

한국 토양 환경유래의 N-acyl amino acid synthase 유전자에 의한 대장균 내 항생제 N-lauroyl tyrosine 생산

여윤수¹ · 임용호² · 김정봉³ · 양정모² · 이창묵¹ · 김수진¹ · 박민선⁴ · 구본성¹ · 윤상홍^{1,*}

¹농업생명공학연구원 미생물유전과, ²건국대학교 생물과학공학과, ³농업생명공학연구원 분자생리과, ⁴아주대학교 생화학교실

Isolation of N-lauroyl Tyrosine Antibiotic in *E. coli* Carrying N-acyl Amino Acid Synthase Gene from Environmental DNA in Korean Soils

Yun-Soo Yeo¹, Yoon-Ho Lim², Jeong-Bong Kim³, Jung-Mo Yang², Chang-Muk Lee¹, Soo-Jin Kim¹, Min-Seon Park⁴, Bon-Sung Koo¹ and Sang-Hong Yoon^{1,*}

¹Microbial Genetics Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

³Molecular Physiology Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Ajou University School of Medicine, Suwon 443-749, Korea

Received October 19, 2007; Accepted October 30, 2007

To access the natural product antibiotics produced by uncultured microorganisms, six cosmid libraries of DNA extracted directly from soil samples (environmental DNA, eDNA) were constructed and screened for the production of antibacterial active molecules. Of the approximately 60,000 clones screened, one antibacterial clone (YS92B) was detected. Ethyl acetate extracts of clone YS92B showed antibacterial activity against various pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Staphylococcus epidemis*). Active constituents from cultures of YS92B were isolated and purified using a bioassay-guided fractionation against *B. subtilis* through a series of procedures (ethyl acetate extraction, Sephadex LH20 column chromatography, High Performance Liquid Chromatography). NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spectral analysis of a major antibacterial active YS92B-VII indicated that it is a lauric acid linked to tyrosine. This report describes the characterization of antibacterially active long chain N-acyl derivatives of tyrosine that are produced by eDNA clones hosted in *Escherichia coli* from Korean soils.

Key words: eDNA, metagenomic library, N-acyl tyrosine antibiotics

서 론

대부분의 자연계에 존재하는 미생물은 배양되지 않으며¹⁾ 분자 생물학적 기술이 발달하면서 현미경으로 관찰 가능한 미생물들 중 대략 0.1-1%만이 배양 된다는 것이 밝혀졌다^{2,3)}. 실제로 자연계에서 우점인 미생물들은 대부분 배양이 되지 않는 것으로 보고 되어 있다^{4,6)}. 따라서 배양되지 않는 미생물(난 배양 미생물)은 새로운 천연생리활성물질의 발견을 위한 대단히 매력적인 자원이다.

난 배양미생물을 연구하는 방식은 크게 이들을 배양하는 기술을 개발하거나 이들의 유전체만을 추출하여 재조합한 발현물의 활성연구와 같이 유전자원 확보에 주력하는 두 가지 방향으로 구분될 수 있다. 우선 이들로부터 유용한 유전자를 확보하기 위해 배양조건을 맞추는 것은 거의 불가능한 일이다. 왜냐하면 세균군집의 분리를 위해 인위적인 배지에서 배양하는 것은 미생물의 성장과 분열에 필요로 하는 각기 다른 성장요구 인자를 필요로 하며, 군집 내에서 유용한 유전자를 포함하는 미생물 군집의 손실을 가져올 수 있으며, 게다가 이러한 방법을 이용하기 위해서는 많은 시간과 노력이 필요로 하기 때문이다⁷⁾. 다른 하나는 이들의 유전체만을 추출하여 유용유전자원을 확보하는 방법이 있는데 이러한 방법은 자연계에서 미생물을 분리하지 않고 총 미생물의 DNA를 직접 추출하는 기술이 개발되

*Corresponding author
Phone: +82-31-299-1751; Fax: +82-31-299-1752
E-mail: shyo556@rda.go.kr

