 0.001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.018% Fe-EDTA) [Journal of antibiotics. 1992, 45; 914-921]를 이용하여 28°C에서 5일간 배양하고 배양액의 2배의 양인 ethylacetate를 첨가하여 추출하고 이를 최종 methanol로 녹여서 시료를 확보하였다.
- 둘째로, R2YE 고체배지(103g sucrose, 0.25g K_2SO_4 , 0.1g casamino acid, 10.12g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10g glucose, 5.73g TES sodium salt, 5g yeast extract, 10ml KH_2PO_4 (0.5%), 4ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M), 15ml L-proline(20%), 7ml NaOH(1N), 2ml trace element solution, 22g agar) [Practical Streptomyces Genetics. 2000]에 균주를 도말하여 5일간 28°C에서 배양하여 고체배지를 약 0.7cm로 자른 후 배지의 양에 2배에 해당하는 methanol을 첨가하여 28°C에서 3시간동안 격렬하게 섞어준 후 진공 건조하여 추출함. 추출한 메탄올 농축액은 2:3의 비율의 H_2O 과 ethylacetate를 넣어서 격렬하게 섞어주고 ethylacetate 층만 분리하여 진공건조시켰음. 이를 최종 methanol에 녹였다.

본 연구실에서는 이미 방선균의 hydroxylation에 관한 연구를 수행하였으며, 이를 통해서 액체배지보다 고체배지에서 배양하였을 경우에 유도체의 생산이 더 원활함을 확인하였음. 이에 따라서, herboxidiene을 생산하는 *S. chromofuscus*에서도 같은 양상을 보일 것으로 사료되어, 생산액체배지와 R2YE 고체배지에서 *S. chromofuscus* A7847을 배양한 추출물을 HPLC와 LC-ESI/MS로 분석하였음 (Fig. 42).

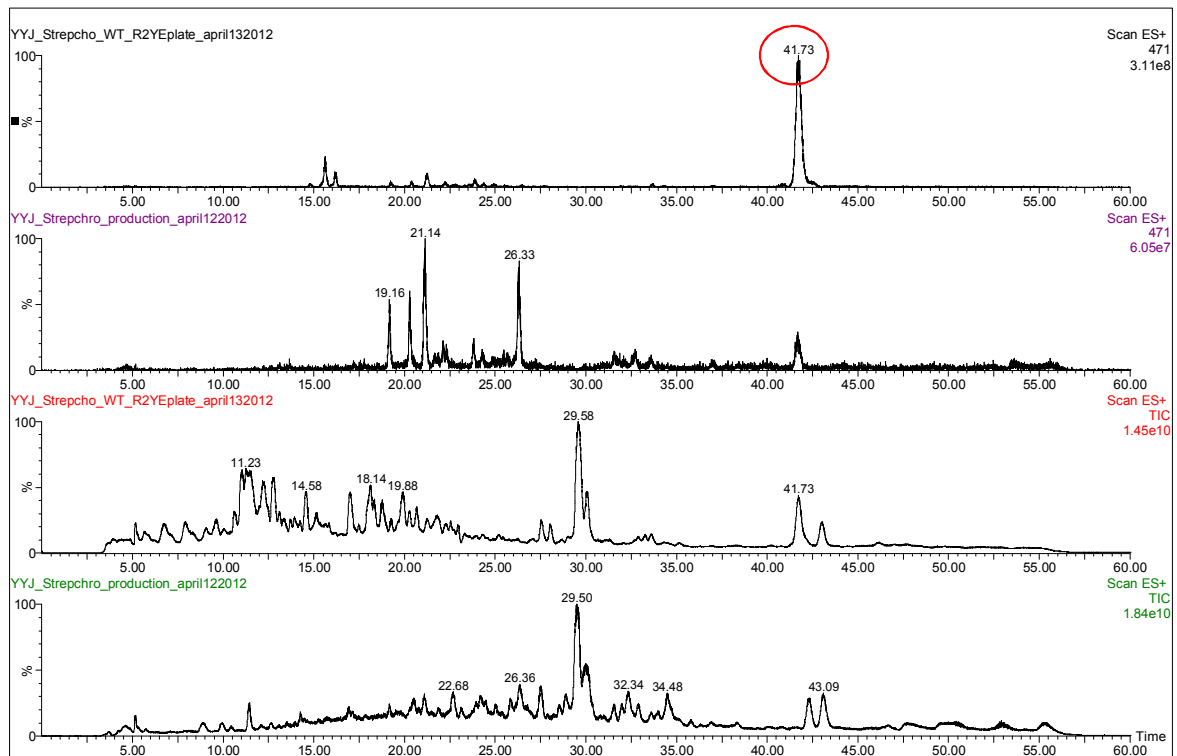


Fig. 42 생산액체배지와 R2YE고체배지에서 herboxidiene과 그 유도체의 HPLC-ESI-MS 분석 크로마토그램

그 결과, *S. chromofuscus* A7847에서도 자연적으로 유도체를 생산 (retention time 41분) 하는 것으로 확인되었으며, 생산액체배지보다 R2YE 고체배지에서 herboxidiene의 유도체로 (M/Z 471) 보이는 물질의 검출이 더 잘 되었음다 (Fig. 42).

S. chromofuscus A7847에서 보인결과를 토대로 R2YE 고체배지에서 배양 시에 생산액체배지보다 유도체 물질의 검출이 더 잘될 것으로 사료되어 R2YE 고체배지를 외래유전자를 도입한 *S. chromofuscus* 형질전환 균주의 배양에 사용하였음.

P450 외래 유전자를 도입한 형질전환 균주의 HPLC 분석결과, HPLC와 HPLC-ESI-MS를 통하여 유의한 분석결과를 얻을 수 없었음. 이는 신규 유도체로 보이는 물질이 매우 소량으로 생산되어 peak로 검출이 어려운 것으로 사료된다.

Streptomyces venezuelae 이종숙주로부터 신규 유도체 개발

이종숙주 발현 시스템은 화학합성을 대체 할 수 있는 효율적 방안 중 하나로 목적하는 천연화합물의 생합성 유전자 집단을 확보하고 이를 유전자 조작과 배양이 용이한 이종숙주에서 발현하는 시스템임. 따라서, 본 연구에서 *S. chromofuscus*보다 성장속도가 빠르며, transformation과 같은 유전자 조작이 용이하고 다양한 이차대사산물의 생합성에 필요한 전구체를 자연 생산하여 이종 숙주발현에 많이 사용되는 *S. venezuelae*를 이용하였음. 이를 통하여 herboxidiene의 유도체를 본래의 균주보다 더 많이 생산할 수 있을 것으로 사료되었음. 본 연구에서 이종숙주로 사용한 *S. venezuelae* YJ028은 pikromycin 생합성 유전자 집단과 desosamine 유전자 집단이 삭제된 균주이며, 본 연구실에서 형질전환방법을 이미 확보하여 다른 방선균에서 성공적으로 이용하고 있었음. 실험방법은 그림 10과 같으며, YJ028균주에 외래 유전자를 도입한 돌

연변이 균주를 제작하고, 이에 herboxidiene을 첨가하여, 첨가한 herboxidiene이 외래유전자에 의하여 구조 변형이 일어날 수 있을 것으로 기대하였음 (Fig. 43). 이를 위하여 P450 외래 유전자 5가지를 방선균 발현 벡터인 pSET152 (*ermE**) (Fig. 41)와 pSE34 (*ermE**) 벡터에 클로닝하여 plasmid를 제작하였으며, 이중 숙주에 transformation방법으로 형질전환하여 균주를 제작하였다.

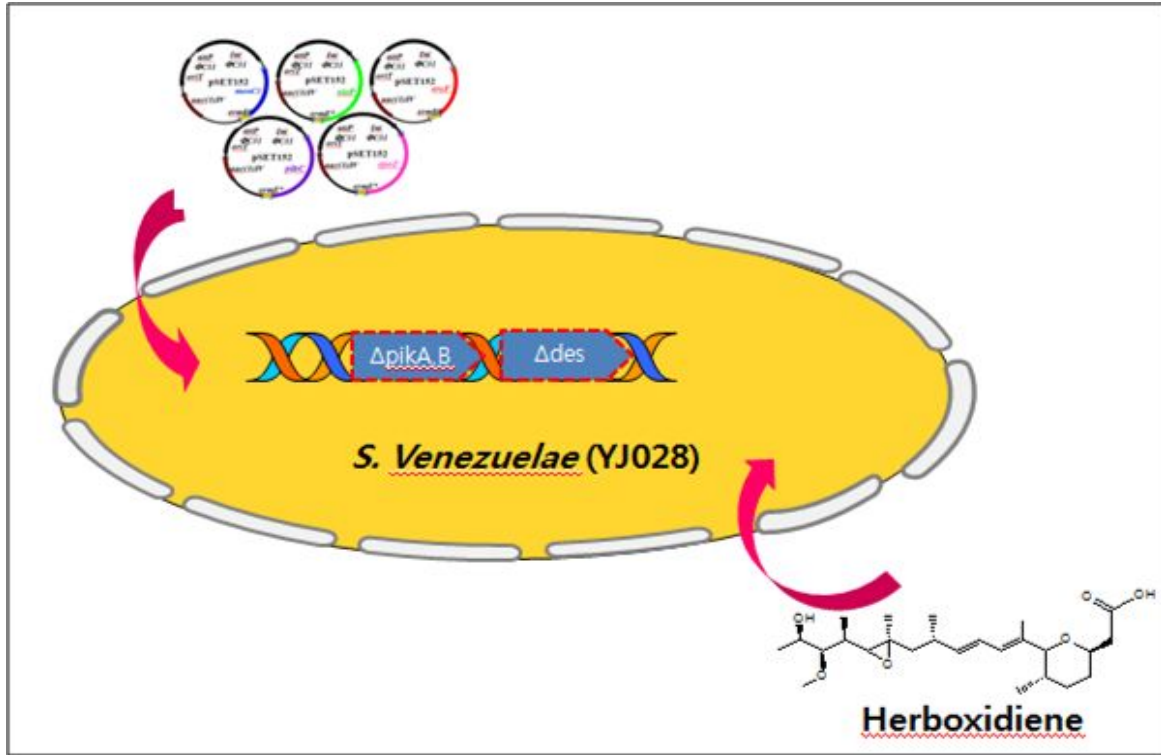


Fig. 43 신규 유도체 개발을 위한 이중숙주 발현 시스템

나) 이중숙주에서 herboxidiene 배양 조건 및 추출 방법

- 본래의 균주 배양에 이용한 R2YE 고체배지를 이용한 배양 조건을 그대로 유지하였음. 이중숙주발현을 위하여 예비실험을 거쳐 2일간 전배양한 세포를 본 배양으로 옮겨 2일 간 배양한 후 herboxidiene을 첨가하는 것으로 배양방법을 확립하였음. 이는 가장 herboxidiene의 회수율이 높은 결과임을 확인하였다.
- 즉, R2YE 액체배지에서 2일간 전배양한 세포를 R2YE고체배지로 본 배양하여 2일간 30°C에서 배양하고 herboxidiene을 첨가하여 본 배양과 같은 조건에서 3일간 더 배양하였음. 배양 후의 추출 방법은 *S. chromofuscus* A7847의 방법과 동일하다.

확립한 배양방법으로 *oleP*, *pikC*, *monCI*, *eryF*를 YJ028 이중숙주에 형질전환한 균주를 HPLC로 분석하였다 (Fig. 44 및 45).

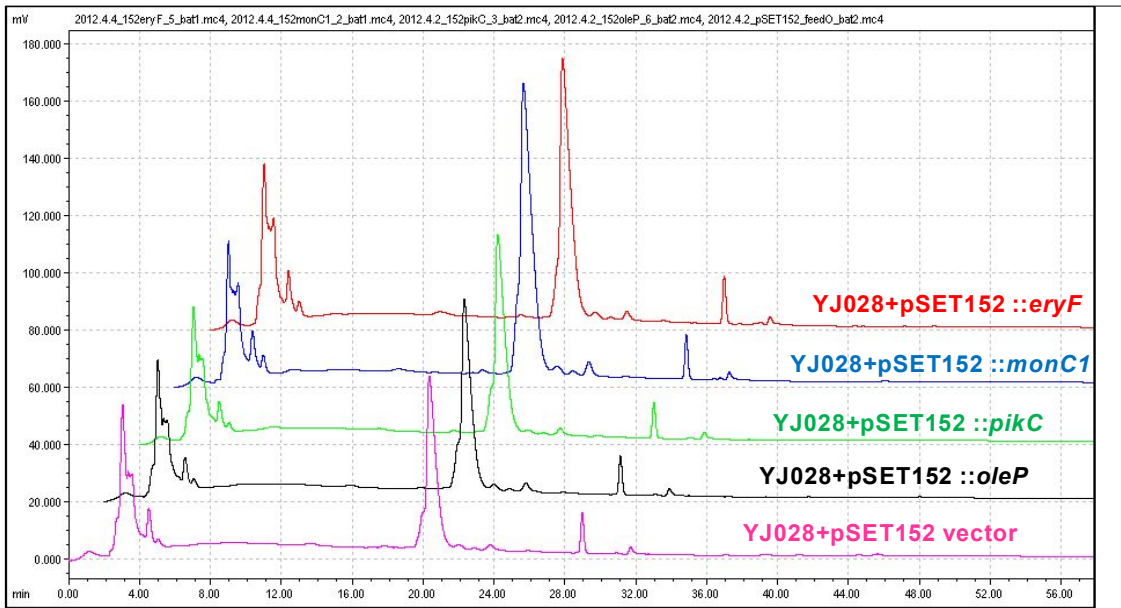


Fig. 44 P450 유전자를 pSET152 (*ermE**) 벡터로 이종숙주에 도입한 형질전환균주의 HPLC 크로마토그램

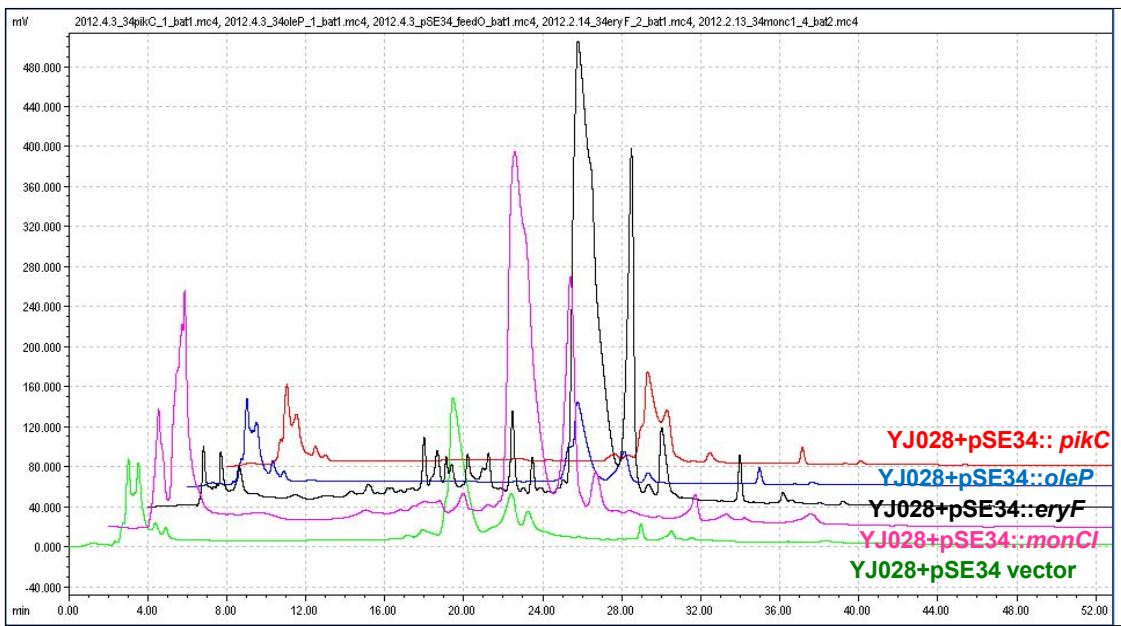


Fig. 45 P450 유전자를 pSE34 (*ermE**) 벡터로 이종숙주에 도입한 형질전환균주의 HPLC 크로마토그램

pSET152 (*ermE**) 벡터와 pSE34 (*ermE**) 벡터를 이용한 형질전환균주의 HPLC 분석결과, 대조균인 YJ028 이종숙주의 배양결과와 유의한 결과를 얻지 못 하였음 (Fig. 44 및 45). 이는 신규유도체가 매우 소량 생산되어 HPLC로는 정확한 분석을 하기 어려울 것으로 사료되어 HPLC-ESI-MS를 이용하여 신규 유도체 물질의 생산 여부를 분석하였다.

