한국생물공학회지 제22권 제5호
*Korean J. Biotechnol. Bioeng.*
Vol. 22, No. 5, 356-361(2007)

# 시아노박테리아의 이차대사물질에 대한 연구

김 기 은 · 권 종 희[1]
서경대학교 생물공학과, [1]베를린 공과대학
(접수 : 2007. 9. 27., 게재승인 : 2007. 10. 23.)

# Cyanobacteria and Secondary Metabolites

Gi-Eun Kim and Jong-Hee Kwon[1]
Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea
[1]Fachgebiet Technische Bioverfahrenstechnik Institut für Biotechnologie,
Technische Universität Berlin, Ackerstrasse 71-76, Berlin
(Received : 2007. 9. 27., Accepted : 2007. 10. 23.)

Cyanobacteria are a very old group of prokaryotic organisms that produce very diverse secondary metabolites, especially non-ribosomal peptide and polyketide structures. Although some cyanobacteria produce lethal toxins such as microcystins and anatoxins, some may be useful either for development into commercial drugs or as biochemical tools. Detection of unknown secondary metabolites was carried in the present study by a screening of 98 cyanobacterial strains from Cyanobiotech GmbH in order to establish a screening process, isolate pure substances and determine their bioactivities. A degenerated polymerase chain reaction technique as molecular approaches has been used for general screening of NRPS gene and PKS gene in cyanobacteria. A putative PKS gene was detected by DKF/DKR primer in 38 strains (38.8%) and PCR amplicons resulted from a presence of NRPS gene were showed by MTF2/MTR2 primer in 30 strains (30.6%), respectively. A screening of interesting strains was performed by comparing PCR screening results with HPLC analyses of extracts. HPLC analysis for a detection of natural products was performed in extracts from biomass. 5 strains were screened for further scale-up processing. 7 pure substances were isolated from the scale-up cultures and tested for bioactivities under consideration to purity, amount and molecular weight of substances. One substance isolated from CBT 635 showed cytotoxic activity. This substance may be regarded as Microcystin LR.

**Key Words** : Cyanobacteria, non-ribosomal peptide, polyketide, microcystins, anatoxins, DKF/DKR primer, cytotoxic activity

## 서 론

지구상에 존재하는 많은 미생물과 식물들에 의해서 만들어지는 Nature Products는 (이하 NPs) 이차대사물질로서 그들의 진화 과정에 중요한 역할을 해왔으며 주변 환경과 미생물간의 상호 관계 속에서 많은 생물학적 활성을 나타내고 있다(1). NPs의 낮은 분자량, 물속에서의 높은 용해도 그리고 세포막의 높은 투과성은 NPs를 오늘날의 신약개발 분야에서 핵심 관심대상이 되게 만들고 있다(2). NPs는 2003년 이후로 항암제 분야에서 74%, 항균제에서 78%의 비중을 보이고 있다. 그러나 수십 년간 bioactivity 산업의 의약학분야의 주요 source로 사용되어 왔던 육상미생물과 식물에서 얻어지는 이차대사물질은 그 범위와 생물학적 활성에 있어서 한계에 이르렀으며, 현재까지 인류에게 알려진 질병의 오로지 3분의 1 정도만이 사용 및 적용가능한 제약으로 치료가능하다. 또한 antimicrobial 클래스 급의 약제들은 자연계에서 그 내성의 증가로 인해 효능 또한 감소하고 있는 추세이다. 결국 상당수의 질병들은 아직까지도 완전한 치료가 불가능하며, 기존의 항생제에 대한 내성을 얻은 미생물로 인한 질병의 위험성도 1990년 이래로 증가하고 있고, 점점 더 그 범위가 확대되고 있다(3). 따라서 세계적으로 novel drugs에 대한 새로운 소스의 연구와 개발은 현대 의학 산업에서 절실히 요구되어지고 있다.

의학적으로 중요한 가치를 지니는 NPs는 non-robosomal peptide synthetase (이하 NRPS)와 polypeptide synthetase (이하 PKS) 모듈 시스템에 의해서 합성되어진다. 지금까지 미생물들을 대상으로 한 연구들로 인해 NRPS와 PKS 기작에

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea
Tel : +82-2-940-7154, Fax : +82-2-919-0345
E-mail : gkeun@skuniv.ac.kr

관련된 유전적인 이해가 규명되어졌고 연구되어지고 있다(4). 녹조류로 더 많이 알려진 시아노박테리아는 가장 대표적인 NRPS/PKS 관련 peptides를 생산하는 균주로써 수십억년의 진화과정 속에서의 얻어진 유전적인 분화는 NRPS와 PKS 시스템에 다양성을 부여하였다. 지금까지, Microcystins 같은 독성물질의 생산으로 그 연구가 제한적이었던 시아노박테리아는 최근 의학적으로 가장 다양한 화학적 구성과 수많은 생화학적 활성을 가진 NPs를 생산하기 위한 소스로 여겨지고 연구되어 지고 있다(5).

잠재적인 novel drug으로의 높은 발전 가능성에도 불구하고 시아노박테리아에 의해서 생산되어지는 이차대사물질들에 대한 지식은 약 15년의 짧은 역사를 가지고 있고, 그로 인해 많은 분야에서 시아노박테리아 연구가 새로이 진행 중이거나 아직 미개척 되었다. 그래서, 시아노박테리아에서 정제되는 물질들은 종종 새로운 구조나 새로운 bioactivities를 갖는다. 지금까지 약 1000여 가지의 natural compounds들이 시아노박테리아로부터 추출되었고 다양한 생화학적 활성을 나타내고 있다(3).