어 가능하게 되었다⁸⁾. 난 배양미생물로부터의 유용물질 탐색은 이렇게 추출된 DNA를 알맞은 vector에 삽입시켜서 library를 구축하고 재조합 발현되는 생성물을 탐색하는 방식으로 이루어질 수 있다⁹⁾. 이러한 일련의 과정을 metagenome이라고 하는데 이것은 자연계의 여러 환경에서 총 미생물의 유전체인 metagenome을 클로닝하여 대장균 등 배양이 가능한 미생물에서 유지 또는 발현시켜 신기능 대사경로 및 대사물질을 탐색하기 위한 연구라고 할 수 있다¹⁰⁾. 즉, 인공적으로 배양이 용이한 대장균과 같은 숙주 미생물에 환경으로부터 얻어진 유전자 clone을 발현시키면 기존의 방법으로는 접근이 불가능한 유전자로부터 재조합 생성된 새로운 천연생리활성물질을 발견할 수 있게 해 준다.

우리는 최근에 하버드 대학에서 처음 보고된 long-chain N-acyl tyrosine 항생제 물질과 관련 유전자¹¹⁾를 한국 고유 토양 DNA에서 분리하고 이 유전자가 대장균에서 생산하는 N-acyltyrosine isomer들의 존재를 분리, 정제하였으며 이들 중 어떤 물질이 식물병원성 세균의 주요 항균물질임을 확인하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Microbial strain, plasmid, 배지 및 시료 채취 Metagenomic library 작성을 위하여 사용된 숙주 균주와 plasmid는 각각 *Escherichia coli*(XL1-Blue MR, Stratagene, USA)과 pSuperCos 1 cosmid vector(Stratagene, USA)를 사용하였으며 항균활성 clone선발을 위한 지시균으로는 NCCB(Netherlands Culture Collection of Bacteria)에서 제공 받은 chloramphenicol과 kanamycin 저항성 유전자가 존재하는 *Bacillus subtilis* 1E32 (pPL608)를 사용하였으며 항균활성 스펙트럼 조사를 위한 지시균주들은 농업생명공학연구원의 한국농용미생물보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)와 한국생명공학연구원의

생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 병원성 세균과 곰팡이를 제공받아 실험하였다(Table 1). 재조합 *E. coli*는 LB배지에 적당한 항생제를 첨가하여 37°C에서 배양하였으며 DNA조작에 사용된 효소들은 Takara회사(Japan)의 것을 사용하였다. 또한, metagenomic library작성을 위한 토양시료는 수원소재 여기산 일대의 사철나무, 소나무, 은행나무 근권토양과 전라북도 전주 수목원일대의 굴참나무, 주목, 단풍나무 근권토양을 채취하였다. 시료 수집은 식물체 뿌리를 포함한 깊이 10~25 cm을 채취하였고 냉동건조 하여 4°C에 보관하며 사용하였다.

토양 DNA 분리와 metagenomic library 제작. 토양으로부터 전체 DNA를 추출하기 위하여 Yun 등¹²⁾의 방법을 이용하여 추출하였다. 수집된 토양 5 g씩을 13.5 ml의 추출용액(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM sodium phosphate pH 8.0, 1.5 M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB))에 넣고 현탁한 후 proteinase K(20 mg/ml) 50 µl씩을 넣고 회전시키면서 37°C에서 30분간 반응시킨 후 20% SDS 1.5 ml를 첨가하여 65°C에서 2시간 동안 20분에 한번씩 교반하면서 반응시켰다. 그런 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 모아서 동량의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1, v/v)을 첨가하여 혼합한 후에 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취하고 0.6배의 isopropanol을 넣어 1시간 동안 상온에서 방치한 다음 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 대부분의 DNA 시료에 섞여있는 humic compound를 제거하기 위하여 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)의 CHEF II system(BioRad, USA)을 이용하여 6 V/cm로 14시간 동안 전기영동 하였다. 190 kb 이상의 DNA를 포함하는 agarose block만을 자른 다음 agarase효소를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 70°C에서 10분간 agarase를 비활성화 시켰으며 이 반응액에 2.5배의 ethanol을 첨가하여 원심분리한 후 침전된 DNA pellet을 적당한 농도로 TE buffer에 용해하여 metagenomic library를 만드는데 사용하였다.