HPLC-ESI-MS 분석결과, m/z값 471로 선택 시 23.95분에서 새로운 peak가 검출되었으며, 이는 *epoF*

의 기능에 의해 에폭시고리가 생겨 분자량 16이 증가한 신규 물질이 생산된 것으로 사료됨 (Fig. 46). herboxidiene은 m/z값 455로 선택 시 retention time 29.84분에서 확인하였다. *epoF*를 형질전환시킨 균주에서만 신규유도체로 보이는 peak가 검출되었다.

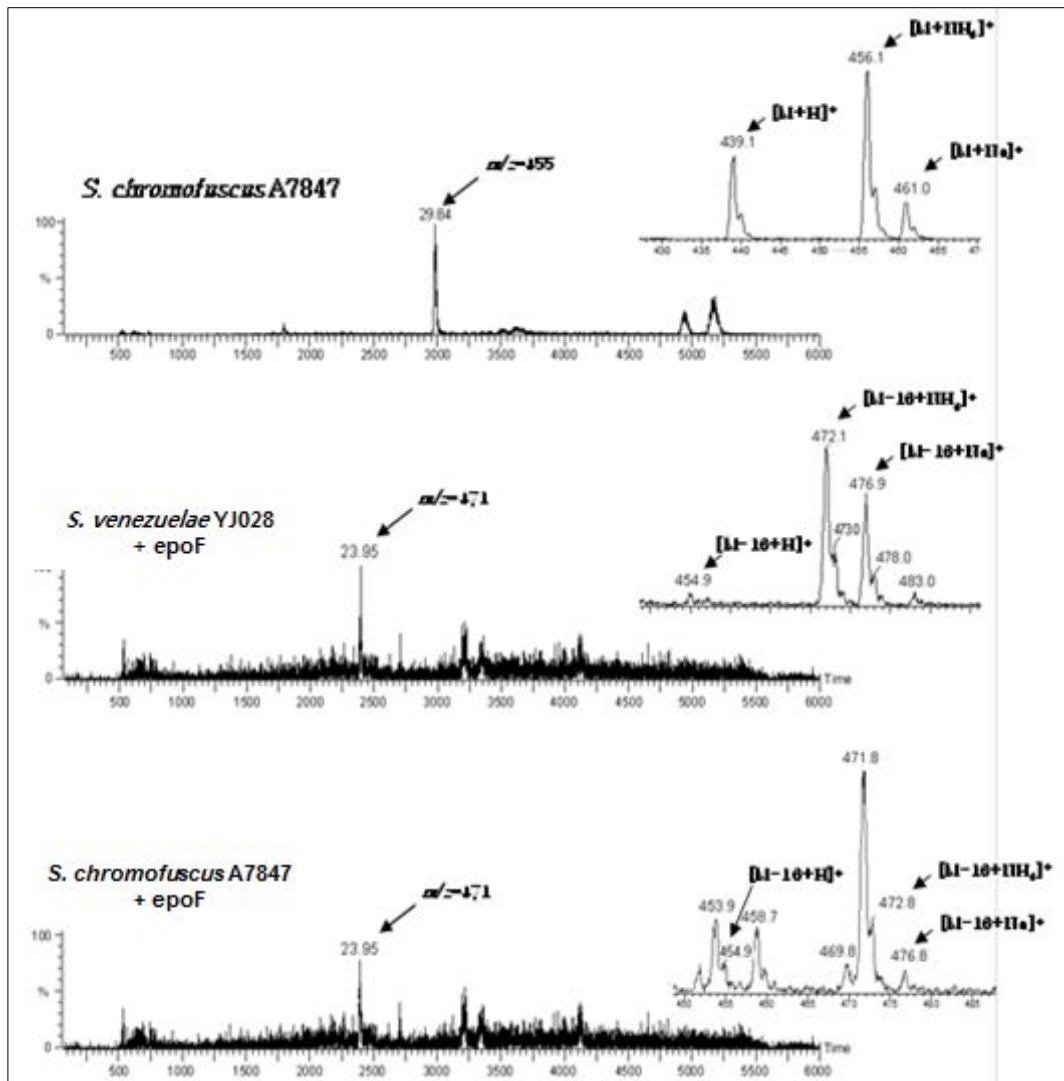


Fig. 46 YJ435와 YJ426 배양 추출물의 HPLC-ESI-MS 분석

신규 유도체의 구조 예측을 위하여 HPLC-ESI-MS/MS 분석을 수행하였음. 이종숙주에 *epoF*를 도입한 형질전환균주에서 herboxidiene의 fragmentation pattern (m/z 값 461, 417, 399, 그림 5) 에서 분자량 16이 증가한 fragmentation pattern m/z값 477, 432, 415를 확인하였다 (Fig. 47).

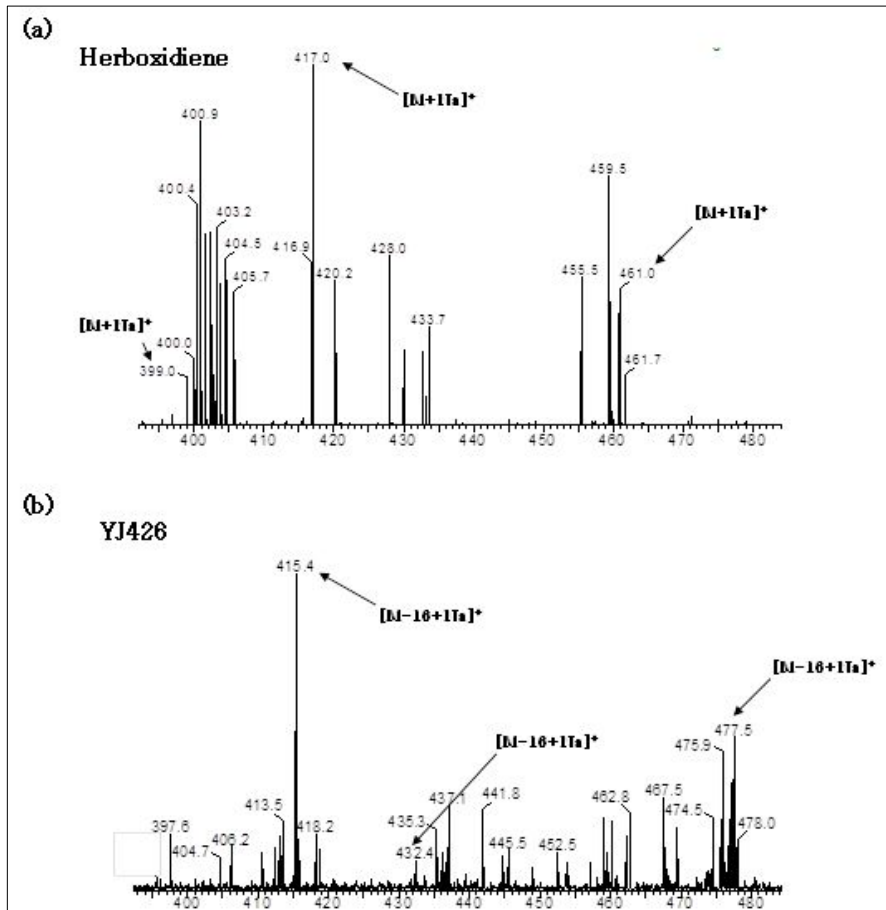


Fig. 47 herboxidiene과 *epoF*가 형질전환된 이중숙주 균주의 배양 추출물의 HPLC-ESI-MS/MS 분석 스펙트럼

- (1) 그림 5의 MS/MS fragmentation pattern을 토대로 허복시디엔의 8번 탄소와 10번 탄소의 이중결합 중 한 곳의 이중결합이 에폭시화 유전자인 *epoF*에 의해 에폭시 고리로 변환된 허복시디엔의 신규 유도체가 생산되는 것으로 사료된다 (Fig. 48).
- (2) 그러나, 신규 유도체로 예상하는 물질이 매우 소량 생산되어 명확한 구조분석을 위한 NMR 분석은 수행하지 못하였음. 이후 생산성 향상을 통하여 NMR분석이 가능할 것으로 사료된다.

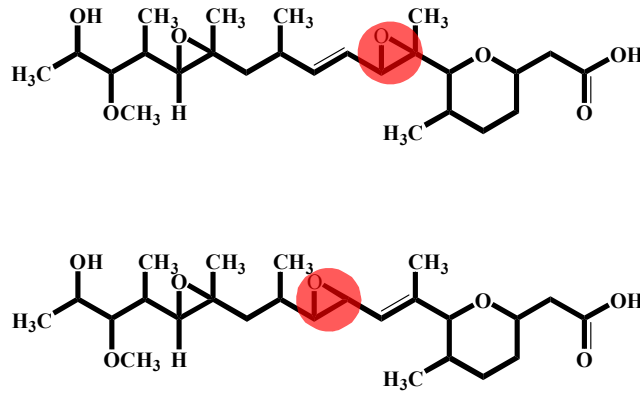


Fig. 48 Herboxidiene의 신규 유도체로 예측되는 구조

8. Herboxidiene 조절유전자의 기능 규명

가. *herA* 유전자의 과발현

Herboxidiene의 생합성 유전자집단의 염기서열 분석을 통하여 1종의 조절유전자 (*herA*)가 있음을 확인하였음 (Fig. 49) [Journal of antibiotics. 1992, 45; 914-921; Applied and Environmental Microbiology. 2012,78(6),2034-2038]. 본 연구에서 미국 국립생물정보센터 (NCBI)에서 염기서열분석 결과, LacI family transcriptional regulator에 속하는 조절유전자로 예측되며 LacI family에 속하는 여러 균주의 유전자와의 단백질 서열의 유사성을 비교한 결과 negative regulator로 작용할 것으로 사료되었다.

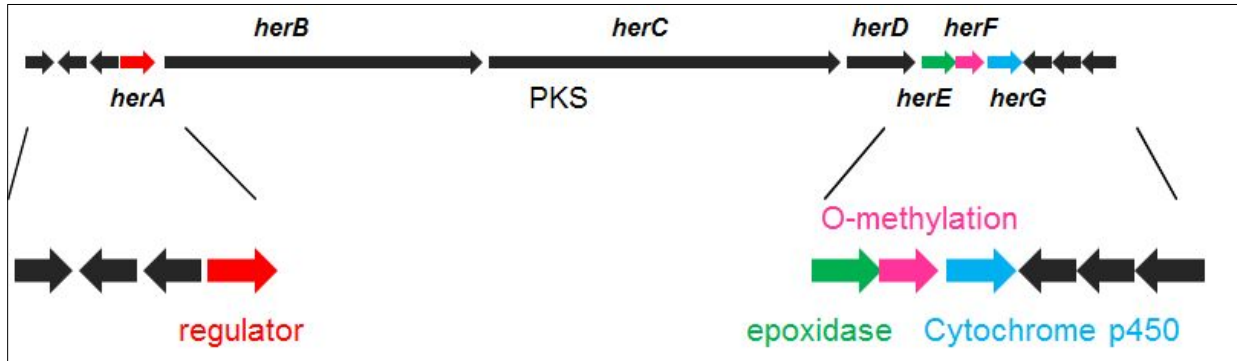


Fig. 49 Herboxidiene 생합성 유전자집단

Herboxidiene의 생합성 조절유전자인 *herA*의 기능을 규명하기 위하여 *S. chromofuscus* A7847에 *herA*를 과발현하였음. pSET152 (*ermE**) 벡터를 이용하였으며, 사용한 배지와 배양조건 및 추출방법은 외래유전자의 도입 시와 같은 방법을 이용하였다.

herboxidiene 생산액체배지와 R2YE 배지에서 *S. chromofuscus* A7847보다 *herA* 과발현 균주에서 *herboxidiene*의 생산량이 현저히 감소하여 HPLC에서는 거의 검출되지 않았다 (Fig. 50).

*herboxidiene*의 생산이 *herA*의 과발현으로 인하여 배양시간에 따라서 생산성의 변화를 일으킬 수 있을 것으로 사료되어 배양시간에 따른 *herboxidiene*의 생산성을 확인하였다 (Fig. 51). *S. chromofuscus* A7847에서

는 6일 동안 배양하였을 때 herboxidiene의 생산성이 가장 높은 것을 확인하였으며, *herA*가 과발현된 균주에서는 배양 5일 이후에 herboxidiene이 생산되지만, *S. chromofuscus* A7847에 비해 약 30 %이상 감소한 것을 확인하였음 (Fig. 51).

이를 통하여 *herA* 유전자가 herboxidiene의 생산에 negative 조절유전자의 역할을 함을 확인하였다.

