

11-
154300-
001955-
01

발간등록번호

11-1543000-001955-01

첨단생산기술개발사업 R&D Report

친환경살충제 개발을 위한 방선균 이차대사산물 고생산균주 및
대량생산 시스템 개발 최종보고서

농림축산식품부

친환경살충제 개발을 위한 방선균 이차 대사산물 고생산균주 및 대량생산 시스템 개발 최종보고서

2017. 12. 22.

주관연구기관 / (주) 팜한농
협동연구기관 / 이화여자대학교

농림축산식품부



제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “친환경 살충제 개발을 위한 방선균 이차대사산물 고생산 균주 및 대량생산 시스템 개발”(개발기간 : 2014.09.25 ~ 2017.09.24)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12 . 22 .

주관연구기관명 : (주)팜한농

(대표자) 박진수 (인)

(대표자) 김용환 (인)

협동연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단 (대표자) 이근주 (인)

주관연구책임자 : 오기훈

협동연구책임자 : 남상집

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114048-3	해 당 단 계 연구 기 간	2014.09.25~ 2017.09.24	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	침단생산기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	친환경 살충제 개발을 위한 방선균 이차대사산물 고생산 균주 및 대량생산 시스템 개발			
연구책임자	오 기 훈	해당단계 참 여 연구원 수	총: 66 명 내부: 66 명 외부: 명	해당단계 연구 개발 비	정부: 900,000천원 민간: 900,000천원 계: 1,800,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 66 명 내부: 66 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 900,000천원 계: 1,800,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 팜한농 작물보호연구센터			참여기업명: (주) 팜 한 농	
협 동 연 구	연구기관명: 이화여자대학교 산학협력단			연구책임자: 남 상 집	
요약				보고서 면수	
<p>본 과제는 milbemycin 고생산균주 및 대량생산공정 개발을 목적으로 하였음.</p> <p>Avermectin 고생산균주에 milbemycin생합성 유전자를 순차적으로 도입하여 milbemycin 생산균주를 제작하였으며, milbemycin 유도체 유발유전자를 제거하였음. milbemycin 생산성을 증대하기 위하여 ① milbemycin 합성 전구물질 생산유전자 4종 도입, ② 대사특이적 조절유전자 강화, ③ 글로벌 조절유전자 5종 도입/제거 등을 통해 생산성 증가효과가 있는 유효유전자를 확보함. 무작위 돌연변이 평가를 위한 24-well 배양 기반 스크리닝 시스템을 구축하였음. 4,600 여개의 돌연변이 균주를 평가하여 생산성 증가 균주를 확보함. 유효유전자 형질 2종을 생산성이 증가된 돌연변이 균주에 적용하여 모균주 대비 3배이상 생산성이 증가된 통합균주를 확보하였음.</p> <p>대량생산공정 개발을 위한 발효배지/배양조건 최적화를 위해 실험계획법 기반 최적배지 확인 및 광범위한 첨가물 평가를 수행하여 최적 배지/배양조건을 확보하고 통합균주에 대해 적용하여 1.5g/L의 milbemycin 생산성을 확인함. 이를 기반으로 500L 발효를 수행하여 1.3g/L 의 milbemycin 생산성을 확인함. 다단계 유기용매 추출 기반 분리정제 과정을 수립하여 정제수율 73%, 상대순도 96%, 함량 95%를 확인함. 분리정제한 milbemycin 에 대해 기초안전성 및 물질동질성을 확인하고 1% EC 형태 시제품을 제작함.</p>				138 면	