Table 1. Microbial strains and plasmids used in this study

Microbial strains, plasmids	Relevant characteristics	Reference or source
Bacterial strains		
<i>Bacillus subtilis</i>		NCCB 3134
<i>Rhizobium radiobacter</i>		KACC 10866
<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovara</i>		KACC 10440
<i>Pseudomonas syringae</i>		KACC 10292
<i>Xanthomonas campestris pv. oryzae</i>		KACC 10331
<i>Listeria monocytogenes</i>		KACC 10550
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		KCTC 1917
Fungal strains		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		KACC 40003
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>		KACC 40037
<i>Phytophthora capsici</i>		KACC 40483
<i>Pyricularia grisea</i>		KACC 40425
<i>Escherichia coli</i>		
XL1- Blue MR	$\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$	Stratagen
Plasmids		
SuperCos 1	Cosmid cloning vector for the construction of DNA libraries, Km ^r	Stratagen

Cosmid library 제조를 위해 정제된 DNA는 적당량의 *Sau3A1* 제한효소로 부분절단한 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 40~50 kb 부분의 DNA만을 elution하였고 CIAP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)로 DNA를 탈인산화 하였다. SuperCos 1 vector는 *BamHI* 제한효소로 자른 후 *Sau3A1*로 부분절단된 DNA와 16°C에서 16시간 ligation반응 시킨 후 MAX lambda packaging extracts kit(Epicentre, USA)로 *in vitro* packaging을 수행하였으며 kanamycin(50 µg/ml)이 함유된 LB 고체 배지에 도말 배양하여 자란 colony만 이용하였다.

항균활성 검정. 항균활성 clone을 선발하기 위한 표준 지시균으로는 NCCB에서 제공받은 chloramphenicol과 kanamycin 저항성 유전자가 존재하는 *B. subtilis* 1E32(pPL608)균주를 사용하였다. 각 세균에 대한 항균활성 검정은 overlay 방법으로 실험하였다. 우선 384-well plate에 접종된 metagenomic clone을 kanamycin이 첨가된 LB고체 배지에 96-pin replica를 이용하여 접종한 후, 28°C에서 7일간 배양하였다. 배양된 colony들 위에 사전배양된 *B. subtilis* 이나 분석을 위한 지시병원성 세균들을 흡광도 600 nm에서 0.2가 되게 희석하여 LB-Top agar (0.7% agar) 5 ml에 0.5 ml씩 넣고서 overlay한 후 28°C에서 2일간 배양하면서 inhibition zone의 생성 유무와 저지환의 직경을 조사하여 분석하였다. 곰팡이는 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에서 4일간 배양한 후 대치배양으로 성장 저해 정도를 측정하였다.

항균물질의 분리 및 정제. 선발된 clone(pYS92B)에서 나오는 항균물질을 추출하기 위하여 유기용매인 ethyl acetate를 이용하여 추출하였다. 우선 YS92B clone을 20%의 LB배지에 접종하여 28°C로 3일간 배양한 후 원심분리하여 상층액에 동량의 ethyl acetate를 넣고 1시간 진탕한 다음, 정치하여 ethyl acetate층을 수거하고 rotary evaporator(40°C)를 이용하여 농축하였다. 농축된 YS92B ethyl acetate추출액을 80% methanol 20 ml에 재용해한 후 Sephadex LH-20(Pharmacia Biotech, Sweden)을 resin으로 하는 column(Size; Φ4×40 cm, mobile phase; 80% methanol, flow rate; 1 ml/min.)을 이용하여 한 개의 fraction당 8 ml씩 받았으며 항균활성 검정을 통해 활성 fraction을 모은 뒤 HPLC(High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu-10AVP, Japan)를 이용하여(column: Phenomenex Polar-RP 80A, detector: 205 nm, flow rate: 1 ml/min) isocratic 조건의 용출용매(65% methanol)로 물질을 분리하였다. 시료 주입량은 40 µl씩 15번 반복하여 총 600 µl의 시료를 pick별로 8개 부분으로 나누어 분리한 후 시료를 받아서 rotary evaporator를 이용하여 부분별로 각각 100 µl씩 80% methanol에 농축하

였다. 정제된 각 peak의 분석은 *B. subtilis*를 지시균으로 하여 inhibition zone 정도를 관찰하였다.