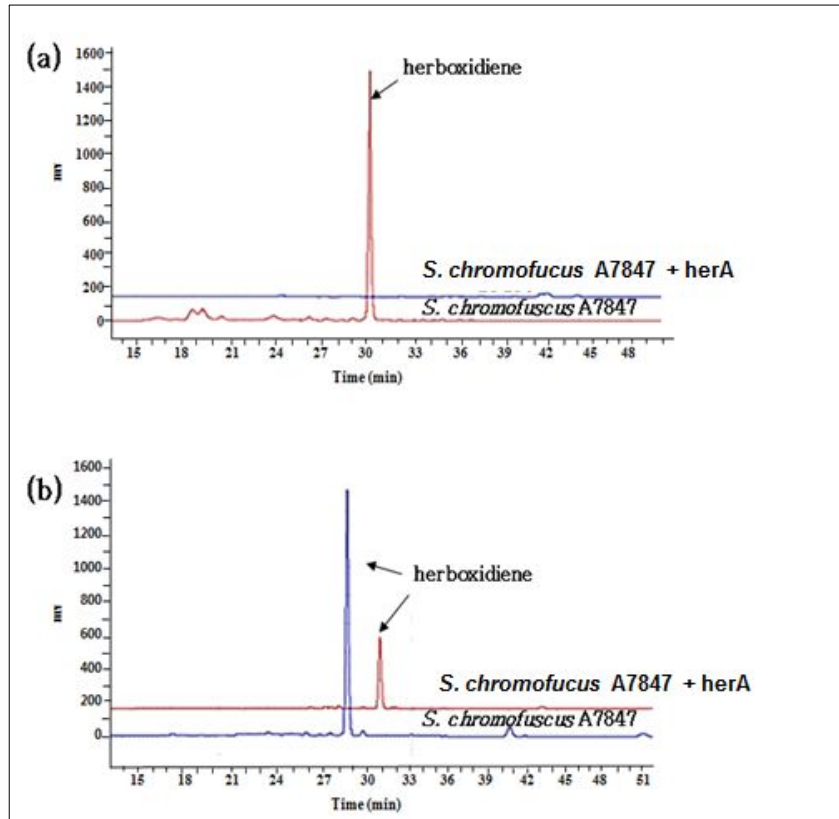


Fig. 50 허복시디엔 생산액체배지와 R2YE 고체배지에서의 *S. chromofuscus* A7847과 *herA* 과발현 균주의 HPLC 크로마토그램

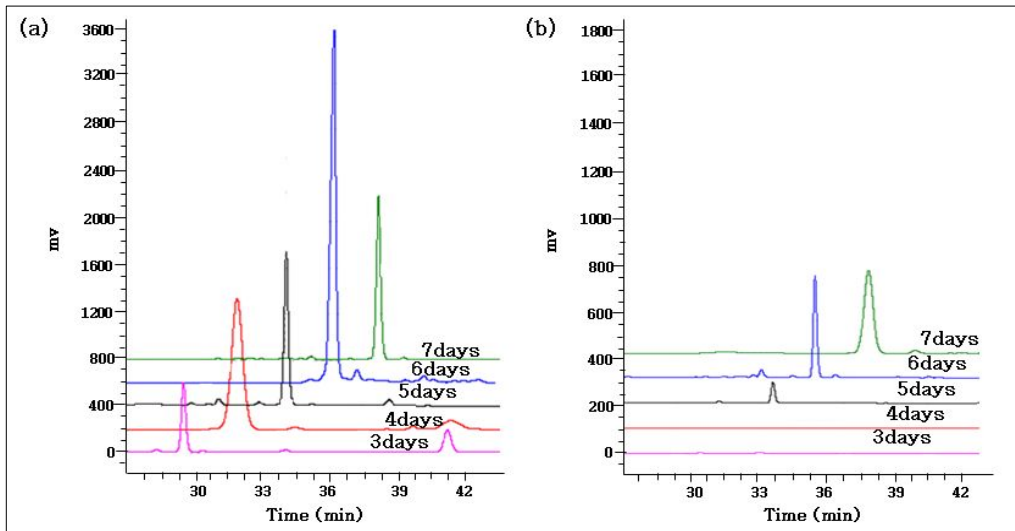


Fig. 51 R2YE 고체배지에서의 (a) *S. chromofuscus* A7847과 (b) *herA* 과발현 균주의 배양시간에 따른 herboxidiene의 생산성 비교 HPLC 크로마토그램

나. *herA* 유전자가 과발현된 균주의 전사체 분석

*herA*의 과발현에 따른 허복시디엔 생합성 유전자집단의 DNA 전사수준 분석을 하였음. *S. chromofuscus* A7847과 *herA* 과발현 균주를 35, 46, 54, 60시간 동안 R2YE 고체배지에서 배양하여 얻은 세포에서 RNA를 추출하여 herboxidiene의 생합성 유전자집단 (*herA*:조절유전자, PKS 유전자 :*herB*, *herC*, *herD*, post-PKS tailoring 유전자:*herE*, *herF*, *herG*)의 DNA 전사수준을 분석하였다 (Fig. 52).

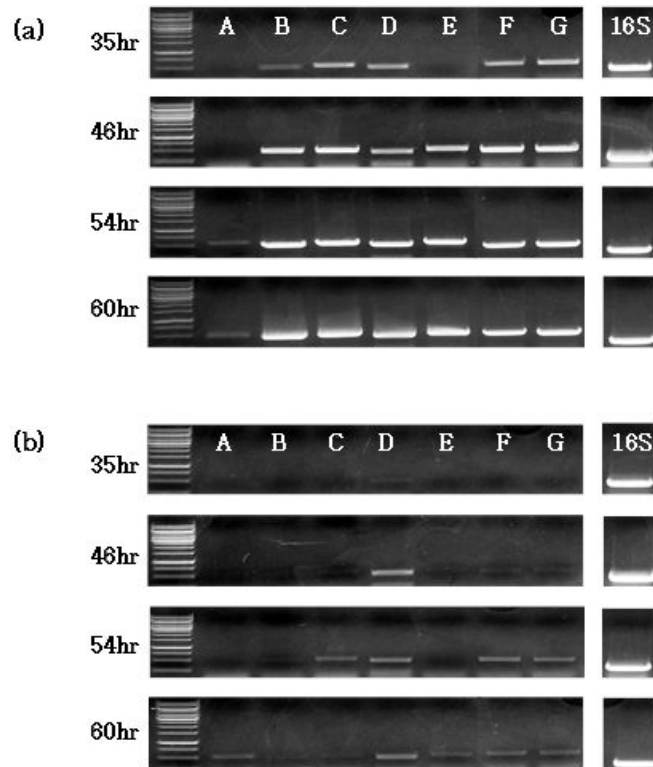


Fig. 52 배양시간에 따른 (a) *S. chromofuscus* A7847과 (b) *herA* 과발현 균주의 DNA 전사 수준 분석

S. chromofuscus A7847에서는 생합성 유전자집단의 전사가 *herA* 과발현 균주보다 매우 높은 수준으로 발현되고 있음을 확인 할 수 있다.

S. chromofuscus A7847에서는 35시간의 *herA*, *herE*를 제외하고는 모든 유전자가 35시간부터 60시간 까지 지속적으로 전사가 일어나고 있음. 이에 반해 *herA* 과발현 균주에서는 35시간에는 모든 유전자의 전사가 일어나지 않았으며, 48시간에는 *herD*만이 발현되고, 54시간에는 *herC*, *herD*, *herF*, *herG*가, 60시간에는 *herD*, *herE*, *herF*, *herG*가 대조군보다 현저히 낮은 수준으로 발현되고 있음을 확인하였다 (Fig. 52).

이를 통해 *herA*가 허복시디엔의 생합성 유전자집단에 negative로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다. 이에 보다 명확한 *herA*의 기능 규명을 위해서는 *herA*유전자의 삭제를 통하여 herboxidiene의 생산성 확인 및 전사체 분석을 수행해야 할 것으로 사료된다.

10. 천연제초제 허복시디엔의 제초 유효 활성 측정

가. 애기장대를 이용한 허복시디엔 최소 활성 농도(MIC) 측정

잡초로 애기장대(*Arabidopsis thaliana* col-0)와 밀(wheat)을 대조군으로 사용하여 각 seed를 멸균 처리하여 MS medium (with vitamin)에 치상하여 배양실 (25°C)에서 5일간 발아시켰다. 초기 배아에서 잎이 3~4개 자란 후, 각 식물을 뿌리가 손상되지 않게 배지에서 분리하여 희석된 허복시디엔에 약 5초간 담근 후, 새로운 MS medium에 치상해 5일간 제초제 효과를 관찰하였다 (Fig. 53).








| 농도 제초제 | 2.26mM | 1.13mM | 500μM | 50μM | 5μM |
|-----------------------|---|---|---|---|---|
| Control (Basta 처리) |  |  |  |  | ND |
| 허복시디엔 처리 | ND | ND |  |  |  |

Fig. 53 미생물 제초제 허복시디엔의 *Arabidopsis*에서의 MIC 측정. ND; Not determined

농도에 따른 허복시디엔의 최소활성농도(Minimum Inhibition Concentration; MIC)를 구하기 위하여 애기장대의 survival test를 수행하였으며, 그 결과 표준 물질 허복시디엔의 MIC는 500μM 정도로 예측되었다 (Fig. 54).

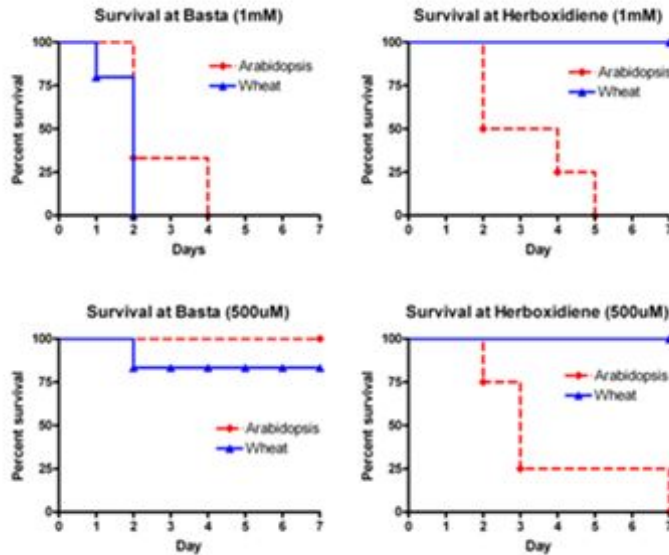


Fig. 54 미생물 천연제초제 허복시디엔에 대한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)와 밀(wheat)의 survival test. 각 20개의 식물 시료를 대상으로 Basta(대조 제초제)와 허복시디엔에 의한 7일간의 생존을 survive test를 수행하였다. 허복시디엔의 애기장대에 대한 median survival은 3일(500 μ M)로 나타났으며 이는 통상 식물형질전환 마커로 사용되는 Basta 제초제에 비해 2배 이상의 제초활성을 보였다. Control로 사용한 밀에서는 알려진 바와 같이 허복시디엔의 제초활성이 나타나지 않았다 (Wideman et al., 1992).

나. 고온 습식 멸균 처리에 의한 천연제초제 허복시디엔의 활성 변화 검증

허복시디엔은 *Streptomyces chromofuscus* A7847 외부로 분비되는 생합성물질이다. 제2협동과제에서는 생균 배양물 자체를 이용한 천연 제초제 실용화를 위하여 생균을 멸균 처리한 용액 자체에서도 허복시디엔의 안정성이 유지되는지 검토하였다. 습식 멸균 조건 (121°C, 15 lb psi.)에서 1시간까지 멸균처리 한 뒤에도 허복시디엔의 활성이 남아 있으므로 이 물질은 열과 압력에 매우 안정되어 생균 배양물 자체를 멸균 처리하여 실용화 가능한 것을 확인하였다 (Fig. 55).

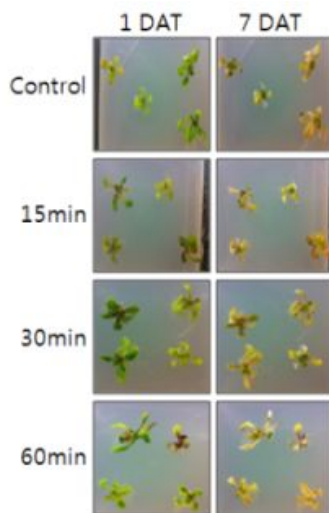


Fig. 55 미생물 천연제초제 허복시디엔의 열 안정성 검증. 허복시디엔을 500 μ M로 물에 희석한 뒤, 통상적인 조건에서 15분에서 1시간까지 서로 다른 시간 동안 autoclave 하여 상온에 충분히 식힌 후 애기장대에 처리하였다. 이후, 허복시디엔의 제초활성을 7일 동안 관찰한 결과 autoclave 하지 않은 경우와 동일 활성을 보였다. DAT; Day after treatment

다. 전착제 사용에 의한 천연제초제 허복시디엔의 활성 변화 검증

일반적으로 경엽처리되는 제초제는 전착제를 사용하여 잎 표면에 잔류 농도를 높이는 것이 제초효과를 높이므로 허복시디엔의 실용화를 위하여 전착제와의 상호교환이 가능한지 검증하였다. 시중에서 통상적으로 많이 사용되는 전착제 4종에 대하여 이 전착제와 혼용하였을 때 허복시디엔의 활성을 검증하였다. 각 전착제 제조회사의 희석비율에 따라 허복시디엔 농축액을 희석하여 최종 허복시디엔 유효 농도를 맞추어 애기장대를 대상으로 기내 상태의 제초활성을 관찰 하였다. 그 결과, Paraffin을 유효성분으로 하는 케어스 유탁제를 제외한 다른 전착제와 혼용한 경우 모두 허복시디엔의 제초 활성이 약 5배 낮은 농도에서도 나타나는 것이 확인되었다 (Fig. 56). 따라서 허복시디엔은 통상적인 전착제를 사용하여도 활성이 감소하지 않을 뿐만 아니라, 전착제와 혼입 후 더 적은 양을 현장에 살포하여도 동일한 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다. 이들 기존의 전착제들은 Sulfonate 계열의 성분을 포함하는 것인데, 허복시디엔의 활성을 크게 높여주는 것을 보아 앞으로 실용화를 위한 천연 미생물 제초제 제형 제작에 가장 적합한 성분은 alkylated sulfonate 계열의 화합물로 추정된다.