**Table 1.** Secondary metabolites from Cyanobacteris and their biochemical activities

| Compound | Strain | Biological activity |
|---|---|---|
| Lyngbyatoxin | *Lyngbya sp.* | Proteinase C activator |
| Anatoxin | *Anabaena sp.* | Nicotinergic agonist |
| Dolastatin | *Symploca sp.* | Anticancer |
| Aeruginosin | *Microcystis aeruginosa* | Thrombin- and trypsin inhibitor |
| Cryptophycin | *Nostoc sp.* | Tumor suppressor |
| Antillatoxin | *Lyngbya majuscula* | Ichthyotoxic |
| Microginin | *Microcystis aeruginosa* | ACE-inhibitor |
| Microcoline | *Lyngbya majuscula* | Immunsuppressive |
| Microcystine/Nodularine | *Microcystis/Nodularia* | Protein-phosphatase-1/2A inhibitor |
| Anabaenopeptine | *Anabaena flos-aquae* | Protease inhibitor |
| Nostocyclamide | *Nostoc sp.* | Antialgal, anticyanobacterial |
| Westiellamide | *Westiellopsis prolifica* | moderately cytotoxic |
| Oscillamide | *Oscillatoria agardhii* | Chymotrypsin inhibitor |
| Micropeptin 90 | *Microcystis aeruginosa* | Plasmin/trypsin inhibitor |
| Nostocyclin | *Nostoc sp.* | Protein-phosphatase-1 inhibitor |
| Microcystilid A | *Microcystis aeruginosa* | promotes cell-differentiation |
| Cyanopeptoline | *Microcystis sp.* | Antimicrobial, peptidase inhibitor |
| Micropeptine A, B | *Microcystis aeruginosa* | Plasmin/trypsin inhibitor |
| Oscillapeptin | *Oscillatoria agardhii* | Elastase/chymotrypsin inhibitor |
| A90720A | *Microchaete loktakensis* | Serine protease inhibitor |
| Aeruginopeptine | *Microcystis aeruginosa* | Chymotrypsin inhibitor |
| Calophycin | *Calothrix fusca* | Antifungal |
| Puwainaphycine | *Anabaena sp.* | Cardioactive |
| Laxaphycine | *Anabaena laxa* | Antifungal |
| Schizotrin | *Schizothrix sp.* | Antimicrobial |
| Microviridine | *Microcystis aeruginosa* | Elastase inhibitor |

http://www.cyanobiotech.com/products/background_np.html

시아노박테리아의 생성 산물중 하나인 Microginin는 angiotensin converting 효소의 (ACE) 억제의 활성을 갖고 있으며 고혈압 치료에 사용되어진다(6). 또한 Microcystin이라는 간세포에서 흡수되는 독성물질을 생체단백질 재조합 기술을 이용하여 비 독성 물질로 바꿈으로써 간질환용 의학 약품물질의 운반자로써 다른 장기의 영향없이 사용되어질 수 있다(7).

Nostoc 78-12A에서 분리 정제된 Nostocarboline는 파킨스병과 알츠하이병 치료에 관련된 특성을 보였으며 향후 신경화학치료 발달에 새로운 장을 열었다고 평가받고 있다. 여러 세계기관이나 연구단체에서 시아노박테리아의 NPs에 초점을 두고 연구하고 있으며, 시아노 균주에서 생산된 cryptophycin이나 dolastatin은 현재 치료용 항암제로 사용되어지고 있다(8).