정제된 주 항균물질의 구조 분석. HPLC에 의해 정제된 YS92B clone의 주 항균 활성물질 VII의 정확한 구조 동정을 위해 여러가지의 NMR(Nuclear Magnetic Resonance) 분석을 수행하였다. NMR실험은 Bruker Avance 400 spectrophotometer system(9.4 T, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 수행하였는데 YS92B를 methanol-d4에 녹여서 298 K 온도에서 실험하였다. ¹H NMR 실험에서 relaxation delay로 1초를, 그리고 90도 pulse로는 10.2 µs를 주었다. 6,000 Hz의 spectral width와 32K data points로 실험하였다. ¹³C NMR 실험과 DEPT (Distortionless Enhanced by Polarization Transfer) 실험은 24,000 Hz의 spectral width와 90도 pulse로 10.3 µs를 사용하였다. 여기서 사용한 모든 이차원 실험은 2K X 256의 크기로 수행하였다. HMBC(Heteronuclear Multiple Bonded Connectivity)를 위해 사용한 long-ranged coupling값은 70 ms와 35 ms였다.

결과 및 고찰

Metagenomic library 제작. Metagenomic library를 작성하기 위하여 다양한 환경의 토양을 채취하여 Yun 등¹²⁾의 방법을 이용하여 토양 DNA를 추출하였다. Metagenomic library 작성에 사용되는 cosmid vector의 경우 insert 크기가 40~50 kb 정도가 적당하기 때문에 PFGE의 CHEF system을 이용하여 190 kb 부근의 DNA 단편을 분리하였으며 이 단편들을 *Sau3A1*로 부분절단하고 약 40 kb 단편을 분리하여 cosmid vector에 ligation한 후 metagenomic library를 제작하였다. Table 2는 우리가 제작한 다양한 환경의 metagenomic library 효율성을 나타낸 것으로 평균 clone수가 100,00개 이상이고 또한 삽입 단편크기 역시 40 kb 이상을 가지고 있었다.

Metagenome 유래 항균 clone 선발. 본 연구에서 제작된 metagenomic library에서 약 6만개 clone을 대상으로 항균성을 보이는 clone을 탐색하였다. 항균성 관련 clone을 탐색하기 위하여 7일간 배양된 metagenomic clone에 지시균인 *B. subtilis*를 overlay 하여 2일간 더 배양한 후 inhibition zone을 형성하는 clone을 선발하였다(Fig. 1). 이러한 방법은 항균활성을 갖는 metagenomic clone이 colony형태로 배지 내에서 자라면서 먼저 항균활성의 이차 대사산물을 만들게 되어 지시균이 그 colony 주변에서는 자라지 못하기 때문이다. 우리는 탐색된 6만개의 colony중에 유일하게 항균성을 나타내는 1개의 clone(pYS92B)을 최종 선발하였다. 이와 같은 결과는 70만의 metagenomic

Table 2. Molecular characteristics of the libraries constructed from soils

Library	DNA source	Cloning vector	Average insert size of the library (kb)	No. of clones
YYS-1	Soil (Ginkgo tree)	Super Cos 1 (cosmid)	40~50	280,000
YYS-2	Soil (Spindle tree)	Super Cos 1 (cosmid)	40~50	150,000
YYS-3	Soil (Pine tree)	Super Cos 1 (cosmid)	40~50	120,000
YYS-4	Soil (Cork oak tree)	Super Cos 1 (cosmid)	40~50	110,000
YYS-5	Soil (Maple tree)	Super Cos 1 (cosmid)	40~50	90,000
YYS-6	Soil (Yew tree)	Super Cos 1 (cosmid)	40~50	95,000



Fig. 1. Colony screening of library clones for antimicrobial activity. Clones were grown on LB agar plates with kanamycin (50 µg/ml). Plates were then overlaid with top agar containing exponentially growing *Bacillus subtilis*. Clone producing antibacterial activities were identified by a zone of inhibition in the lawn surrounding the clone. Arrow indicates the antibacterial activity.