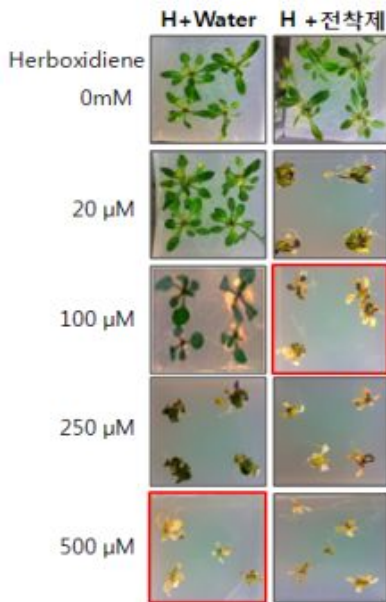


Fig. 56 미생물 천연제초제 허복시디엔의 전착제에 의한 제초활성 증가 검증. 전착제 동부카바를 사용한 경우의 제초활성. 허복시디엔만 처리한 경우 500 μ M이상에서 효과가 나타났지만 전착제와 함께 처리한 경우 100 μ M에서도 제초효과가 나타났다. (빨간 테두리). H, Herboxidien

라. 수도작물 벼에 대한 천연제초제 허복시디엔의 활성 검증

그림 x에서 보인 것처럼 밀(wheat)에 대한 허복시디엔의 약해가 없으므로 밀을 재배하는 밭의 경우, 이 제초제가 유용한 것으로 판명되었다. 이후 국내 농업환경에서 실용화하기 위하여 주식인 벼에 대한 허복시디엔의 제초활성을 검증하였다. 그 결과, 기내배양 한 벼에 대하여 허복시디엔은 애기장대에 대응하는 제초활성을 가지고 있어서 벼의 정상적인 생육을 억제한다. 따라서 허복시디엔은 천연 상태의 물질로 수도작물인 벼에 살포할 수 없고 실용화를 위하여 유도체의 변성에 의한 특성을 추가로 검토할 필요가 있다 (Fig. 57).

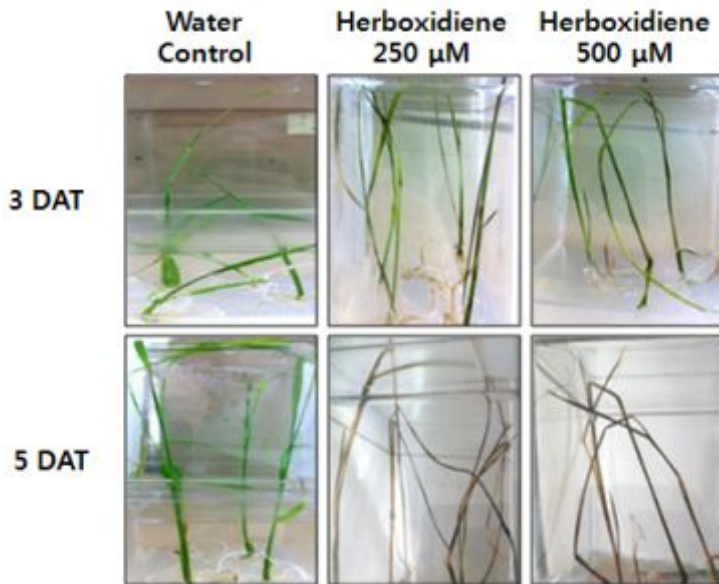


Fig. 57 미생물 천연제초제 허복시디엔의 벼에 대한 내제성 제초활성. 동진벼를 기내 배양하여 여기에 허복시디엔을 경엽처리 한 뒤 5일간 관찰하였다. DAT, Day after treatment

마. 천연제초제 허복시디엔의 종자발아억제 활성 검증

제초제는 잎에 작용하는 경우와 별도로 토양에 침투하여 뿌리를 경유하여 작용하는 경우가 있으므로 허복시디엔의 토양침투체로서의 활성을 예측하기 위하여 벼와 애기장대 종자의 발아시험을 수행하였다. 허복시디엔 2000, 1000 및 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도에서는 애기장대 종자와 벼 종자의 발아는 완전히 억제되었고, 250 및 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도에서는 각각 18.3% 및 53.3%로 나타나 애기장대 종자 발아억제효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 250 및 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도에서도 애기장대 종자 중 일부는 발아가 되었지만 발아 후 생육이 억제되는 것도 확인하였다 (Fig. 58, Table 12). 따라서 허복시디엔은 실용화 제제가 만들어지면 환경에서 잔류 활성을 가지고 토양에 침투하여 잡초를 제어할 수 있다고 판단된다.

Table 12. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 허복시디엔 존재하에서의 발아율과 성장 억제율

| Conc.($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Germination rate(%) ¹⁾ | Growth inhibition after germination(%) ²⁾ |
|--------------------------------|-----------------------------------|--|
| 0 | 93.3 \pm 2.89 | - |
| 125 | 53.3 \pm 5.77 | 56.7 \pm 5.77 |
| 250 | 18.3 \pm 2.89 | 93.3 \pm 2.89 |
| 500 | 0 \pm 0 | 100 \pm 0 |
| 1000 | 0 \pm 0 | 100 \pm 0 |
| 2000 | 0 \pm 0 | 100 \pm 0 |

¹⁾Germination rate of *A. thaliana* seeds at 7 days after application.

²⁾Growth inhibition represents by visual efficacy ranges from 0 (no control) to 100 (complete inhibition).

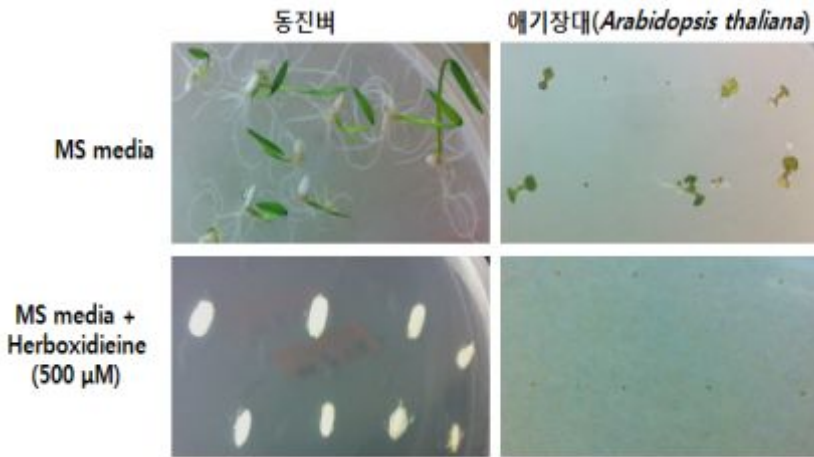


Fig. 58 미생물 천연제초제 허복시디엔의 종자발아 억제 시험. 7일 경과 후에도 허복시디엔이 존재하는 배지에서는 종자가 발아되지 않았다.

바. 국내 주요 유해 잡초에 대한 천연제초제 허복시디엔의 경엽처리 활성 검증

국내에 많이 존재하고 문제를 일으키는 잡초에 대하여 허복시디엔이 가진 제초활성을 기내(*in vitro*)가 아닌 실제 온실의 포트 배양 상태에서 약해 기준표 (효과없음; 0, 완전방제; 100)에 의해 달관 조사하였다 (표 x). 대부분의 잡초에서 허복시디엔 약제처리 1일 후부터 외형적인 증상이 발현되어 매우 속효성인 특징을 보이며, 접촉형 제초활성(contact herbicidal efficacy)을 나타내었고 주된 증상은 고사(burndown)로 나타났다. 화본과와 광엽잡초 종간 감수성 차이는 관찰되지 않았다. $4,000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 처리수준에서는 약제처리 기간이 경과함에 따라 살초력도 증가되어 나타났는데, 약제처리 4일째에 수수, 돌피, 바랭이, 까마중, 자귀풀, 어저귀 및 도꼬마리의 살초력은 각각 95, 95, 95, 100, 95, 70 및 90%이었는데, 7일 후에는 어저귀를 제외한 시험대상 모든 초종에서 완전방제(100%)됨. 반면 2,000 및 $1,000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도에서는 살초력이 다소 감소하였으며, $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 이하 농도에서는 살초력이 현저하게 감소하였다. 또한, 약제처리 7일 이후에는 $4,000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도를 제외한 전 처리 농도범위에서 재생(recovery)되어 약효 지속기간은 짧은 것으로 판단된다 (Fig. 59). 이상의 결과로부터 천연 상태의 허복시디엔을 실용화 할 경우 속효성의 접촉형 제초활성 특성과 잡초 종간 감수성 차이가 없는 비선택적 활성을 발현할 것으로 예상된다. 기내 *in vitro* 검증에서 측정된 허복시디엔 유효농도 MIC는 온실 환경에서 재현되지 않았다. 이는 기내 배양은 주위 환경으로 유효성분이 희석되지 않는 반면, 온실에서는 식물에 접촉하는 실제 유효농도가 희석되기 때문으로 판단된다. 실제로 온실에서 활성이 뚜렷한 약 $4,000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도는 기내 배양에서 측정된 값에 비하여 약 8배 높은 농도이므로, 향후 노지와 온실에서 허복시디엔 제초활성을 높일 수 있는 진전단계 유도체 실험이 필요할 것이다.

Table 13. 온실 환경에서 살포한 허복시디엔의 잡초제어 효율

| Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | DAT ¹⁾ | Herbicidal efficacy(%) ²⁾ | | | | | | |
|------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | SORBI | ECHCG | DIGSA | SOLNI | AESIN | ABUTH | XANSI |
| 4000 | 4 | 95 | 95 | 95 | 100 | 95 | 70 | 90 |
| | 7 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 70 | 100 |
| 2000 | 4 | 70 | 90 | 90 | 100 | 95 | 50 | 90 |
| | 7 | 80 | 95 | 95 | 100 | 95 | 70 | 90 |
| 1000 | 4 | 50 | 60 | 80 | 50 | 80 | 30 | 80 |
| | 7 | 50 | 70 | 90 | 50 | 80 | 40 | 80 |
| 500 | 4 | 30 | 30 | 50 | 0 | 50 | 10 | 20 |
| | 7 | 30 | 30 | 40 | 0 | 40 | 0 | 0 |
| 250 | 4 | 20 | 20 | 20 | 0 | 40 | 0 | 0 |
| | 7 | 10 | 10 | 20 | 0 | 40 | 0 | 0 |
| 125 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

¹⁾DAT : Days after treatment.

²⁾Herbicidal efficacy was determined 4 and 7 days after treatment by visual injury.

Abbreviation: SORBI(수수, 벼과 또는 화분과), *Sorghum bicolor*; ECHCG(돌피, 벼과), *Echinochloa crusgalli*; DIGSA(바랭이, 벼과), *Digitaria sanguinalis*; SOLNI(까마중, 가지과), *Solanum nigrum*; AESIN(자귀풀, 콩과), *Aeschynomene indica*; ABUTH(어저귀, 삼과), *Abutilon avicennae*; XANSI(도꼬마리), *Xanthium strumarium*.



<허복시디엔 무처리 잡초과종지도>

Fig. 59 중요 잡초에 대한 허복시디엔 온실 제초 활성 검증. 허복시디엔 살포 7일 후 어저리를 제외한 모든 잡초에 살초력을 나타내었다.



허복시디엔 $4,000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$



$2,000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$



$1,000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$



$500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

사. 국내 주요 밭 작물에 대한 천연제초제 허복시디엔의 경엽처리 약해 검증

허복시디엔은 밀에 대한 약해는 없는 반면 국내 주식인 벼에 대하여는 약해를 입히는 것으로 나타났다. 따라서 주식인 벼 이외의 여러 주요 밭작물들에 대한 약해효과를 검토하였다. 선택한 주요 밭작물은 배추, 고추, 김장무, 마늘, 파(양파)의 5종이다. 이들 작물은 국내 주요 밭작물이며 잡초에 의한 농경지 침해로 생산성이 감소할 여지가 높은 편이다.

각 밭작물은 파종 후 잎이 4~5개 나온 유모에 허복시디엔을 서로 다른 농도로 처리하여 5일 단위로 달관하면서 약해를 검증하였다. 그 결과, 배추의 경우 1,000ppm의 농도에서부터 뚜렷한 약해를 보이기 시작하면서 4,000ppm 농도에서는 작물들이 고사하였다 (Fig. 60).



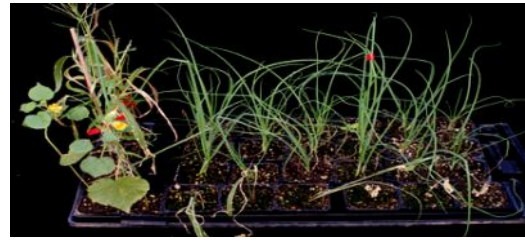
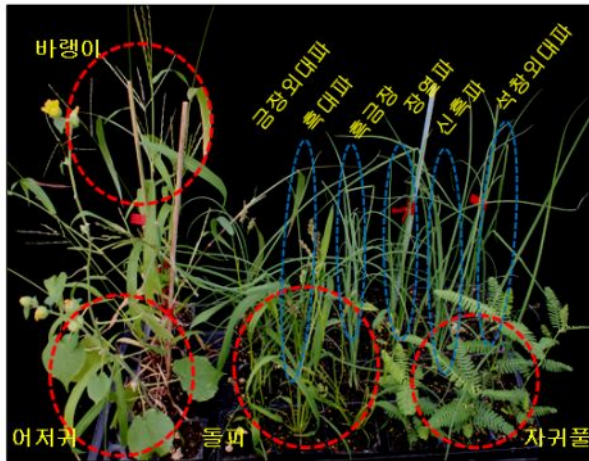
Fig. 60 배추에 대한 허복시디엔 약해 검증. 1,000ppm의 농도에서부터 약해를 보였으며 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서는 5일이 경과한 후 약해를 극복하였다.

무와 고추의 경우에도 배추와 유사한 약해를 보였으나, 좀 더 높은 농도의 허복시디엔을 사용하여야 배추에서와 같은 효과를 나타내었다. 반면 파의 경우에는 4,000ppm의 농도에서도 전혀 약해를 보이지 않는 특징을 보여주었다 (Fig. 61).

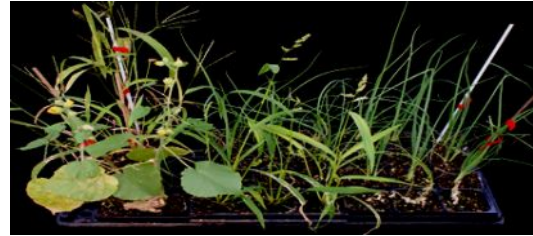


Fig. 61 주요 밭작물에 대한 허복시디엔 약해 검증. 허복시디엔 4,000ppm에서 파를 제외하고 고추, 김장무, 약해를 입는 것을 보여준다.