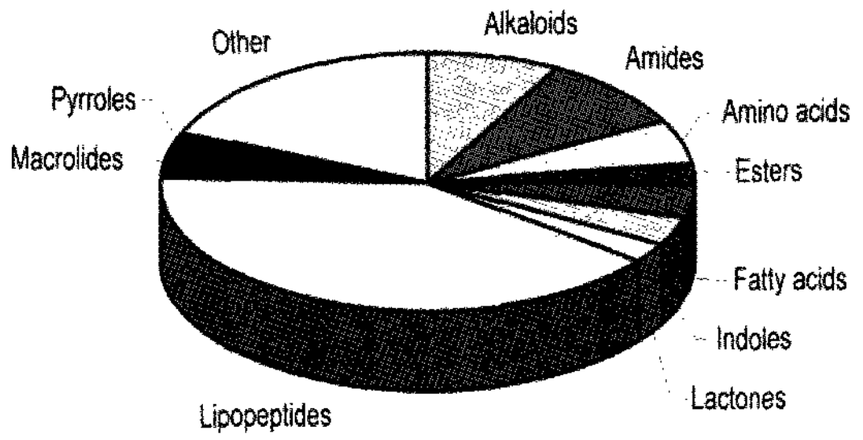



**Figure 1.** NPs from Cyanobacteria.

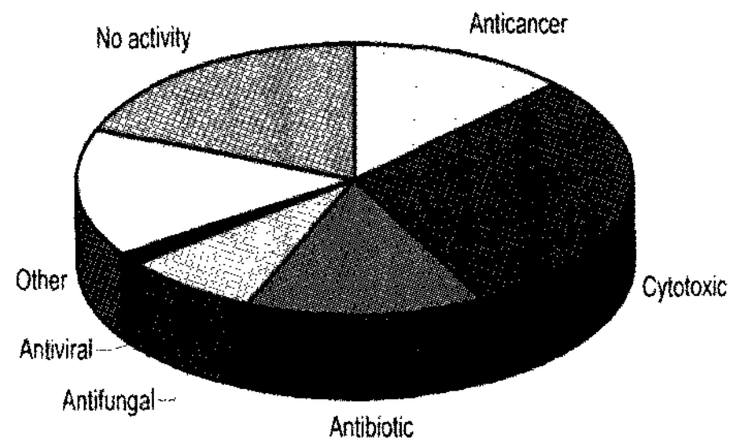



**Figure 2.** Biochemical activities of NPs from Cyanobacteria.

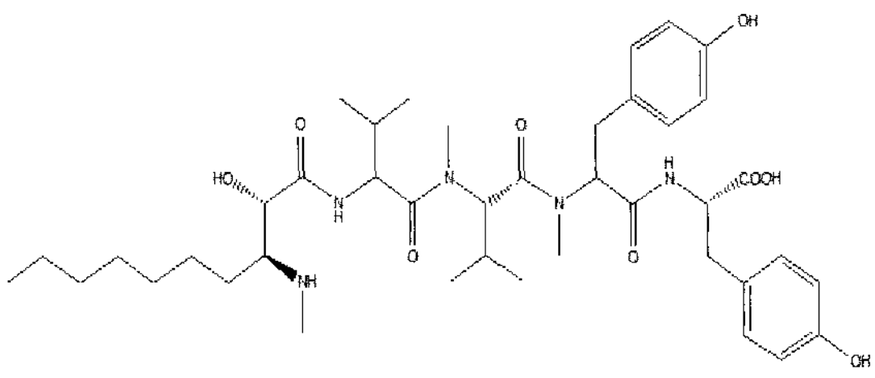



**Figure 3.** Microginin from *Micorsystis aeruginosa.*

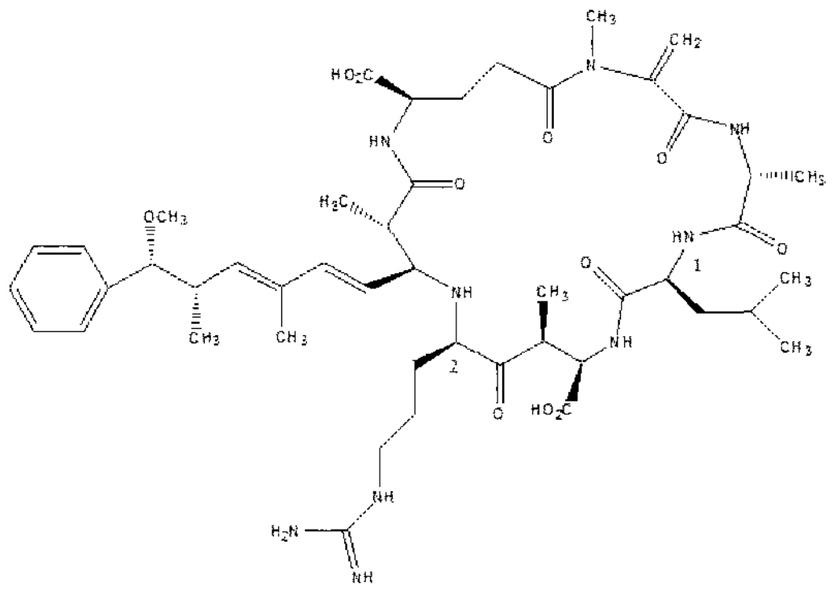



**Figure 4.** Microcystin.

Cyanobacteria는 가장 오랜 진화를 겪은 지구상의 생명체의 하나로서 지구 대기 형성에 관여해 왔으며(9), 그리고 우리 생활주변에서 쉽게 보여져왔지만 인류는 오랜동안 그 중요성을 인지하지 못해 왔다. 그러나 인류의 건강이라는 염원과 점점 치열해가는 의약분야의 세계적인 경쟁은

시아노박테리아라는 새로운 주제를 가지고 다시 격돌할 전망이다. 본 연구에서는 시아노 균주를 통해 의학약품으로 발전될 수 있는 구조적으로 새로운 molecules를 찾고 정제 그리고 특성화시키기 위한 체계적인 스크링 방법을 모색하였다. NRPS/PKS에 관련된 유전자를 탐지하는 degenerated primers가 분자유전학적 Screening을 위하여 사용되어졌고 HPLC/MS를 통해 분별정류 및 정성분석이 이루어졌다.

## 재료 및 방법

### 시아노박테리아와 배양

Cyanobiotech GmbH에서 (www.cyanobiotech.de) 제공된 균주들이 이번 실험에서 선별되었고, BG11 Medium을 사용하여 25°C에서 광배양 (대략 1500 lx) 되었다. Total DNA를 추출하기 위해서 균주들은 3주 동안 500 ml 플라스크에서 교반 배양되어진다. 균주의 농도는 Beckman spectrometer DU-50 (Beckman instruments, Fullerton, USA)에 의해서 750 nm에서 측정되어지고, OD 0.7~09 사이에서 DNA 추출과 (15 ml) HPLC 분석을 (50 ml) 위한 샘플링이 이루어진다. PCR과 HPLC을 통한 분석에 의해서 선출된 균주는 20L까지 Scale-up 되어진다. 20 L 규모의 배양시 $CO_2$ 가스가 필터를 통해 공급되어지고 획득되어지는 biomasss는 추출물질의 구조분석과 생물학적 활성실험에 사용되어진다.

**Figure 5.** Cultivation in small scale.

**Figure 6.** 20 L Scale-up.

### DNA 추출 PCR 분석

시아노박테리아의 전체 DNA는 SDS/lysozyme 방법에 의해서 추출되어진다(10) NRPS/PKS 유전자의 유무는 degenerate primers에 의한 PCR 증폭에 의해서 조사되어졌다. NPRS gene의 탐침에는 MTF2/MTR2 degenerate primer 쓰여졌고 PKS gene에는 DKF/DKR degenerate primer가 관련 유전자의 증폭과 탐지를 위해 사용되어졌다(11, 12). PCR 반응액 20 µl에는 증류수 7 µl 이외에 Taq polymerase Mix, 10 µl; DNA, 1 µl; 정방향 primer, 1 µl; 역방향 primer, 1 µl가 들어간다. PCR 반응은 94°C로 5분간의 분리과정을 거친후 증폭과정으로 94°C, 30초; 55°C, 30초; 72°C 1분을 30회 시행하였으며 72°C, 10분과 10°C로 마무리 되었다.