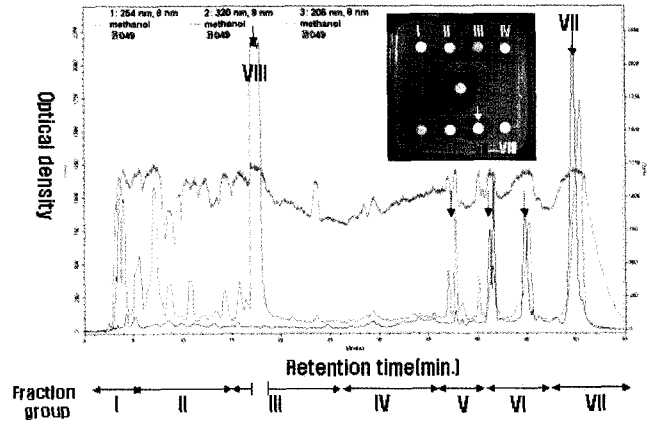


Fig. 2. HPLC chromatogram of major anti-bacterial fractions separated by sephadex LH20 with methanol, and antibiotic assay of each fraction. Indicator strain for antibiotic assay is *B. subtilis* 1E32 (LH20ABF: anti-bacterial fraction separated by sephadex LH20).

Table 3. Antibiotic activities of YS92B clone against phytopathogen

Phytopathogen	Inhibition/clear zone activity*
Bacterium	
<i>Rhizobium radiobacter</i>	+
<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovora</i>	++
<i>Pseudomonas syringa</i>	++
<i>Xanthomonas campestris pv. oryzae</i>	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++
Fungus	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	++
<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	+
<i>Phytophthora capsici</i>	-
<i>Pyricularia grisea</i>	+

* ++, 2- to 13-mm zone; +, 1-mm zone; -, no zone of inhibition

clone들 중 65개의 항세균 clone을 선발한 것과 유사한 확률이 었다¹³⁾. 분리된 YS92B clone은 지시균인 *B. subtilis* 이외 에도 식물의 무름병균인 *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovora*, 꽃썩음병균인 *Pseudomonas syringae*, 식중독균인 *Listeria monocytogenes*와 피부 질환균인 *Staphylococcus epidermidis*에도 강한 항균성을 보여주었다(Table 3).

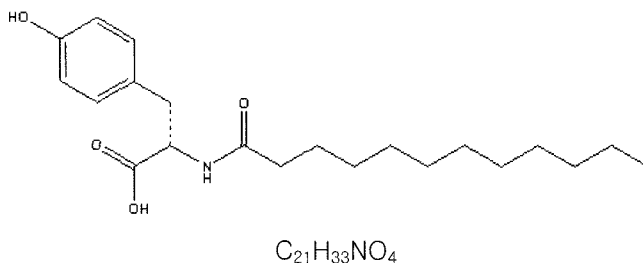
YS92B clone 배양액으로부터 항균물질의 분리 및 정제. Sephadex LH20 column chromatography에 의해 분리된 200여 개 fraction들의 항균성 분석하였을 때, 45-72번 fraction에서 지시균인 *B. subtilis*에 대하여 강한 항균 활성도를 나타내었다. 가장 항균 활성이 뛰어난 45-72번 분획을 농축시킨 뒤 40 µl씩 15 번에 걸쳐서 총 600 µl의 시료를 analytical HPLC를 이용해서 분리하여 받은 후 각각의 peak를 정제하였다. 정제된 peak는 지시균을 이용하여 항균 검정한 결과, 4개의 peak가 항균활성을 보였으나 Fig. 2에서 보는 바와 같이 주 활성물질은 peak VII이었다. 이 HPLC에서 retention time 17.5분에 해당하는 peak VII은 그것의 많은 함량에 비해 전혀 항균성을 보이지 않았다.