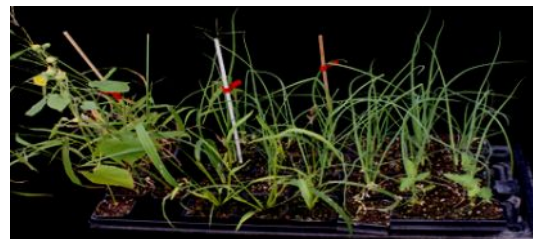
허복시디엔에 약해를 입지 않는 것으로 밝혀진 파에 대하여 국내에서 실제로 재배되는 종자들에 대하여 확증 실험을 수행하였다. 시중에서 구매할 수 있는 8개 국내산, 수입산 파를 파종하여 파의 길이가 최소 15cm 이상 성장한 후, 허복시디엔을 경엽 처리하였다. 그 결과, 시중에 있는 모든 중요 산업용 파들이 허복시디엔은 약해를 입지 않았다 (Fig. 62).



허복시디엔 4,000ppm



허복시디엔 2,000ppm



허복시디엔 1,000ppm

Fig. 62 주요 파에 대한 허복시디엔 약해 검증. 허복시디엔 4,000ppm에서 잡초는 약해를 받는 반면 6종의 파는 약해를 입지 않았다.

제초제의 경우 성장단계별로 영향을 주는 방식이 다를 수 있으므로, 파의 성장단계별로 허복시디엔이 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알기위하여 파를 유모가 아닌 수확단계까지 성숙 시키면서 각 단계별로 허복시디엔 처리를 하면서 파의 성장이 허복시디엔에 의하여 억제되는지 검토하였다. 그 결과, 석창외대파와 흑대파를 제외한 파들은 허복시디엔에 의하여 성장이 크게 억제되지 않았다 (Fig. 63).

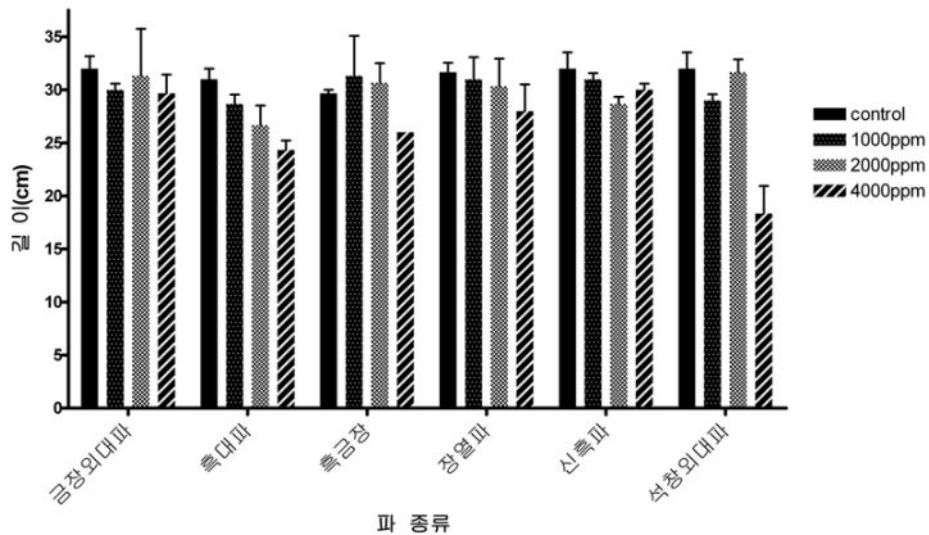


Fig 63. 허복시디엔에 의한 파의 성장장애 검증. 6종의 파들에 대하여 각각 서로 다른 농도의 허복시디엔을 처리하여 15일 후 파의 성장 길이를 재었다. 허복시디엔 2,000ppm에서는 모든 파의 성장이 정상이었으며, 석창외대파, 흑금장과 흑대파는 약 20~50% 정도의 성장 억제를 보였다.

국내 재배 마늘(의성마늘)을 파종하여 성장시키면서 각 단계별로 허복시디엔 약해 검증을 수행한 결과 파와 마찬가지로 거의 성장억제를 보이지 않았다 (Fig. 64). 이상의 결과를 종합하면, 미생물 천연제조제 허복시디엔은 파와 마늘의 발작물 제조에 유용하게 이용할 수 있다는 것을 알 수 있다.

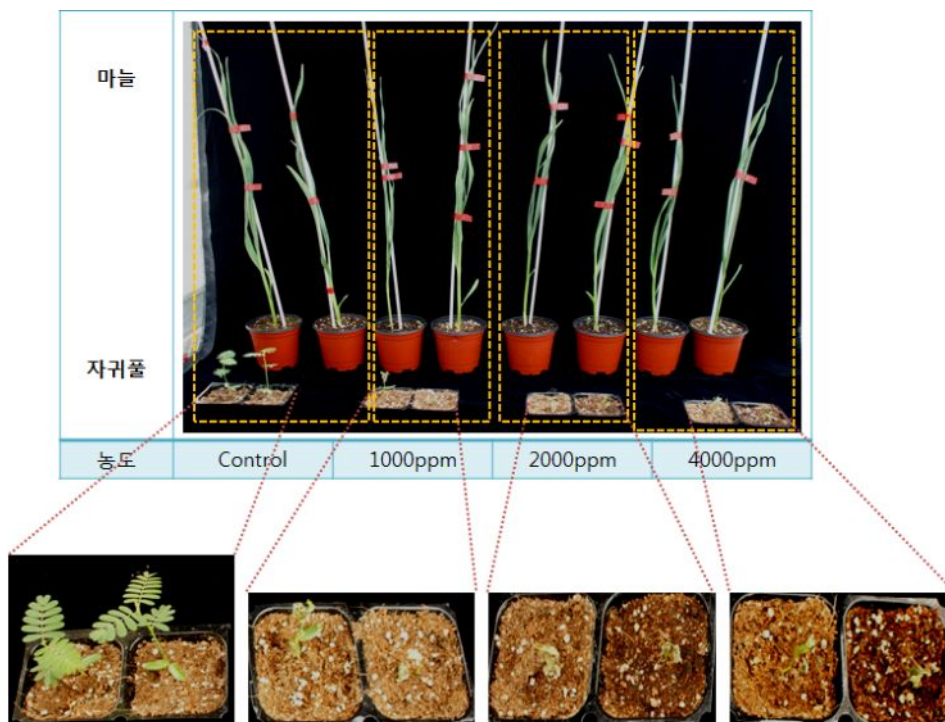


Fig. 64 허복시디엔에 의한 마늘의 성장장애 검증. 마늘에 서로 다른 농도의 허복시디엔을 처리하여 성장억제와 약해를 검증하였다. Control 자귀풀은 허복시디엔에 의하여 괴사하였으나, 마늘은 영향을 받지 않았다.

11. 천연제초제 허복시디엔 유도체 제작을 위한 토착 원천 에스테라아제 확보

가. 메타게놈 유전자은행 스크리닝 및 클로닝

천연 미생물 제초제 허복시디엔의 화학 구조에 에스테르 그룹이 존재하므로 이 부위에 대한 변환된 유도체를 형성 시도하고자 하였다. 이를 위하여 기존에 밝혀진 에스테라아제가 아닌 국내 고유의 메타게놈 유전자원에서 개발한 신규 원천 에스테라아제를 사용하는 것이 차후의 원천 기술 개발에 중요한 선결과제로 판단하였다. 신규 원천 에스테라아제는 국내 토착 미생물 메타게놈을 스크리닝 하여 검출하였다 (Fig. 65).

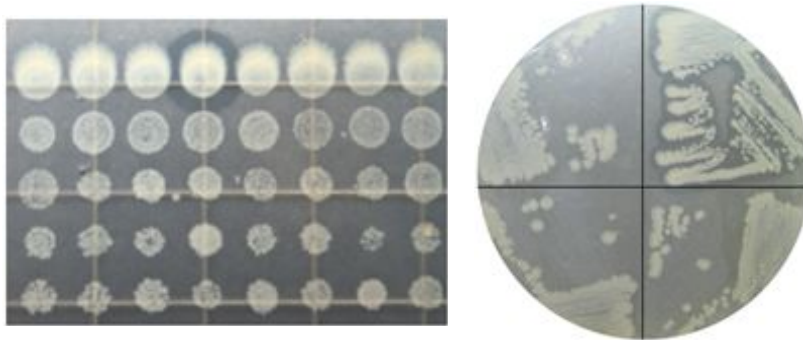


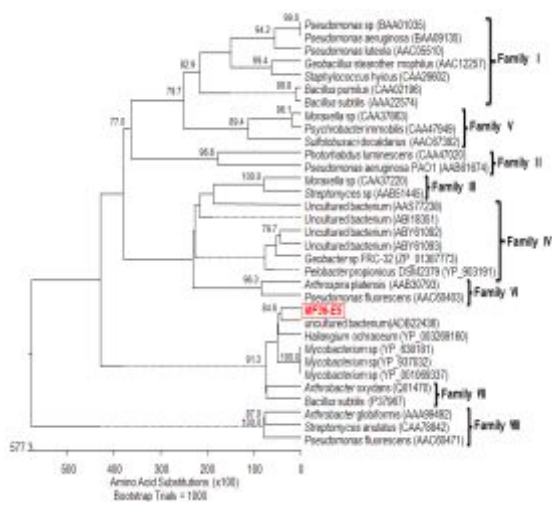
Fig 65. 유지성분 분해 esterase 메타게놈 클론 선별. Tributyrin 1%가 포함된 배지에서 투명환을 형성하는 클론을 4-fold multiplex(좌) 와 master plate(우)에서 재확인하였다.

이후 양성반응을 보인 fosmid 클론들을 대상으로 shot-gun random library를 제작하여 LB/Kan/Tributyrin 배지에서 양성을 보인 shotgun 클론들에서 pUC-universal primer와 BigDye system을 사용하여 contig 염기서열을 분석하고, VectorNTI 프로그램을 통하여 가수분해 효소 역할을 수행하는 33개의 ORF를 검출하였다.

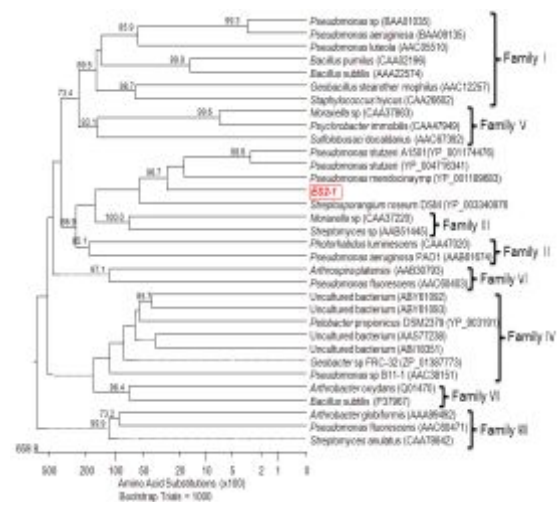
나. 에스테라아제 유전자 분석 및 대장균 이중발현

33종의 esterase-candidate 가운데 특히 지방 분해 기능이 우수한 4종 메타게놈 클론의 염기서열을 확보하여 phylogenetic 분석을 통하여 신규성을 검토하였다. 그 결과 각 4종 모두 기존에 알려지지 않은 새로운 family의 esterase인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 66).

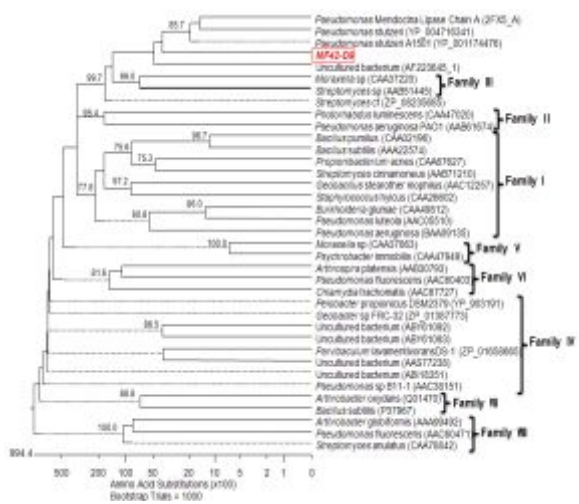
(A)



(B)



(C)



(D)

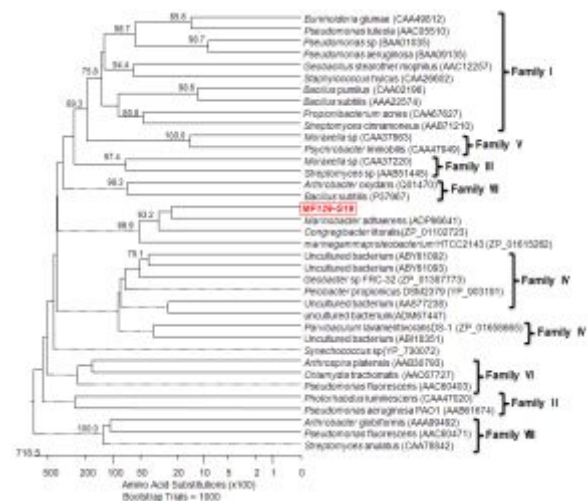


Fig. 66 독도 심해토 메타게놈에서 유래한 신규 4종 esterase들의 phylogenetic tree. 기존의 esterase family들과 비교하여 MF36-E5(A), ES2-1(B), MF42-D9(C), MF129-G19(D) 유전자는 새로운 family에 속하는 것으로 밝혀졌다. Bootstrap trial = 1000.

신규의 에스테라아제의 가능성이 높은 유전자를 대장균에 클로닝하여 단백질로 발현 시켜 본 결과, 3종의 단백질은 inclusion body를 형성하고 1종의 단백질만이 soluble 하였다 (Fig. 67).