**Table 2.** Degenerated primers (IUPAC ambiguity codes: M, AC; R, AG; Y, CT; D, AGT; N, ACGT)

| | |
|---|---|
| DKF | 5′-GTGCCGGTNCCRTGNGYYTC-3′ |
| DKR | 5′-GCGATGGAYCCNCARCARMG-3′ |
| MTF2 | 5′-GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC-3′ |
| MTR2 | 5′-CCNCGDATYTTNACYTG-3′ |

### 16S rDNA-PCR 분석

PCR Screening과 HPLC 정성분석을 통하여 선별되어 지는 균주가 알려지지 않은 경우 16S rDNA-PCR을 통해서 동정하였다. 시아노박테리아의 16S rRNA 유전자를 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) und 1492R (5′-GGYTACCTTGTTACGACTT-3′)을 이용하여 PCR로 증폭하여 서열분석하고 그 결과를 BLAST (http://ncbi.nlm.nih.gov/)에 적용하여 비교 분석하였다. PCR 반응은 96°C로 2.5분간의 분리과정을 거친 후 증폭과정으로 96°C, 30초; 53°C, 30초; 72°C 3분을 30회 시행하였으며 72°C, 10분과 10°C로 마무리 하였다.

### Solid Phase Extraction

동결 건조된 시아노박테리아 biomass에 각각 독립실행으로 50%와 80%의 메탄올 첨가하여 ice-bath 위에서 1분간 2번씩 초음파 추출하였다. 추출액은 여러 농도의 메탄올을 이용하여 Solid Phase Extraction (이하 SPE)를 통해서 분별정제하였다. PD10-Column 또는 PD5-Column (Pharmacia GmbH, Erlangen)이 SPE를 위한 분리 컬럼으로 이용되어졌다. 이 과정을 통해서 낮은 분자량의 이온성 물질들이 분리되어지고 preparative HPLC를 통한 NPs 정제에서의 분별능력이 향상되어질 수 있다.

### HPLC 분석과 물질의 추출

초음파 추출로 얻어진 추출액은 SPE를 통해 정제된 후 감압 농축하여 용매를 증발시키고, 그리고 20% 메탄올에 용해시킨 후, 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한다. 상층액은 CE-membrance (pore size 0.45 µl)를 통해서 필터되어지고 그 다음 HPLC에 의해서 분석되어진다. Analytical HPLC에서 의해서 추출액의 정성분석이 이루어지고 preparatory HPLC에 의해서 유용한 물질이 추출 분리되어진다. Analytical HPLC에서는 모든 균주에 대해서 42분 동안 15%~55%의 아세톤니트릴로 증류수에 대해서 gradient되어졌고, 2.5 ml/min의 속도로 65분간 분석되었다. Preparatory HPLC를 이용한 물질 추출에서는 analytical HPLC의 결과를 고려하여 추출 해상도를 높이기 위하여 아세톤니트릴의 gradient 농도, 유속, icocratic 방법 등 균주마다 조건을 각기 달리하여 최적을 조건을 찾아 실험하였다. UV 검출기에서는 흡광도를 (200 nm와 238 nm) 측정하게 되며 측정된 흡광도는 전기적 신호로 바뀌어서 컴퓨터에 저장된다.

**Table 3.** The two types of HPLC apparatus used

| Type | HPLC | Column |
|---|---|---|
| analytical HPLC | CTO-10AC VP Shimadzu | Symmetry shieldTM PR18 5 $\mu$m 10 x 250 mm steel column Part No, WAT 248000 |
| preparatory HPLC | ELSD-LT Shimadzu LCMS-2010A | Discovery Bio Wide Pore C18 HPLC column 25cm x 10mm 5$\mu$m |

## 결과 및 고찰

### PCR Screening

시아노박테리아로부터 유용한 NPs를 정제하고 분석하는 과정은 (PCR 분석과 HPLC 정성분석) 시아노박테리아의 배양과 Scale-up 과정 속에서 이루어지면서 체계적인 선별 기준이 적용되어졌다. 이번 연구에서 총 98 개체의 시아노박테리아가 그들의 이차대사물질에 대해서 조사되어졌다.