<국문 요약문>

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>본 과제는 밀베마이신 (milbemycin) 고생산 균주 및 대량생산공정 기술을 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위해 avermectin 생산균주 <i>S. avermitilis</i>를 milbemycin 생산균주로 전환하였다. Milbemycin 균주생산성 증가를 위해 무작위 돌연변이 스크리닝 시스템을 통해 우수 돌연변이 균주를 확보하였다. 동시에 생산 관련 유전자를 평가 유효유전자 형질을 확보하였다. 우수 돌연변이 균주에 확보한 유효유전자 형질을 도입하여 최종 개발균주를 확보하였다. 배지 및 배양최적화를 통해 5L 발효조건을 확보하고 scale-up하여 500L scale의 발효조를 이용한 대량발효를 수행하였다. 또한 다단계 유기용매 추출법에 기반한 정제공정을 확보하고 분리 정제된 milbemycin에 대해 안전성 분석 및 물질동질성을 확인하였다. 이를 이용하여 1% EC 형태 시제품을 제작하고 생물활성을 평가하였다.</p>	
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> 1. Milbemycin 생산균주 <ul style="list-style-type: none"> - 야생형 Milbemycin 생합성 유전자집단 염기서열 확보: 70kb - Avermectin 생산균주 <i>S. avermitilis</i>에 milbemycin 생합성 유전자 순차 도입 <ol style="list-style-type: none"> ①생합성 1번 유전자 (milA1)도입: Ivermectin analogue 생산 확인(DBM-01) ②DBM-01 균주에 생합성 3번유전자 (milA3) 도입 : milbemycin 6종 생산 - 유도체 유발 유전자 제거 (DBM-04 균주): milbemycin A3, A4, D 생산 2. Milbemycin 균주 개량 <ul style="list-style-type: none"> - milbemycin 생합성 전구물질 생산 강화유전자 및 조절유전자 평가 <ul style="list-style-type: none"> 4종 유효유전자 형질발굴: DBM-04 대비 각각 1.4~1.6배 생산성 증가 (Flask) <ol style="list-style-type: none"> ① 전구체 강화 유전자 4종 도입 ② 아바멕틴 생합성 유전자 특이적 발현 유전자 (aveR) 생산성 향상 확인 ③ 세포내 global 조절유전자 5종 강화/제거, 2 종 유용형질 발굴 ④ 경쟁대사산물 oligomycin 생성유전자 제거 효과 확인 - 무작위 돌연변이 <ol style="list-style-type: none"> ① 24-well plate 배양을 활용한 균주 생산성 평가시스템 구성 ② 무작위 돌연변이를 통해 확보한 돌연변이 평가 및 우수균주 선발 - 최종 개발균주 제작 <ul style="list-style-type: none"> 무작위 돌연변이 선발균주로 유효 유전자형질 2종을 순차적으로 적용 : DBM-04 대비 milbemycin 생산성 3.3 배 증가 (Flask) 확인 3. 발효 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 숙주균주의 배지/배양조건에 기초하여 최적화 수행 - 실험계획법에 의한 배지 평가 및 추가성분에 의한 효과 검증 - 종균배양 조건, 용존산소, pH 등에 의한 배양조건 최적화 진행 - 5L Jar 발효: <ul style="list-style-type: none"> 최종 개발균주 milbemycin 생산성 ~ 1.5g/L (모균주 0.5g/L) 4. Milbemycin 발효 scale-up <ul style="list-style-type: none"> - 500L 발효조 활용 대량배양 수행 - 최종 개발균주 milbemycin 생산성 1.3g/L (5L 발효대비 85% 수준) 5. 분리 정제조건 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 다단계 용매추출법 기반의 milbemycin 정제공정 확보 <ul style="list-style-type: none"> : 정제수율 73%, 상대순도 96%, milbemycin A3+A4 함량 95% (w/w) - 재결정 조건 확인: 상대순도 97%, 함량 99% (w/w) 6. 기초안전성 평가 및 물질 동질성: <ul style="list-style-type: none"> - 급성경구독성, 급성어독성 및 급성물벼룩독성 평가 - UPLC-qTOF-HR-MS/MS 를 이용한 물질동질성 확인 7. 1% EC 시제품 제작: 대조제품 (Milbeknock: Milbemectin 1%EC)대비 점박이용에에 대한 동등활성 확인 8. DBM-01 대사체 구조 구명 및 생물 활성 확인 	