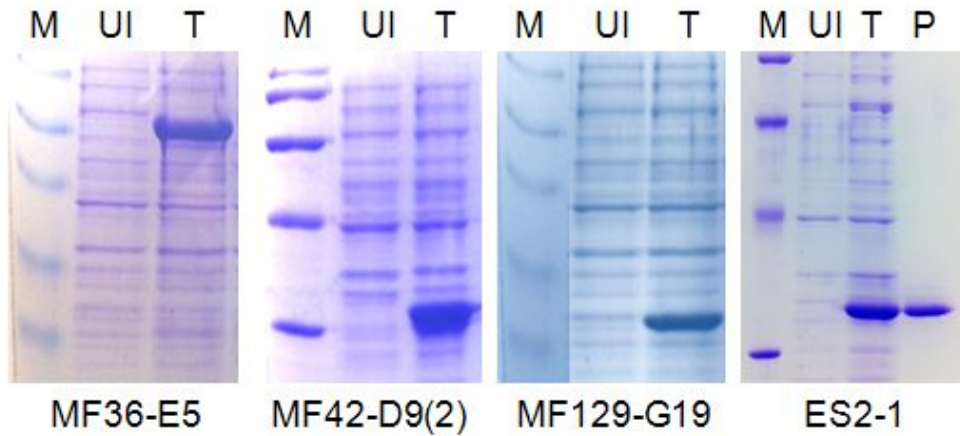


Fig. 67 메타게놈에서 분리한 에스테라아제의 단백질 이중발현. 각각의 에스테라아제 ORF 단백질이 발현되었으나 insoluble protein이 많았다. ES2-1은 solubilization 과정을 거쳐서 순수 분리하였다. 발현된 단백질은 MF36-E3, 59.4kDa; MF42-D9(2), 29.9kDa; MF129-G19, 28.1kDa; ES2-1, 29.9kDa로 예상한 크기와 일치하였다. Lanes UI, Uninduced total protein; T, Induced total protein; P, His-tag purified protein

다. 신규 에스테라아제 ES2-1의 생화학적 특성분석

신규 에스테라아제 4종 가운데 soluble fraction을 분리한 ES2-1 단백질에 대한 생화학적 특성을 분석하여 실제 이 단백질이 유용한 에스테라아제 인지를 확인하였다. Zymogram을 통한 esterase 기능을 확인하였다 (Fig. 68).

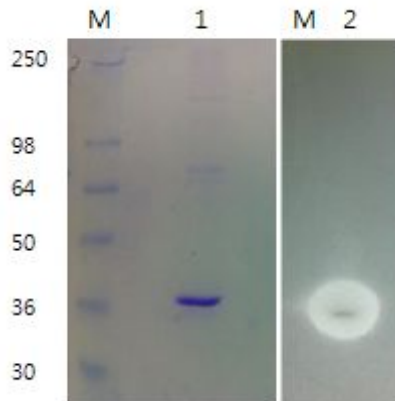


Fig. 68 신규 에스테라아제 ES2-1의 zymogram 분석. M, protein size marker.

ES2-1은 substrate는 pNPC4에서 가장 좋은 활성을 나타내는 에스테라아제였으며, 반응온도 30°C와 pH8.5에서 최적활성을 보여 주었다. 특이한 점은 이 에스테라아제는 저온(0°C)에서도 상당히 높은 50% 이상의 활성을 유지하고 있는 cold-active 효소였다. 이는 생전환(bioconversion)의 유도체 합성 반응을 낮은 실온에서도 충분히 할 수 있다는 장점을 가진다고 할 수 있다 (Fig. 68-70).

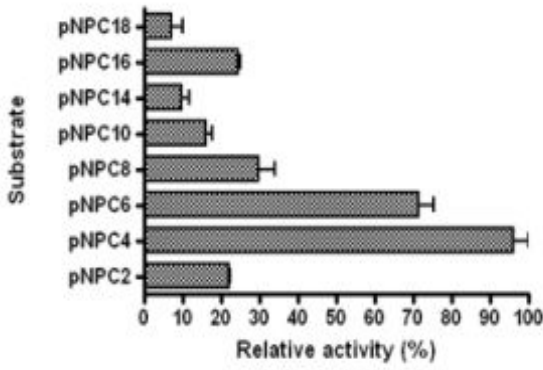


Fig. 69 효소 ES2-1의 기질에 대한 상대적 활성 차이. 사용된 기질(substrate); *p*-Nitrophenyl acetate (*p*NPC2), *p*-Nitrophenyl butyrate (*p*NPC4), *p*-Nitrophenyl hexanoate (*p*NPC6), *p*-Nitrophenyl octanoate (*p*NPC8), *p*-Nitrophenyl decanoate (*p*NPC10), *p*-Nitrophenyl myristate (*p*NPC14), *p*-Nitrophenyl palmitate (*p*NPC16), *p*-Nitrophenyl stearate (*p*NPC18)

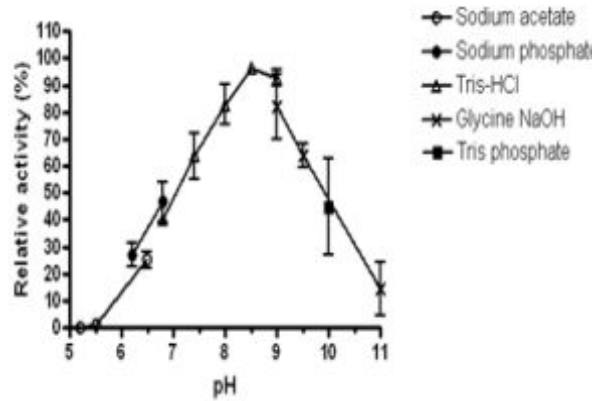
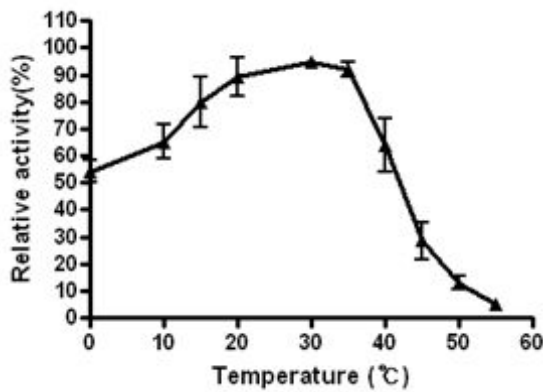


Fig. 70 효소 ES2-1의 온도와 pH에 대한 activity 변화 확인. 최적 pH를 찾기위하여 50mM Na-acetate buffer (pH4.0~6.0), 50mM Na-phosphate buffer (pH6.0~7.5), 50mM TrisCl buffer (pH7.5~10.5), 50mM TrisPhosphate buffer (pH10), Glycine NaOH buffer (pH11.0)을 이용하여 활성을 측정하였다.

동역학적인 효소 활성을 검토한 결과, ES2-1의 pNPC4에 대한 K_m 은 1.128mM이며 V_{max} 은 33.6 μ mol/min/mg로 나타났다 (Table 14, Fig. 71).

Table 14. 에스테라아제 ES2-1의 기질별 specific activity

| Substrate | Specific activity ^a (Umg ⁻¹) |
|---------------------------------------|--|
| <i>p</i> -Nitrophenyl acetate (C2) | 5.30±0.38 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl butyrate(C4) | 28.54±0.84 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl hexanoate (C6) | 18.34±0.46 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl octanoate (C8) | 6.22±0.19 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl decanoate (C10) | 4.6±0.29 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl laurate (C12) | 5.07±0.75 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl myristate (C14) | ND ^b |
| <i>p</i> -Nitrophenyl palmitate (C16) | 1.32±0.18 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl stearate (C18) | 2.12±0.28 |

^aOne unit of enzyme activity는 30℃에서 분당 1μmol의 *p*-nitrophenol 생성량

^bND, Not Detected

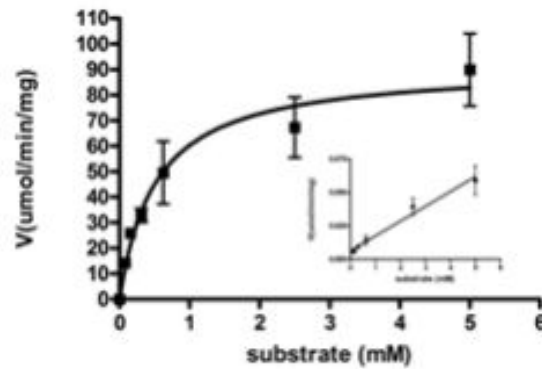


Fig. 71 효소 ES2-1의 기질에 대한 동역학적 분석. 50mM TrisCl buffer (pH8.5)에서 62.5~500μM pNPC4에서 효소 0.12μg을 사용하여 30℃에서 5분간 반응 후, 2M acetone 100μl로 반응을 종료시켰다. 이후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

| 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|--|--|---------|---|
| 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 고생산성 균주 및 공정 개발 | 배지 최적화에 의한 herboxidiene 생산성 증가 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 기존 배지는 54.89 mg/L herboxidiene이 생산carbon source (Corn starch, maltose, glycerol 및 sucrose)carbon source최적화 배지 nitrogen source (peptome, ProFlo, triptone soybean flour)에 배양하여 생산성 최적화. ● carbon/nitrogen 최적화에 따라 200.2-744.6 mg/L이 생산 증가. ● 최적화된 배지 media No 6A외 경우 약 13.5가 증가된 744.6 mg/L의 생산성 증가 |
| | 최적화된 배지에 시간에 따른 균체량 (dry mass)과 pH를 측정 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 균체는 20 hr 간격으로 0 - 120시간동안 측정한 결과 4.5mg, 47mg, 57mg, 57.2mg, 33.4mg 및 32.1mg으로 60-80시간에 균체 양이 가장 높으며, pH는 7.2, 6.93, 6.54, 6.36, 6.30, and 6.42로 약간 산성으로 변함 |
| | Feeding에 의한 생산성 증가 최적화 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● Glycerol과 ProFlo 2.5%-0.125%을 30시간 배양 후 feeding 하였을 경우 herboxidiene 생산성이 가장 높으며, 1087 mg/L 생산 ● 기존배지 비교 총 19.8배의 생산성 증가. |
| | 유전공학에 의한 생산성 증가 균주 개발 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● Malony-CoA 생합성 유전자 발현할 수 있는 pACC152 재조합 ● Methylmalony-CoA 생합성 유전자 발현할 수 있는 pPCC152 재조합 ● pACC152에 조절기작 유전자인 afsR 및 metK1 유전자를 재조합된 pASA152 및 pPSA152 ● 재조합된 pACC152, pASA152, pSAM152, pAfsR152 및 pSA152 S. chromofurus 균주에 전이하여 각각 S. chromofurus ACC152, S. chromofurus ASA152, S. chromofurus ASM152, S. chromofucus AFSR152 및 S. chromofurus SAI152 균주를 제작. |

| 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|--|--|---------|---|
| 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 고생산성 균주 및 공정 개발 | 유전공학에 의한 생산성 증가 균주 개발 | | <ul style="list-style-type: none"> ● S. chromofurus 비교, S. chromofuscus SIBR내에서 1.32배까지(0.976 g/L) 증가 ● S. chromofuscus AFS는 1.7배 (1.258 g/L)증가 ● S. chromofuscus GIBR은 3.85배(2.849 g/L) 증가 ● S. chromofuscus SAM, S. chromofuscus IBR25, S. chromofuscus ACC, S. chromofuscus ASA 및 S. chromofuscus AS에서는 약간 증가. |
| 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 생합성 유전자 확보 및 유도체 개발 | Herboxidiene 생합성 유전자 확보 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● S. chromofuscus genome 분석 ● Herboxidiene 생합성 유전자 확보 및 분석 ● Herboxidiene 생합성과정 분석 |
| | Herboxidiene glycoside 유도체 개발 및 생산 균주 개발 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● in vitro에 의한 Glucosyl-herboxidiene의 합성 ● Galacosyl-herboxidiene의 합성 ● pSET152 galU 및 yjiC를 재조합한 pGYIBR을 재조합 ● 전이하여 S. chromofuscus GYIBR 균주 제작 ● mass 분석한 결과 herboxidiene glycoside로 생산 확인 |
| | Herboxidiene 추출과 분석방법의 정립 | 100% | <ul style="list-style-type: none"> ● 신규 유도체 검출을 위한 시료의 전처리 과정과 HPLC 및 LC-MS 분석방법의 정립 |
| | Herboxidiene 야생생산균주로부터 신규 유도체 개발 | 100% | <ul style="list-style-type: none"> ● 신규 유도체 생산을 위한 외래 유전자 (<i>monCI</i>:epoxidase, <i>eryF</i>:hydroxylase)를 도입하여 균주를 제작함. ● 유전자 조작을 위한 E. coli 균주로 DH5α, JM110, ET12567을 이용하여 형질전환 균주를 제작함. ● 균주 배양 시 herboxidiene 생산 액체배지와 R2YE 고체배지에서 각각 배양하여 추출하였고, 신규유도체의 생산여부를 ESI-LC/MS를 이용하여 분석하였음. ● 신규유도체로 사료되나 매우 소량 생산되어 NMR 분석을 통한 명확한 구조 분석은 실시하지 못하였음. |

| 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|--|--|---------|--|
| 친환경 미생물제조제 herboxidiene의 생합성 유전자 확보 및 유도체 개발 | <i>Streptomyces venezuelae</i> 이종숙주로부터 신규 유도체 개발 | 100% | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>Streptomyces venezuelae</i>를 이종숙주로 이용하여 P450외 외래 유전자 (<i>monCI</i>:epoxidase, <i>eryF</i>:hydroxylase, <i>pikC</i>: hydroxylase, <i>oleP</i>:oxidase, <i>epoF</i>:epoxidase)를 도입하여 신규 유도체를 생산 하고자 하였음. ● 이종숙주내에서의 유전자의 안정적인 발현과 효과적인 발현을 위하여 pSET152 벡터와 pSE34 벡터를 모두 이용하였음. ● 신규 유도체 생산을 위한 herboxidiene feeding 실험 방법을 확립함. ● 신규유도체 생산 여부를 HPLC와 ESI-LC/MS를 이용하여 분석하였음. ● 신규유도체로 사료되나 매우 소량 생산되어 NMR 분석을 통한 명확한 구조 분석은 실시하지 못하였음. |
| | Herboxidiene 조절 유전자의 기능 규명 | 100% | <ul style="list-style-type: none"> ● 염기서열 분석을 통하여 <i>herA</i> 조절유전자가 negative 조절유전자일 것으로 예측함. ● <i>herA</i> 과발현 균주를 제작하여 herboxidiene의 생산성 확인결과 야생생산균주보다 현저히 생산성이 낮아짐을 확인함. ● <i>herA</i> 과발현 균주의 전사체 분석을 통하여 <i>herA</i>가 herboxidiene의 생합성 과정에서 negative 조절 유전자의 역할을 함을 규명함. |
| 토착 미생물 메타게놈을 이용한 고효성 천연 제조제 herboxidiene 유도체 생산 및 제형개발 | 허복시디엔 천연 제조제 기초 농업활성 측정 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 애기장대 <i>in vitro</i> 제조활성 검증 및 MIC 측정 ● 잡초 8종에 대한 제조활성 확인 ● 벼와 밀에 대한 위해성 확인 |
| | 실용화를 위한 허복시디엔의 작물별 성장 저해확인 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 국내 주요 발작물 5종(배추, 파, 김장무, 고추, 마늘)에 대한 허복시디엔 위해성 확인 ● 허복시디엔 제조제 작물별 유효 활성 농도 측정 |
| | 허복시디엔을 이용한 미생물 제조제 제형 실용화 연구 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 전착제 혼입을 통한 허복시디엔 제조활성 증진 확인 ● 기존의 Sulfonate 성분 포함 전착제 (동부카바와 동방전착제)가 효율적 허복시디엔 제형개발에 가장 적합함을 확인 |

| 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|--|--|---------|--|
| 토착 미생물 메타게놈을 이용한 고효성 천연 제초제 herboxidiene 유도체 생산 및 제형개발 | 고효성 허복시디엔 유도체 생산에 관계된 신규 에스테라아제 유전자 대량확보, 단백질 발현 및 효소활성 측정 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 국내 고유 토착 미생물 메타게놈 유전자은행 스크리닝 (독도 심해 퇴적토 메타게놈 유전자은행, 42,662클론, 평균 ~35kb insert) ● Tributyrin 가수분해 Esterase / Lipase 등 33종 확보, 염기서열 분석, ORF 확인, 신규성 유전자 4종 확인 ● 대장균에서의 대량발현 및 발현조절 ● Cold-active 에스테라아제 ES2-1 발현, 효소안정성, 기질특이성 분석 |
| | 신규 허복시디엔 유도체 미생물 제초제 개발 | | <ul style="list-style-type: none"> ● 유도체 미생물 생산을 위한 신규 메타게놈 유전자 제공 |