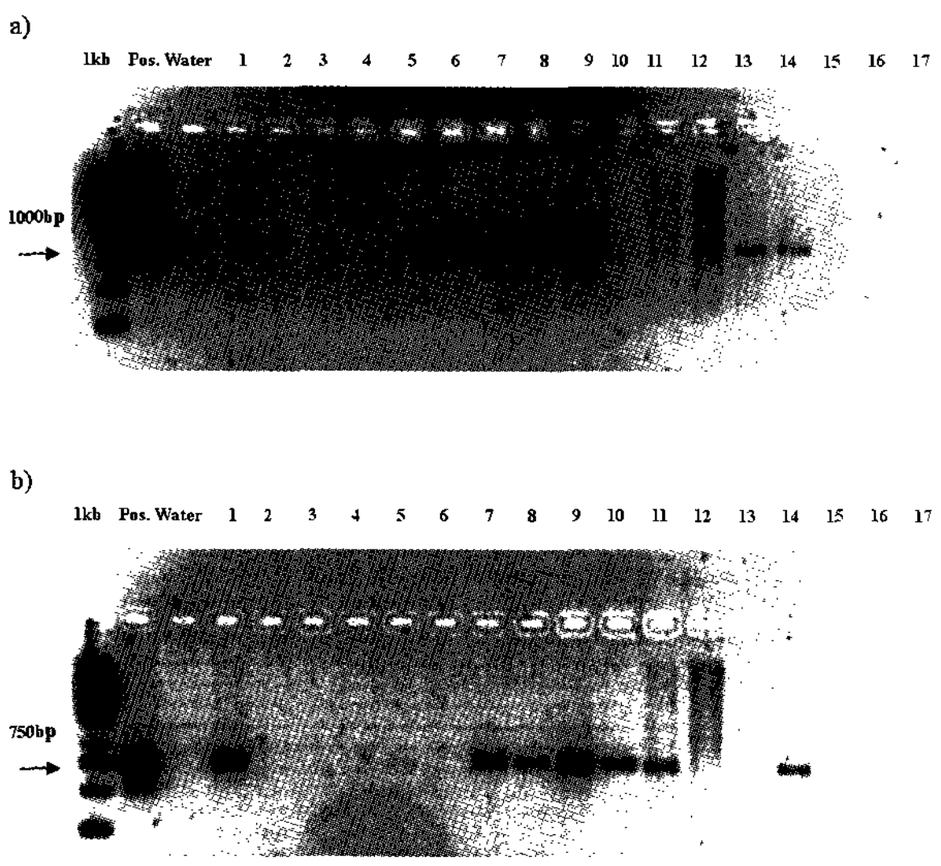



**Figure 7.** Agarose gel stained by ethidium bromide showing an example for the presence or absence of PCR amplification products of NRPS/PKS genes (a) 1,000 bp fragments were amplified by MTF2/MTR2 primer detecting NRPS gene b) 750 bp fragments were amplified by DKF/DKR primer detecting PKS gene. Positive control is abbreviated to Pos.: CBT 265 *Microcystis* sp. Strain PCC 7806, known to contain NRPS/PKS genes, Negative control: water with no DNA template, lane 1: CBT 7, lane 2: CBT 46, lane 3: CBT 48, lane 4: CBT 69, lane 5: CBT 196, lane 6: CBT 212, lane 7: CBT 217, lane 8: CBT 233, lane 9: CBT 558, lane 10: CBT 559, lane 11: CBT 645, lane 12: CBT 661, lane 13: CBT 662, lane 14: CBT 675, lane 15: CBT 682, lane 16: CBT 684 and lane 17: CBT 685)).

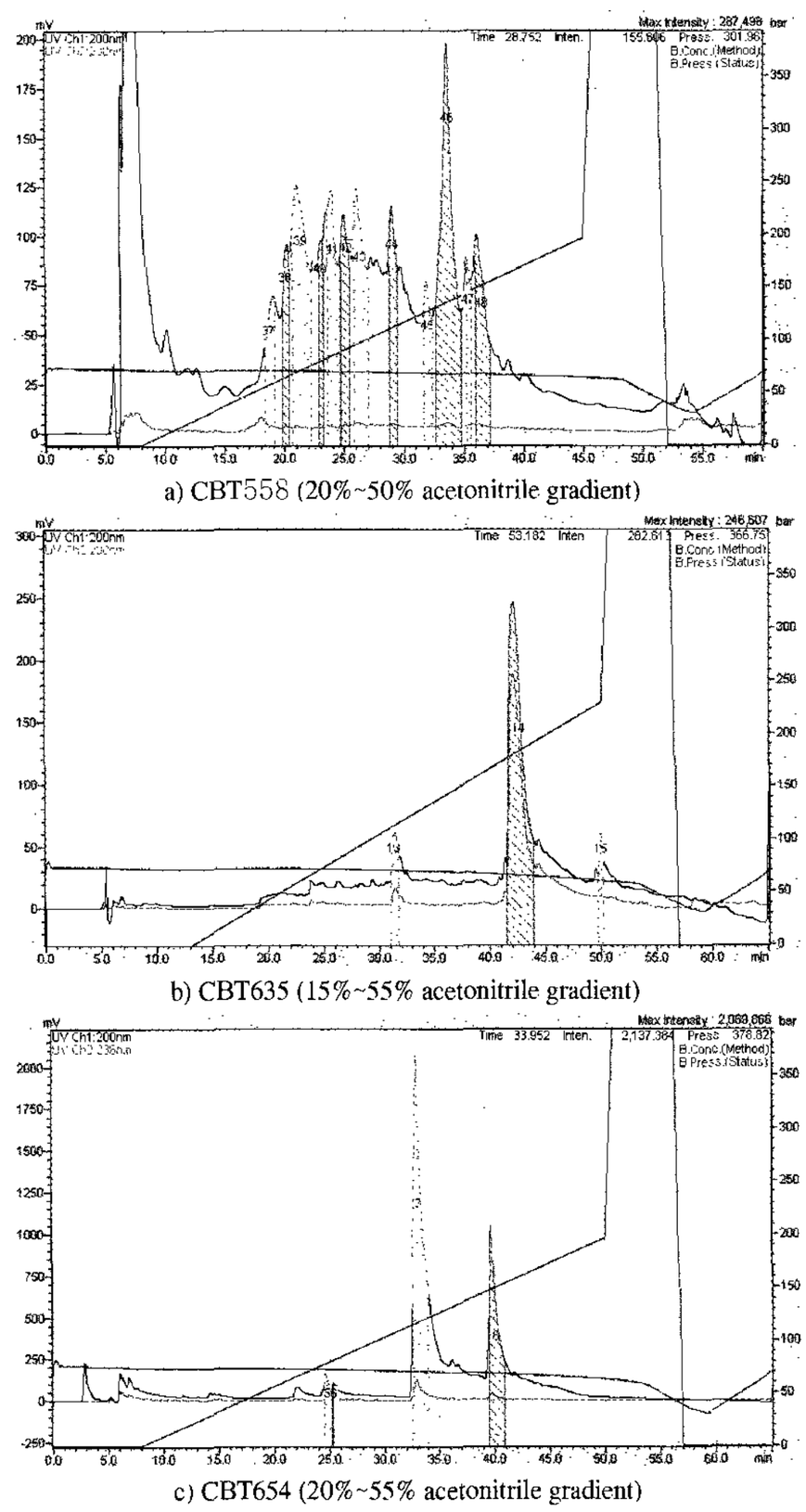
MTF2/MTR2 primer에 의한 PCR screening에 의해서 전체 실험 균주중 30개의 균주가 NRPS 유전자를 가지고 있음이 밝혀졌고 DKF/DKR primer에 의해서 38개의 균주가 PKS 유전자를 지니고 있음이 알려졌다. 이 중 22개의 균주는 양쪽 관련 유전자를 동시에 포함하고 있었다.