	<p>- Ivermectin analogue 6종의 구조 구명 신규구조: 5-methoxy-25-methyl-22,23-dihydroavermectin, 5-methoxy-25-ethyl-22,23-dihydroavermectin 기존구조: 5-hydroxy-25-methyl-22,23-dihydroavermectin, 5-hydroxy-25-ethyl-22,23-dihydroavermectin, 5-methoxy-25-isopropyl-22,23-dihydroavermectin (Ivermectin A1b), 5-hydroxy-25-isopropyl-22,23-dihydroavermectin (Ivermectin B1b)</p> <p>- 점박이 응애 및 나방류에 대한 생물활성 평가 : 응애에 대해서 대조물질(abamectin) 대비 활성이 낮았으나, 배추좀나방 2령충에 대해서 0.006ppm에서 90%이상 살충률을 보임.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. Milbemycin 생산기술의 활용</p> <p>- 본 연구개발과제를 통해 아바멕틴 생산균주 <i>S. avermitilis</i>를 milbemycin 생합성 유전자를 순차적으로 도입하여 milbemycin 생산균주로 전환 및 개량하고 배지 및 배양조건을 최적화 하여 Scale-up이 가능한 것을 확인하였으며, 다단계 유기용매 추출 정제 및 재결정을 통해 경제적이고 높은 수율로 고순도의 milbemycin을 확보할 수 있는 정제공정을 확보하였음.</p> <p>- 따라서, 2~3차년도 확보한 무작위 돌연변이 기술 및 유효 유전자형질등을 활용하여 milbemycin 생산균주의 생산성을 증대시키고, milbemycin A4의 비율을 강화 하는 등의 경쟁력 강화를 위한 연구 개발이 필요할 것으로 사료됨</p> <p>2. 타 연구에의 활용</p> <p>1) Ivermectin Analogue의 활용</p> <p>- 아바멕틴 생산균주 <i>S. avermitilis</i>에 milbemycin 생산유전자 1번을 도입하여 DBM-01 균주를 제작하였으며, DBM-01이 생산하는 대사물질의 구조를 구명하고, 응애 및 나방류에 대한 생물활성을 확인하였음</p> <p>- Ivermectin analogue의 주요 나방류 해충인 배추좀나방에 대한 생물활성이 전문약제인 emamectin benzoate와 비등한 정도로 우수하였음</p> <p>- Ivermectin analogue 중 5-hydroxy 형태는 알려진 구조이지만 생물활성이 뛰어나 화학적 유도체를 개발하여 안전하면서 활성이 뛰어난 전문약제 개발 가능성이 있으므로 개발가능성 및 경제성 검토를 통해 추가 개발여부를 판단할 필요가 있음</p> <p>2) 방선균 대사물질 연구 활용</p> <p>- 산업적으로 활용되고 있는 방선균에 타겟 2차 대사산물의 생합성 유전자군을 도입하여 효과적으로 타겟 물질을 생산할 수 있는 유용한 방법임을 확인하였음</p> <p>- 또한, DBM-01의 경우와 같이 PKS 합성효소의 유전자 및 module의 변환을 통해 신규 물질을 대량생산 할 수 있는 가능성을 보여줌</p> <p>- 따라서, 본 연구과제를 통해 확보한 기술을 기반으로 의약품, 동물의약품 및 작물보호제로 유망한 여러 방선균 유래의 물질의 고생산균주 및 대량생산 공정 기술 확보 기간을 단축하여 상업화 가능성을 높일 수 있을 것으로 기대함.</p>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>밀베마이신</p>	<p>스트렙토마이세스 아버미틸리스</p>	<p>이종발현</p>	<p>고생산 균주</p>	<p>대량생산</p>