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

○ 국외 제품생산 및 시장 현황을 보면 세계 작물보호용 농약시장은 2004년도 기준으로 318억 USD로서 전체 정밀화학산업 (7,200억 USD)의 4.4%이며 2003년보다 명목 성장율로 12.5% 증가되었고 실질 성장률도 4.8% 증가되었다. 향후 세계 농약 시장은 곡물 생산량의 감소와 단가 상승으로 2003년부터는 작물재배 면적의 증가로 시장이 증가하게 되어, 2004년도 시장 상황은 2003년 대비 실질 성장률이 4.8% 수준으로 증대되었음. 이런 경향을 고려할 때 2013년도에는 총매출액 규모가 380억 USD에 달할 것으로 예상되고 있으며, 세계적으로 고품질 먹거리에 대한 요구가 증가하고 이에 필요한 농약의 사용이 꾸준히 증가될 것이며 각국의 농업여건, 즉 미국의 농업법안이나 EU지역의 공동 농업정책 등으로 인하여 농약 사용이 증가할 것으로 예상됨. 또한 동남아시아와 남미지역의 경제가 회복임에 따라 작물보호용 농약 시장 증가에 기여할 것으로 예상되고 있다.

○ 본 과제의 연구결과 국내·외 최초의 제초제 허복시디엔의 농업특징조사가 이루어졌다. 기존의 몬산토에서 개발초기에 이루어진 농업특징 조사는 작물은 국내 농경지에 직접 영향을 미치기 어려운 잡초들에 대한 부분적인 정보만이 보고되었다. 본 과제에서는 국내 상황에 적합한 벼, 배추, 김장무, 마늘, 파 등에 대하여 실증 실험을 통하여 실용화 가능한 작물 선별, 약해 정도 및 적정 사용 농도를 파악한 점에서 앞으로 허복시디엔 제초제의 실용화를 위한 중요한 농업 기초자료를 제공한다. 또한 미생물 제형 개발을 위하여 허복시디엔 활성 증대에 중요한 성분을 확인하였으므로, 기업체에서 제초제로 실용화하기 위한 유용한 제형 개발 정보를 제공한다.

○ 본 연구결과로 국내에서 개발한 고유한 특허 유전자원을 확보하였고, 이를 사용한 허복시디엔 유도체 합성체가 차후에 이루어지면 원천 신규 특허를 확보하게 되므로 국제 경쟁력 향상에 큰 기여를 하게 될 것으로 예측된다.

○ 본 연구의 최종 목적으로 배지의 최적화와 Herboxidiene 고생산성 균주를 개발하여 현재 (특허출원) 50 mg/L 수준에서 2,850 mg/L 수준까지 개발 되어 생산성은 60배 이상 향상되어 산업균주에 근접해 있어 산업화 가능하며 가능한 회사에 기술 이전할 예정이다.

○ 본 연구에서 신규 herboxidiene 유도체 개발을 위해 in vivo 및 in vitro glycosylation 이 성공적으로 이루어져 (특허출원) 균주에서 생산이 가능하며 또한 P450에 의해 herboxidiene의 aglycone 변형도 가능하여 이들에 대해 균주특허 및 물질 특허를 확보할 예정이며, 신규 herboxidienedmf 이용하여 새로운 제초제 개발 혹은 최근에 항암제로서 개발하기 위해 좀 더 연구가 필요하다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 최근에 herboxidien이 제초제 뿐만 아니라 다양한 생리활성으로 hypercholesterolemia 및 anticancer 생리활성이 알려지면서 최근에 유기합성 방법에 의해 다양한 변형을 시도하고 있다. 항암제로 개발하기 위해 유기합성 방법으로 herboxidiene 유도체 합성을 시도하였으며 그 중에 Herboxidiene GEX1A을 전체 합성이 성공적으로 수행되었으며, antitimer activity가 뛰어난 것으로 알려져 있다 (ACS Chem Biol. 2011 Mar 18;6(3):229-33).
- 또한 herboxidiene 생산 균주인 *S. chromofucus* 전체 지놈이 분석되어 (AEM, 2012, 78; 2034-2038) 총 9.6 Mb로 밝혀졌으며, 8,264개의 ORF을 가진 것으로 알려져 있다. 이 논문에서 herboxidiene 생합성 유전자 53 kb을 분석하여 생합성 과정을 밝히고 일부 유전자를 inactivation 하여 유전자 집단임을 확인하였음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

제 8 장 참고문헌

- Miller–Wideman M, Makkar N, Tran M, Isaac B, Biest N, Stonard R. "Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces chromofuscus* A7847. Taxonomy, fermentation, isolation, physico–chemical and biological properties." *J. Antibiot.* 1992. 45(6):914–921
Eur. Pat. Appl. (1997), 13 pp. EP 781772].
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño–Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *Nature*, 2002, 417: 141
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*" *Nat. Biotechnol.* 2003, 21: 526.
- Rapid engineering of polyketide overproduction by gene transfer to industrially optimized strains. "Rapid engineering of polyketide overproduction by gene transfer to industrially optimized strains." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 480–488].
- Diacovich L, Peirú S, Kurth D, Rodríguez E, Podestá F, Khosla C, Gramajo H. "Kinetic and structural analysis of a new group of Acyl–CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 31228–31236].
- Okamoto S, Lezhava A, Hosaka T, Okamoto–Hosoya Y, Ochi K. "Enhanced expression of S–adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *J. Bacteriol.* 2003, 185, 601–609.
- Lee PC, Umeyama T, Horinouchi S. "afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *Mol Microbiol*, 43, 1413–1430, 2002
- Maharjan S, Oh TJ, Lee HC, Sohng JK. "Heterologous expression of metK1–sp and afsR–sp in *Streptomyces venezuelae* for the production of pikromycin" *Biotechnol Lett*, 30:1621–26, 2008
- Parajuli N, Viet HT, Ishida K, Tong HT, Lee HC, Liou K, Sohng JK. "Identification and characterization of the afsR homologue regulatory gene from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952." *Res Microbiol*, 156:707–12, 2005
- Maharjan S, Oh TJ, Lee HC, Sohng JK. "Heterologous expression of metK1–sp and afsR–sp in *Streptomyces venezuelae* for the production of pikromycin" *Biotechnol Lett*, 30:1621–26, 2008
- Wideman, M. M., Makkar, N., Tran, M., Isaac, B., Biest, N., Stonard, R. (1992) "Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces chromofuscus* A7847." *J. Antibiotics* 45(6):914–921.

농촌진흥청 (2005). 농경지 잡초 분포 조사 보고서.

Hanes, C. S. (1932). "Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley." *Biochem J* 26(5): 1406–1421.

Lee SK, Basnet DB, Choi CY, Sohng JK, Ahn JS, Yoon YJ (2004) The role of erythromycin C-12 hydroxylase, EryK, as a substitute for PikC hydroxylase in pikromycin biosynthesis. *Bioorg Chem* 32(6):549–559

Sang Kil Lee, Devi B. Basnet, Jay Sung Joong Hong, Won Seok Jung, Cha Yong Choi, Hei Chan Lee, Jae Kyung Sohng, Keun Garp Ryu, Dae Joong Kim, Jong Seog Ahn, Beom Seok Kim, Hyun Cheol Oh, David H. Sherman, Yeo Joon Yoon (2005) Structural Diversification of Macrolactones by Substrate-Flexible Cytochrome P450 Monooxygenases. *Adv. Synth. Catal* 347(10):1369–1378

Practical Streptomyces Genetics. 2000. John Innes Centre, Norwich

Miller-Wideman M, Makkar N, Tran M, Isaac B, Biest N, Stonard R (1992) Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces chromofuscus* A7847. Taxonomy, fermentation, Shao L, Zi J, Zeng J, Zhan J (2012) Identification of the herboxidiene biosynthetic gene cluster in *Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):2034–2038.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

| | | | | | |
|------------------------|---|---------|------------------|------------------------------|----|
| 과 제 명 | (국문) 친환경 미생물제초제 herboxidiene 및 유도체의 산업화를 위한 연구 | | | | |
| | (영문) Metabolic engineering approach for mass production of herboxidiene and analogous as Eco-friendly herbicide | | | | |
| 주관연구기관 | 선문대학교 | | 주 관 연 구 책 임 자 | (소속) 제약공학과 | |
| 참 여 기 업 | | | | (성명) 송재경 | |
| 총연구개발비 (390,000 천원) | 계 | 390,000 | 총 연구 기간 | 2010. 7. 1~2013. 6. 30. (3년) | |
| | 정부출연 연구개발비 | 390,000 | 총 참 여 연구 원 수 | 총 인원 | 21 |
| | 기업부담금 | | | 내부인원 | 11 |
| | 연구기관부담금 | | | 외부인원 | 10 |

○ 연구개발 목표 및 내용

연구개발 목표

미생물유래 친환경 미생물제초제의 산업화를 위하여, 단기간 내의 생산성 향상연구를 통하여 상용화 가능성이 높은 herboxidiene을 대상으로 하여

- ① 생합성 유전자집단 확보,
- ② 고생산성 균주 개발,
- ③ 대량생산을 위한 발효 및 분리공정 개발,
- ④ 조합생합성에 의한 유도체 개발을 통한 신규 제초제의 개발,
- ⑤ herboxidiene의 제형개발을 통한 실용화를 목적으로 한다

연구 내용

- S. chromofucus 전체지놈 분석, herboxidiene 생합성 유전자 분석, 분리 및 염기서열에 근거한 생합성 유전자들의 역할 및 생합성 경로 분석
- 유전공학에 의한 herboxidiene 고생산성 균주의 개발, 대사공학에 의한 생산성 향상
- Herboxidiene의 생산 및 분리정제 공정의 개발, 발효조를 이용한 herboxidiene의 발효조건 최적화 및 발효조건 scale-up
- Herboxidiene 유도체 개발; P450 유전자 확보 및 효소에 의한 유도체 생성, glycosylation에 의한 GT 유전자 확보, 효소발현 및 herboxidiene glycoside 합성, 균주 개량에 의한 herboxidiene glycoside생산 균주 개발 및 생산
- 미생물제초제 제형 개발 및 산업화; 천연 제초제 기초 농업활성 측정, 실용화를 위한 허복시디엔의 작물별 성장 저해확인 및 허복시디엔을 이용한 미생물 제초제 제형

○ 연구결과

① Herboxidiene의 생합성 유전자 확보, 유전자 분석 및 규명

- *S. chromofuscus* genome 분석 총 9,142,143 bp, 인접 유전자 포함 herboxidiene 생합성 유전자 180 kb 확보 및 유전자 분석, 분석결과로부터 Herboxidiene 생합성과정 추정.
- 염기서열 분석을 통하여 1종 (*herA*)의 조절유전자를 예측하였고, *herA*를 과발현시킨 균주의 생산성 및 전사체 분석을 통하여 herboxidiene의 생합성 과정 중에 negative 조절 유전자의 역할을 함을 규명함.

② 고생산성 균주 개발

- 재조합된 pACC152, pASA152, pSAM152, pAfsR152 및 pSA152 *S. chromofurum* 균주에 전이하여 각각 *S. chromofurum* ACC152, *S. chromofurum* ASA152, *S. chromofurum* ASM152, *S. chromofurum* AFSR152 및 *S. chromofurum* SAI152 균주를 제작.
- 최적배지를 이용하여 *S. chromofuscus* SIBR내에서 1.32배까지(0.976 g/L) 증가
- *S. chromofuscus* AFS는 1.7배(1.258 g/L) 증가
- *S. chromofuscus* GIBR은 3.85배(2.849 g/L) 증가

③ 대량생산을 위한 배지 최적화, 발효 및 분리공정 개발

- 유도체 검출을 위한 시료의 전처리 과정과 HPLC 및 LC-MS 분석방법의 정립.
- 기존 배지는 54.89 mg/L herboxidiene이 생산에서 carbon/nitrogen 최적화에 따라 200.2-744.6 mg/L (3.7-13.7 배)이 생산 증가.
- Feeding에 의한 생산성 증가 최적화: Glycerol과 ProFlo 배양 후 feeding 하여 herboxidiene 1087 mg/L (19.8 배)생산.

④ 조합생합성에 의한 유도체 개발을 통한 신규 제조제의 개발

- *in vitro*에 의한 Glucosyl-herboxidiene 및 Galacosyl- herboxidiene의 합성.
- pSET152 galU 및 *yjiC*를 재조합한 pGYIBR을 전이하여 *S. chromofuscus* GYIBR 균주로 부터 herboxidiene glycoside로 생산.
- 외래 *epoF*의 발현을 통하여 신규유도체로 보이는 물질을 HPLC-ESI-MS를 통하여 검출, 생산이 매우 소량되어 명확한 구조 분석을 실시하지 못하였음.
- 메타게놈을 이용한 herboxidiene 유도체: 국내 고유 토착 미생물 메타게놈 유전자은행 스크리닝, Tributyrin 가수분해 Esterase/Lipase 등 33종 확보, 염기서열 분석, ORF 확인, 신규성 유전자 4종 확인, 대장균에서의 대량발현 및 발현조절 및 Cold-active 에스테라아제 ES2-1 발현, 효소안정성, 기질특이성 분석.