### SPE & 정성분석

MTF2/MTR2와 DKF/DKR primer에 의해서 증폭되는 균주, 즉 NRPS와 PKS관련 genes을 가지고 있는 균주에 대해서만 추출액에 대한 HPLC 분석이 이루어졌다. 이 두개의 degenerate primes에 의해서 검출되는 46개의 균주 중 5개의 균주에서 의미있는 peaks가 검출되어졌고 생활성 테스트와 구조분석을 위한 충분한 biomass를 확보하기 위해서 20 L까지 Scale-up 배양되었다.

**Table 4.** Screening summary based on PCR Screening and HPLC analysis. +: positive; -: negative

| Strain.Nr | Strain | MTF-PCR | PKS-PCR | HPLC/MS |
|---|---|---|---|---|
| **CBT45** | *Fischerella* | + | + | **1 peak** |
| **CBT233** | *Scytonema miriabile* | + | + | **2 peaks** |
| **CBT558** | *unknown* | + | + | **3 peaks** |
| **CBT635** | *unknown* | + | + | **>7 peaks** |
| **CBT654** | *unknown.* | + | – | **4 peaks** |



a) CBT558 (20%~50% acetonitrile gradient)

b) CBT635 (15%~55% acetonitrile gradient)

c) CBT654 (20%~55% acetonitrile gradient)

**Figure 8.** Sample of HPLC analysis (three out of five diagrams were shown).

### 16S rDNA-PCR을 이용한 균주 동정

알려지지 않은 균주, CBT558, CBT635, CBT654는 16S rDNA-PCR 분석에 의해서 동정되었다. CBT558, CBT635, CBT654는 각각 *Nostoc*, *Microcystis aeruginosa* PCC7820, *Aphanizomenon* sp.로 밝혀졌다.

**Table 5.** Analysis about unknown cyanobacteria was performed by sequencing PCR products for 16S rRNA. Gene sequence amplified by 16S rRNA-DNA primer was compared with 16S rRNA sequence of known strains by BLAST

| Strain Number | Primer | Identity |
|---|---|---|
| CBT558 | *Nostoc* | 100% |
| CBT635 | *Microcystis aeruginosa* PCC7820 | 100 % |
| CBT654 | *Aphanizomenon sp.* | 100 % |

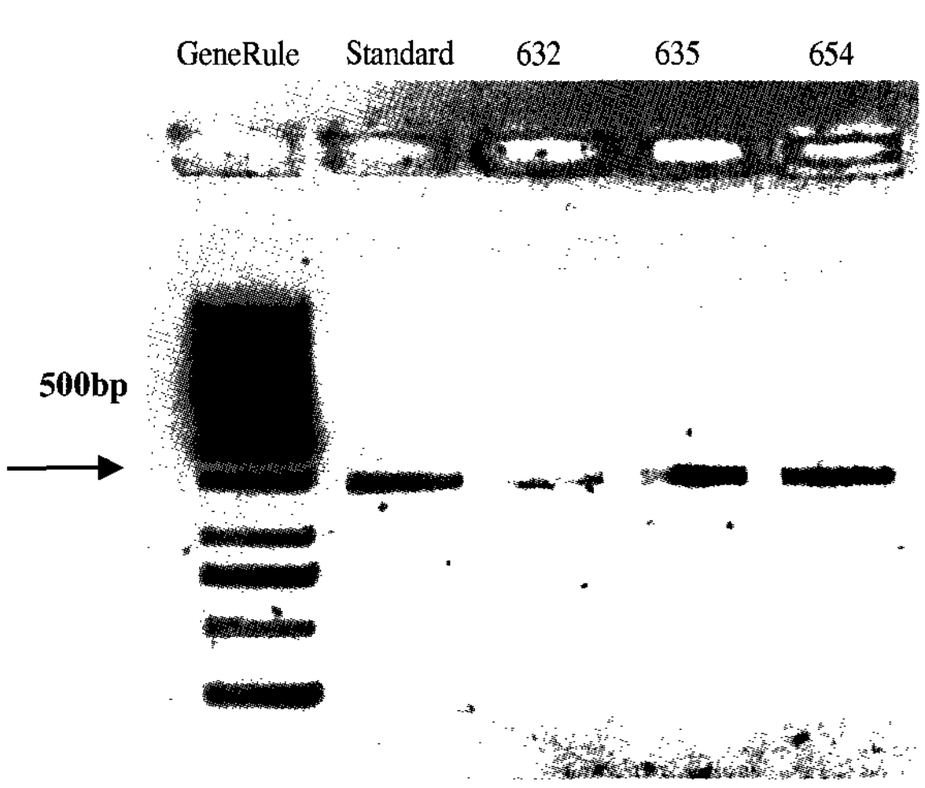



**Figure 9.** Gel electrophoresis of PCR amplification products by 16S rRNA-DNA primer (27F, 1492R). A 1,500 bp fragment amplified by specific 16S rRNA-DNA primer was sequenced. Standard is CBT 265 *Microcystis sp.* Strain PCC 7806.