YS92B clone의 주 항균물질 구조 동정. HPLC로 순수 정제된 pYS92B clone의 주 활성물질인 peak VII는 자세한 구조

동정을 위해 다양한 NMR분석을 실시하였다. ¹³C NMR spectrum에서 모두 19개의 peak가 관찰되었다. 170 ppm 보다 더 아래쪽에서 두 개의 peak가 관찰되었는데, 이 중에 175.3 ppm에서 관찰된 peak는 4.60 ppm의 ¹H peak과 long-range coupling을 하였고 이 peak는 다시금 55.3 ppm의 peak과 직접 연결되었음이 HMQC(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) spectrum에서 관찰되었다(Table 4). 그런데 이 peak는 아미노산의 alpha carbon에 속하기 때문에 tyrosine의 alpha carbon으로 결론지었다. 따라서 175.3 ppm의 peak는 tyrosine의 carbonyl carbon이 될 수 밖에 없다. COSY(COrelated SpectroscopY) spectrum에서 4.60 ppm의 ¹H peak는 3.15 ppm의 peak와 연결되어 있기 때문에 이것은 Hβ로 결정되었다. HMBC와 COSY spectra를 해석함으로써 Cγ, Cδ, Cε, Cζ 모두 결정이 되었다. 앞서 언급한 두개의 ¹³C peak 중 176.3 ppm의 peak는 HMBC spectrum에서 H와 long-range coupling을 보이기 때문에 이것은 tyrosine과 fatty acid 사이를 연결하는 peptide bond의 carbonyl carbon로 결론 지어졌다. 현재까지 결정되지 않은 11개의 ¹³C peak들 중 14.6 ppm에서 관찰된 peak는 DEPT spectrum에서 quartet 이었기 때문에 이는 fatty acid의 methyl carbon으로 결정되었다. 또한 36.9 ppm에서 보이는 peak는 나머지 10개 중 가장 downfield shifted peak이므로 fatty acid의 beta carbon으로 정하여졌다. 23 ppm과 34 ppm 사이의 peak들은 NMR data 만으로는 정확한 위치를 결정하기 불가능 하지만 모두 fatty acid의 saturated chain을 이루고 있는 carbon이라는 점은 분명 하였다. 결합된 지방산의 불포화도를 보기위해 ¹³C-NMR의 결과에서 120~130 ppm 사이에서 peak가 나타나지 않음으로 이 지방산에 double bond가 존재하지 않음을 알 수있었다. 120~130 ppm 사이 있는 peak는 tyrosine의 peak이다. Table 4 에서는 위와 같이 결정된 사항들을 요약하였다. 최종적으로 YS92B clone의 주 항세균 물질인 peak VII는 tyrosine에 지방산인 탄소 12개의 포화지방산인 lauric acid가 amide형태로 결합된 구조임을 확인 하였다(Fig. 3). 이밖에도 peak V와 peak VI 역시 지방산 종류가 다른 N-acyl tyrosine의 isomer임을 MS

Table 4. The assignments of the ¹H and ¹³C NMR data of YS92B-VII peak

	Position	δ of ¹³ C	δ of ¹ H	Type of carbon
Tyrosine	C	175.3	-	s
	α	55.3	4.60(dd)	d
	β	37.7	3.15(ddd)	t
	γ	129.2	-	s
	δ	131.3x2	6.70(dd)	d
	ε	116.3x2	7.03(dd)	d
	ζ	157.3	-	s
Fatty acid	1	176.3	-	s
	2	36.9	2.15(t)	t
	3	27.0	1.49(m)	t
	4-11	33.2	1.28(m)	t
	4-11	30.91	1.28(m)	t
	4-11	30.92	1.28(m)	T
	4-11	30.7	1.28(m)	t
	4-11	30.61	1.28(m)	t
	4-11	30.62	1.28(m)	t
	4-11	30.2	1.28(m)	t
	4-11	23.8	1.28(m)	t
	12	14.6	0.89(t)	q

**Fig. 3. Proposed chemical structure of YS92B-VII peak responsible for the major antibacterial activities.**

(Mass Spectrophotometer)를 통해 확인 하였다(미공개 자료).