⑤ Herboxidiene 및 그 유도체들의 제형개발을 통한 실용화

- 천연 제조제 기초 농업활성 측정; 애기장대 *in vitro* 제조활성 검증 및 MIC 측정, 잡초 8종에 대한 제조활성 확인 및 벼와 밀에 대한 위해성 확인
- : 국내 주요 발작물 5종 (배추, 파, 김장무, 고추, 마늘)에 대한 허복시디엔 위해성 확인 및 허복시디엔 제조제 작물별 유효 활성 농도 측정.
- 허복시디엔을 이용한 미생물 제조제 제형 실용화: 전착제 혼입을 통한 허복시디엔 제조활성 증진 확인 및 기존의 Sulfonate 성분 포함 전착제 (동부카바와 동방전착제)가 효율적 허복시디엔 제형개발에 가장 적합함을 확인.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 본 과제의 연구결과 국내 외 최초의 제조제 허복시디엔의 농업특징조사가 이루어졌다. 기존의 문헌에서 개발초기에 이루어진 농업특징 조사는 작물은 국내 농경지에 직접 영향을 미치지 어려운 잡초들에 대한 부분적인 정보만이 보고되었다.

- 본 과제에서는 국내 상황에 적합한 벼, 배추, 김장무, 마늘, 파 등에 대하여 실증 실험을 통하여 실용화 가능한 작물 선별, 약해 정도 및 적정 사용 농도를 파악한 점에서 앞으로 허복시디엔 제조제의 실용화를 위한 중요한 농업 기초자료를 제공한다. 또한 미생물 제형 개발을 위하여 허복시디엔 활성 증대에 중요한 성분을 확인하였으므로, 기업체에서 제조제로 실용화하기 위한 유용한 제형 개발 정보를 제공한다.
- 국내에서 개발한 고유한 특허 유전자원을 확보하였고, 이를 사용한 허복시디엔 유도체 합성체가 차후에 이루어지면 원천 신규 특허를 확보하게 되므로 국제 경쟁력 향상에 큰 기여를 하게 될 것으로 예측된다.
- 본 연구의 최종 목적으로 배지의 최적화와 Herboxidiene 고생산성 균주를 개발하여 현재 (특허출원) 50 mg/L 수준에서 2,850 mg/L 수준까지 개발 되어 생산성은 60배 이상 향상되어 산업균주에 근접해 있어 산업화 가능하며 가능한 회사에 기술 이전할 예정이다.
- 신규 herboxidiene 유도체 개발을 위해 in vivo 및 in vitro glycosylation이 성공적으로 이루어져 (특허출원) 균주에서 생산이 가능하며 또한 P450에 의해 herboxidiene의 aglycone 변형도 가능하여 이들에 대해 균주특허 및 물질 특허를 확보할 예정이며, 신규 herboxidienedmf이용하여 새로운 제조제 개발 혹은 최근에 항암제로서 개발하기 위해 좀 더 연구가 필요하다.

자체평가 의견서

| | | | | | |
|---------|---|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|
| 연구개발분야 | 농업특정연구사업 | 과제구분 | <input type="checkbox"/> 자유응모과제 | 관리번호 | 20100368 |
| 연구과제명 | 친환경 미생물제조제 herboxidiene 및 유도체의 산업화를 위한 연구 | | | | |
| 주관연구기관 | 선문대학교 | | | | |
| 연구담당자 | 주관연구책임자 | 송재경 | | | |
| | 협동연구책임자 | 기관(부서) | 국가농업과학원 | 성명 | 이창묵 |
| | | 기관(부서) | 이화여자대학교 | 성명 | 윤여준 |
| | | 기관(부서) | | 성명 | |
| | | 기관(부서) | | 성명 | |
| 연구기간 | 총기간 | 2010. 7. 1~2013. 6. 30. | 당해년도기간 | 2012. 7. 1~2013. 6. 30. | |
| 연구비(천원) | 총규모 | 390,000 | 당해년도규모 | 130,000 | |

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 (O) 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

계획대로 수행되지 않은 원인은?

배지 최적화에 의해 20배 이상의 생산성 증가로 인해 고생산 균주로부터 herboxidiene 2.85 g/L 생산이 가능.

in vitro에 의한 Glucosyl-herboxidiene 및 Galacosyl- herboxidiene의 합성 및 *S. chromofuscus* GYIBR 균주로부터 herboxidiene glucoside 대량생산 가능.

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음 (O) 어느 정도 얻음 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로써 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 (O) 약간 감소되었다 크게 감소되었다

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 (O) 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

| 구 분 | 소 속 기 관 | 직 위 | 성 명 |
|---------|---------|-----|---------|
| 주관연구책임자 | 선문대학교 | 교수 | 송재경 (인) |
| 참여기업대표 | | | (인) |

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

| | | | |
|--------|---|---------|-------------------|
| 사업추진형태 | <input type="checkbox"/> 자유응모과제 | 분 야 | |
| 연구과제명 | 친환경 미생물계초제 herboxidiene 및 유도체의 산업화를 위한 연구 | | |
| 주관연구기관 | 전문대학교 | 주관연구책임자 | 송재경 |
| 연구개발비 | 정부출연 연구개발비 | 기업부담금 | 연구기관부담금 |
| | 390,000 | | 총연구개발비 390,000 |
| 연구개발기간 | 2010. 7. 1~2013. 6. 30. (3년) | | |
| 주요활용유형 | <input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input checked="" type="checkbox"/> 미활용 (사유: 관련 산업체 물색 중) | | |

2. 연구목표 대비 결과

| 당초목표 | 당초연구목표 대비 연구결과 |
|--|---|
| <p>① Herboxidiene의 생합성 유전자 확보, Herboxidiene의 생합성 유전자 분석 및 규명</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>S. chromofuscus</i> genome 분석 총 9,142,143 bp, 인접 유전자 포함 herboxidiene 생합성 유전자 180 kb 확보 및 유전자 분석, 분석결과로부터 Herboxidiene 생합성과정 추정. ● 염기서열 분석을 통하여 1종 (<i>herA</i>)의 조절유전자를 예측하였고, <i>herA</i>를 과발현시킨 균주의 생산성 및 전사체 분석을 통하여 herboxidiene의 생합성 과정중에 negative 조절 유전자의 역할을 함을 규명함. |
| <p>② 고생산성 균주 개발</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● 재조합된 pACC152, pASA152, pSAM152, pAfsR152 및 pSA152 <i>S. chromofuscus</i> 균주에 전이하여 각각 <i>S. chromofuscus</i> ACC152, <i>S. chromofuscus</i> ASA152, <i>S. chromofuscus</i> ASM152, <i>S. chromofuscus</i> AFSR152 및 <i>S. chromofuscus</i> SAI152 균주를 제작. ● 최적배지를 이용하여 <i>S. chromofuscus</i> SIBR내에서 1.32배까지(0.976 g/L) 증가 ● <i>S. chromofuscus</i> AFS는 1.7배(1.258 g/L) 증가 ● <i>S. chromofuscus</i> GIBR은 3.85배(2.849 g/L) 증가 ● <i>S. chromofuscus</i> SAM, <i>S. chromofuscus</i> IBR25, <i>S. chromofuscus</i> ACC, <i>S. chromofuscus</i> ASA 및 <i>S. chromofuscus</i> AS에서는 약간 증가. |

| 당초목표 | 당초연구목표 대비 연구결과 |
|--|---|
| <p>③ 대량생산을 위한 배지 최적화, 발효 및 분리공정 개발</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● 신규 유도체 검출을 위한 시료의 전처리 과정과 HPLC 및 LC-MS 분석방법의 정립. ● 기존 배지는 54.89 mg/L herboxidiene이 생산에서 carbon/nitrogen 최적화에 따라 200.2-744.6 mg/L (3.7-13.7 배)이 생산 증가. ● Feeding에 의한 생산성 증가 최적화: Glycerol과 ProFlo 배양 후 feeding 하여 herboxidiene 1087 mg/L (19.8 배)생산. |
| <p>④ 조합생합성에 의한 유도체 개발을 통한 신규 제조제의 개발</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● in vitro에 의한 Glucosyl-herboxidiene 및 Galacosyl-herboxidiene의 합성. ● pSET152 galU 및 yjiC를 재조합한 pGYIBR을 전이하여 <i>S. chromofuscus</i> GYIBR 균주 제작, 분석한 결과 herboxidiene glycoside로 생산. ● 외래 <i>epoF</i>의 발현을 통하여 신규유도체로 보이는 물질을 HPLC-ESI-MS를 통하여 검출, 생산이 매우 소량되어 명확한 구조 분석을 실시하지 못하였음. ● 메타게놈을 이용한 고효율 천연 제조제 herboxidiene 유도체: 국내 고유 토착 미생물 메타게놈 유전자은행 스크리닝, Tributyrin 가수분해 Esterase/Lipase 등 33종 확보, 염기서열 분석, ORF 확인, 신규성 유전자 4종 확인, 대장균에서의 대량발현 및 발현조절 및 Cold-active 에스테라아제 ES2-1 발현, 효소안정성, 기질특이성 분석. |
| <p>⑤ Herboxidiene 및 그 유도체들의 제형개발을 통한 실용화</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● 천연 제조제 기초 농업활성 측정; 애기장대 <i>in vitro</i> 제조활성 검증 및 MIC 측정, 잡초 8종에 대한 제조활성 확인 및 벼와 밀에 대한 위해성 확인 ● 실용화를 위한 허복시디엔의 작물별 성장 저해확인: 국내 주요 밭작물 5종 (배추, 파, 김장무, 고추, 마늘)에 대한 허복시디엔 위해성 확인 및 허복시디엔 제조제 작물별 유효 활성 농도 측정. ● 허복시디엔을 이용한 미생물 제조제 제형 실용화: 전착제 혼입을 통한 허복시디엔 제조활성 증진 확인 및 기존의 Sulfonate 성분 포함 전착제 (동부카바와 동방전착제)가 효율적 허복시디엔 제형개발에 가장 적합함을 확인. |

* 결과에

대한 의견 첨부 가능

3. 핵심기술

| 구분 | 핵심기술명 |
|----|--|
| ① | <i>S. chromofucus</i> A7847로의 형질전환 기술 |
| ② | Herboxidiene의 SPE 전처리 및 HPLC-ESI-MS를 이용한 herboxidiene의 분석 기술 |
| ③ | Herboxidiene의 생산 배지 최적화 기술 |
| ④ | Herboxidiene 고생산 균주 |
| ⑤ | Herboxidiene glycoside 합성 기술 |
| ⑥ | Herboxidiene glycoside 생산 균주개발 기술 |
| ⑦ | Herboxidiene 제형개발을 통한 실용화 기술 |

4. 연구결과별 기술적 수준

| 구분 | 핵심기술 수준 | | | | | 기술의 활용유형(복수표기 가능) | | | | |
|-------|----------|----------|-------------|---------------|---------------|-------------------|----------------|-------------|----------|-----|
| | 세계 최초 | 국내 최초 | 외국기술 복 제 | 외국기술 소화·흡수 | 외국기술 개선·개발 | 특허 출원 | 산업체이전 (상표화) | 현장애로 해 결 | 정책 자료 | 기타 |
| ①의 기술 | | | | | v | | | v | | |
| ②의 기술 | v | | | | | | | v | | |
| ③의 기술 | | v | | | | v | | | | |
| ④의 기술 | v | | | | | v | | | | |
| ⑤의 기술 | v | | | | | v | | | | 준비중 |
| ⑥의 기술 | v | | | | | v | | | | 준비중 |
| ⑦의 기술 | | v | | | | | v | | | |

* 각 해당란에 v 표시

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

| 핵심기술명 | 핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과 |
|-------|--|
| ①의 기술 | S. chromofucus A7847로의 형질전환 기술은 다른 방선균에 형질전환이 요구될 때 이를 토대로 개선개량하여 이용할 수 있는 기술임. 또한 herboxidiene 생합성 유전자의 기능규명과 생산성 향상에 필수적인 기술임. |
| ②의 기술 | SPE를 통한 시료의 전처리는 천연화합물의 분석에 매우 효과적인 방법으로 본 연구 이외의 herboxidiene의 신규유도체의 분석에도 유용하게 쓰일 가능성이 있는 기술임. 천연화합물의 분석에는 HPLC뿐만아니라 HPLC-ESI-MS와 이용되며, 이는 NMR 분석전에 천연화합물의 구조를 예측할 수 있는 매우 유용한 기술임. herboxidiene의 분석을 위하여 확립한 분석 기술은 개선 개량하여 모든 천연화합물의 분석에 이용될 가능성이 있음. |
| ③의 기술 | 배지의 최적화에 의해 Herboxidiene 생산균주에서 현재 (특허출원) 54 mg/L 수준에서 1,080 mg/L 수준까지 개발 되어 생산성이 20배 이상 향상되어 산업화 가능. |
| ④의 기술 | 본 연구의 최종 목적으로 Herboxidiene 고생산성 균주를 개발하여 현재 (특허출원) 2,850 mg/L 수준까지 개발 되어 생산성은 60배 이상 향상되어 산업균주에 근접해 있어 기술이전 가능한 회사에 기술 이전할 예정. |
| ⑤의 기술 | 신규 herboxidiene 유도체 개발을 위해 in vitro glycosylation이 성공적으로 이루어져 (특허출원 준비) 각 물질에 대해 물질 특허를 확보할 예정이며, 신규 herboxidiene 이용하여 새로운 제초제 개발 혹은 최근에 항암제로서 개발하기 위해 좀 더 연구가 필요. |
| ⑥의 기술 | 신규 herboxidiene 유도체가 새로운 제초제 혹은 항암제로 대량생산을 위해 herboxidiene glycoside를 생산 가능한 균주를 개발하였음. 세계 최초로 herboxidiene glycoside 생산 균주 개발로 균주를 특허화 할 예정임. |
| ⑦의 기술 | 본 과제의 연구결과 국내·외 최초의 제초제 허복시디엔의 농업특징조사가 이루어졌다. 기존의 몬산토에서 개발초기에 이루어진 농업특징 조사는 작물은 국내 농경지에 직접 영향을 미치기 어려운 잡초들에 대한 부분적인 정보만이 보고되었다. 본 과제에서는 국내 상황에 적합한 벼, 배추, 김장무, 마늘, 파 등에 대하여 실증 실험을 통하여 실용화 가능한 작물 선별, 약해 정도 및 적정 사용 농도를 파악한 점에서 앞으로 허복시디엔 제초제의 실용화를 위한 중요한 농업 기초자료를 제공한다. 또한 미생물 제형 개발을 위하여 허복시디엔 활성 증대에 중요한 성분을 확인하였으므로, 기업체에서 제초제로 실용화하기 위한 유용한 제형 개발 정보를 제공 |

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.