### 생활성 테스트

Purity와 농도에 대한 선별로 5개의 균주 중 3개의 균주에서 추출된 7개의 pure compounds에 대해서 생물학적 활성 테스트가 이루어졌고, CBT635 (unknown)에서 80%의 cytotoxic 활성이 보여졌다.

### 분자량 분석

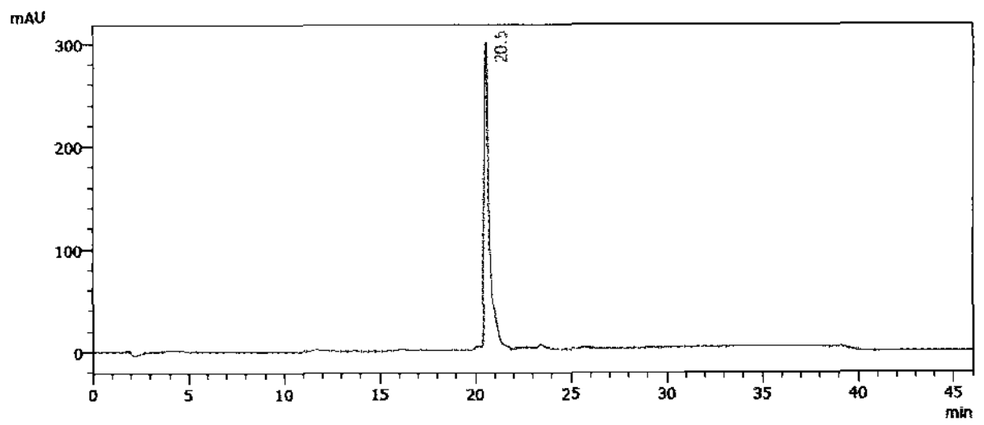
CBT635에서 추출된 Pure substance (42.2 min)에 대해서 purity와 분자량이 HPLC와 질량 분석기에 의해서 측정되었다. 분자량은 498.5로 측정되었으며 이 물질은 Microcystin LR로 생각되어진다.

**Table 6.** Human cell line and Microorganisms

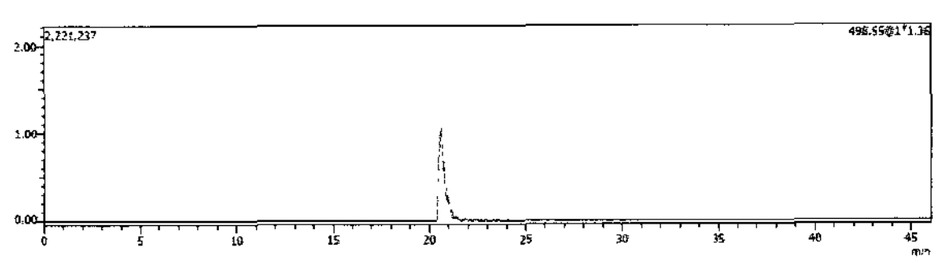
| | |
|---|---|
| Bacteria S2 | *Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus* |
| Yeast S2 | *Candida albicans* |
| Fungi S2 | *Aspergillus. fumigatus* |
| Human cell line | HeLa S3 |

**Table 7.** Bioactivity of pure substances

| Strain | Peak | Test con. | Biomass | d.w. of pure substance | Bioactivity |
|---|---|---|---|---|---|
| CBT 558 | 33.7 min | 8 μg/ml | 9.43 g | 63.3 μg | No activity |
| CBT 635 | 31.2 min | 10 μg/ml | 9.8 g | 39.3 μg | No activity |
| | 42.2 min | 10 μg/ml | | 83 μg | cytotoxic |
| CBT 654 | 34.3 min | 10 μg/ml | 6.52 g | 114.6 μg | No activity |
| | 35 min | 8 μg/ml | | 66 μg | No activity |
| | 44 min | 10 μg/ml | | 3,340 μg | No activity |
| | 55.7 min | 10 μg/ml | | 202.3 μg | No activity |




(a)




(b)

**Figure 10.** HPLC/MS chromatography of pure substance from a peak at 42.2 min in CBT635 (a) High purity was checked, b) Molecular weight measured 498.5).

## 요 약

시아노박테리아 같은 수중 미생물에 대한 2차대사물질에 대한 연구는 육상식물이나 미생물에 관련된 연구방법을 응용하고 있으며 아직까지 체계화 되어있지 않아 시아노박테리아를 보다 효율적으로 조사하기 위한 새로운 연구기술의 모색이 절실히 필요하다. 이 연구에서는 의학적인 관점에서 시아노박테리아를 조사하기 위한 유용한 접근 방법을 모색하였고 체계화시켰다. 균주마다 특성화된 최적 배양을 하였고 PCR 증폭을 이용한 분자생물학적인 방법과 HPLC를 통한 정성분석으로 의학적으로 의미있는 NPs를 생산하는 유망 균주를 선별하였다. 선별된 균주에서 나온 추출액은 SPE와 preparative HPLC를 거쳐 분리 정제되어지고, 정제된 물질들은 질량분석기에 의해 분자량과 구조가 결정되어 졌으며, 생활성 테스트에 의해서 그 생물학적인 활성을 정함으로써 의학적인 가능성이나 활용성에 대해서 고찰하였다.