Lauroyl tyrosine은 N-acyl amino acid의 일종으로 생물내에서 N-acyl amino acid synthase에 의해 생물내에 상시 존재하는 지방산과 아미노산의 결합에 의해 만들어 지는 것으로 알려져 있고 결합될 기질인 아미노산의 종류에 따라 다양한 기질 특이성을 갖는다¹³⁾. 이 효소의 유전자는 토양의 eDNA로부터 분리하여 대장균 clone에서의 생산을 처음 확인하였다¹¹⁾. 본 실험의 YS92B clone을 염기서열 분석한 결과 기존 보고된 유전자의 conserved domain을 가지는 903 bp의 N-acyl amino acid synthase 유전자(GenBank accession number: DQ 849082)가 존재하였으며 이것은 위의 결과를 뒷받침 해주는 중요한 증거가 된다. 이들 N-acyl amino acid들은 항균성뿐 만 아니라 강력한 세정능력을 가짐으로써 이미 피부 및 두발등의 기능개선제로 특허 등록되어 있다¹⁴⁾.

초 록

토양에는 생존하지만 현 기술로는 배양이 불가능한 미생물

부터 천연 항생제를 탐색하기 위해 한국 토양 DNA 단편들을 가진 cosmid library을 대장균에서 제작하였고 약6만개의 clone 들을 대상으로 항세균 활성을 보여주는 YS92B를 최종 선발하였다. YS92B클론 배양액의 ethyl acetate추출액은 다양한 병원성 세균의 성장을 *in vitro*에서 강력히 저해하였다(*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Staphylococcus epidemis*). 이 항균활성의 주 물질인 YS92B-VII는 ethyl acetate추출, Sephadex LH20 column chromatography와 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)에 의해 순차적으로 분리하였으며 이 과정에서 주 활성물질은 각 피크를 항균검정으로 추적하여 최종 정제하였다. 이 물질은 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)에 의한 구조 분석 결과에서 탄소 12개의 포화지방산인 lauric acid가 tyrosine에 결합된 N-lauroyl tyrosine임을 최종 확인하였다. 따라서 본 보고는 한국 토양에서 유래한 고유의 N-acyl amino acid synthase(NAS) 유전자가 대장균에 발현되어 생산되는 N-acyl amino acid tyrosine의 특성을 밝히는 것이다.

감사의 글

본 연구는 농업생명공학연구원 기본연구사업(05-4-11-16-1, 05-4-11-16-2)지원에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., and Pace, N. R. (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**, 4765-4774.
- Gillespie, D. E., Brady, S. F., Bettermann, A. D., Cianciotto, N. P., Liles, M. R., Rondon, M. R., Clardy, J., Goodman, R. M., and Handelsman, J. (2002) Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4301-4306.
- Pace, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
- Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., and Fry, J. C. (2003) Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3223-3230.
- Wolfgang, R. S., Daniel, R., and Jaeger, K. E. (2004) Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganism. *Curr Opin Biotechnol.* **15**, 285-290.
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T., and Streit, W. R. (2001) Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 89-99.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F. L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782-787.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2003) Biotechnological

- prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 303-310.
10. Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman, R. M. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2541-2547.
 11. Brady, S. F., Chao, C. J., and Clardy, J. (2004) Long-chain N-acyltyrosine synthases from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6865-6870.
 12. Yun, S. S., Lee, J. H., Kim, S. J., Kim, S. S., Park, I. C., Lee, M. H., Koo, B. S., Yoon, S. H., and Yeo, Y. S. (2005) Screening and isolation of a gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from a metagenomic library of soil DNA. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 345-351
 13. Brady, S., and Clardy, J. (2000) Long-chain N-acetyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12903-12904.
 14. Bissett, D. L., and Robinson, L. R. (2005) Regulation of mammalian keratinous tissue using N-acyl amino acid compositions. *US Patent* No. 0019356.