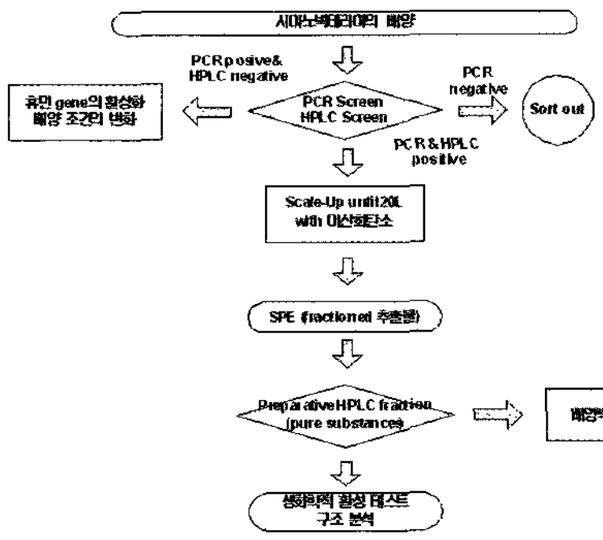



**Figure 11.** NPs research process from Cyanobacteria.

이번 시험에서 98개의 실험균주 중 46개의 균주가 NRPS 또는 PKS 관련 gene을 함유하고 있었으나 HPLC를 이용한 정성분석에서 단지 5개의 균주가 상당히 의미있는 관련 단백질을 생산하고 있음이 알려졌다. 즉, 41 균주에

서 관련 gene은 존재하였지만 그 발현이 미약하였고 또는 프로모터의 활성이 이루어지지 않았다. 이와같은 휴먼 gene의 활성화는 자외선 조사 또는 건조를 이용한 자극과 배양액의 성분 조절로 이루어질 수 있고 이를 통해 흥미 있는 결과를 이끌어낼 수 있다(13, 14). 이번 연구에서는 HPLC를 통한 정성분석은 Biomass에 대해서 이루어졌다. 그러므로 배양액으로 유출되는 extracellular substances에 대한 분석은 행해지지 않았다. 시아노박테리아가 NRPS/PKS 관련 유전자를 함유하고 있을 때, 특히 biomass에서 NPs이 검출되지 않을 경우 배양액 안에서의 존재 가능성 대해서 조사할 필요성이 요구되어진다.

시아노박테리아는 대표적인 photoautotroph 미생물로써 $CO_2$를 탄소성분과 에너지원으로 사용한다. 그러므로 *E. coli* 같은 미생물보다 배양시 경제적이고 또한 다른 종류의 미생물이 탄소영양분의 부족과 cyanobacterial NPs의 생물학적 활성에 의해서 공생하기 어려워 옥외배양을 통한 대량생산이 가능하다. 그러나, 생산되는 cyanobacterial NPs의 높은 구조적 안정성까지 포함하여 시아노박테리아는 미래의학산업의 중요한 천연소스임에 틀림이 없지만 개체 분화의 시간이 4~10시간 정도로 다른 미생물에 비해 길고 배양시 광원의 필요성 등 한계 요소를 지니고 있다(15). 그러므로 최근에는 개체 분화가 빠른 시아노박테리아나 또는 다른 미생물에 대해서 cyanobacterial NRPS/PKS gene의 heterologous expression 이 연구되어지고 있다(16).

## REFERENCES


1. Demain, A. L. (2000), Small bugs, big business: The economic power of the microbe, *Biotechnol. Adv.* **18**, 499-514.
2. Aneiros, A. and A. Garateix (2004), Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures, *Journal of Chromatography B.* **803**, 41-53.
3. Sielaff, H., G. Christiansen, and T. Schwecke (2006), Natural products from cyanobacteria: Exploiting a new source for drug discovery, *IDrugs* **9**(2), 119-127.
4. Schwarzer, D. and M. A. Marahiel (2001), Multimodular biocatalysts for natural product assembly, *Naturwissenschaften* **88**, 93-101.
5. Adams, D. G. (2000), Heterocyst formation in cyanobacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 618-624.
6. Ishida, K., T. Kato, M. Murakami, M. Watanabe, and M. F. Watanabe (2000), Microginins, Zinc Metalloproteases Inhibitors from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa, *Tetrahedron* **56**, 8643-8656.
7. Harada, K., H. Murata, Z. Qiang, M. Suzuki, and F. Kondo (1996), Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteri, *Toxicon. Dec.*, 1335-9.
8. Becher, P. G., J. Beuchat, K. Gademann, and F. Jüttner (2005), Nostocarboline: isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from Nostoc 78-12A, *J. Nat. Prod.* **68**, 1793-5.
9. Partensky, F., W. R. Hess, and D. Vaulot (1999) Prochlorococcus a marine photosynthetic prokaryote of global significanc, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 106-127.
10. Franche, X. and T. G. Damerval (1988), Tests on nif probes and DNA-Hybridization, *Meth. Enzymol.* **167**, 803-808.
11. Dittmann, E., B. A. Neilan, M. Erhard, H. von Döhren, and T. Börner (1997), Insertional mutagenesis of a peptide synthtase gene which is responsible for hepatoxin production in the cyanobacterium Microcystis PCC7806, *Mol. Microbiol.* **26**(4), 779-787.
12. Moffitt, M. C., B. A. Neilan (2001), On the presence op peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus Nodularia, *FEMS Microbiology Letter* **196**, 207-214.
13. Viczian, A., Z. Mate, F. Nagy, and I. Vass (2004), UV-B induced different transcription of psbD genes encoding the D2 protein of Photosystem II in the cyanobacterium Synechocystis 6803, *Photosynthesis Research* **1023**, 257-266.
14. Yamazawa, A., H. Takeyama, D. Takeda, and T. Matsunaga (1999), UV-A-induced expression of GroEL in the UV-A-resistant marine cyanobacterium Oscillatoria sp. NKBG 091600, *Microbiol.* **145**, 949-54.
15. Kondo, T., T. Mori, N. N. Lebedeva, S. Aoki, M. Ishiura, and S. S. Golden (1997), Circadian rhythms in rapidly diving cyanobacteria, *Science* **275**, 224-227.
16. Sielaff, H. (2003), Heterologe expression un biochemische charakterisierung von cyanobakteriellen genen des sekundär-metabolismus, Dissertation an der humboldt universität zu berlin.