<Summary>

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>The objective of this project is to obtain a milbemycin high producing strain and to develop cultivation conditions in large scale and purification process. For this purpose, <i>S. avermitilis</i> which produces avermectin was transformed into milbemycin producing strain by gene exchange. In order to increase the yield of milbemycin, a mutant strain was obtained through random mutagenesis program. At the same time, several genes related to secondary metabolite production were evaluated and valid gene traits were obtained. A final strain was obtained by introducing two valid traits into a improved strain from random mutagenesis program. Media and culture conditions were optimized for 5L fermentation and fermentation in 500L scale was performed. Also, the purification process based on multi-stage solvent extraction was developed. Safety analysis and material homogeneity were confirmed. The 1% EC prototype was prepared and evaluated.</p>		
Results	<p>1. Construction of milbemycin producing strain</p> <ul style="list-style-type: none"> - Identification of biosynthetic gene cluster for milbemycin from wilde type - Stepwise construction of milbemycin producing strain b <ul style="list-style-type: none"> ① Exchange of aveA1 of <i>S. avermitilis</i> into milA1 (DBM-01) ② Construction of milbemycin producing strain (DBM-03) by introduction of milA3 gene into ivermectin analogue producing strain - Deletion of aveD for increasing ratio of milbemycin A3 and A4 (DBM-04) <p>2. Strain improvement for milbemycin high production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of genes related to secondary metabolite production <ul style="list-style-type: none"> ① Overexpression of 4 genes to intermediate production in vivo ② Overexpression of avermectin pathway-specific regulator ③ Deletion or over-expression of 5 global regulators ④ Deletion of biosynthetic gene cluster of oligomycin ; 4 valid gene traits were obtained - Random mutagenesis <ul style="list-style-type: none"> ① Contruction of screening system using 24-well plate cultivation system ② Evalutation of milbemycin productivity of mutants - Final strain construction: integration of effective traits to the improved strain <ul style="list-style-type: none"> : 3.3 times increase in milbemycin productivity <p>3. Optimization of fermentation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Optimization of fermentation media and cultivation condition <ul style="list-style-type: none"> : the final strain: ~ 1.5g/L in 5L scale fermentation (mother strain: 0.5g/L) <p>4. Scale-up: Fermentation in 500L scale, Final milbemycin concentration: 1.3g/L</p> <p>5. Seperation and purification</p> <ul style="list-style-type: none"> - Set-up of purification process using multi-stage solvent extraction <ul style="list-style-type: none"> : Purification yield: 73% , Purity: 95~99% (w/w) <p>6. Basic safety reports and structural identity with standard materials</p> <ul style="list-style-type: none"> - Safety: acute mammal oral toxicity, acute toxicity to fish and water flea - Confirmation of identity using UPLC-qTOF-HR-MS/MS <p>7. Making 1% EC prototype and Evaluation</p> <p>8. Structural identification and activity test of metabolites from DBM-01</p>		

	<ul style="list-style-type: none"> - Identification of 6 metabolites from DBM-01 Novel structure: 5-methoxy-25-methyl-22,23-dihydroavermectin, 5-methoxy-25-ethyl-22,23-dihydroavermectin Known compounds: 5-hydroxy-25-methyl-22,23-dihydroavermectin, 5-hydroxy-25-ethyl-22,23-dihydroavermectin, 5-methoxy-25-isopropyl-22,23-dihydroavermectin (Ivermectin A1b), 5-hydroxy-25-isopropyl-22,23-dihydroavermectin (Ivermectin B1b) - Acaricidal and insecticidal activity of Ivermectin analogues Lower acaricidal activity against two spotted mite adult than abamectin High insecticidal activity (>90% @ 0.006ppm) against diamondback moth larvae 				
Expected Contribution	<p>1. Milbemycin production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Through this project, milbemycin producing <i>S. avermitilis</i>, optimized media contents and cultivation conditions, and purification process based on multi-stage organic solvent extraction and recrystallization were obtained. - Therefore, it seems that additional enhancement of the productivity and A4 ratio of milbemycin producing strain will be needed using random mutagenesis platform and effective gene traits acquired from the 2~3 years of this R&D project <p>2. Contribution of related filed</p> <p>1) Application of ivermectin analogues</p> <ul style="list-style-type: none"> - Structures of Metabolites from the strain DBM-01 constructed by introduction of milA1 into <i>S. avermitilis</i> and their activities against mites and insect were elucidated. - These metabolites, ivermectin analogues, showed high insecticidal activity against diamondback moth larvae comparable to the efficacy of emamectin benzoate. - The 5-hydroxy form of the Ivermectin analogue has a known structure, but it seems to possess the potential to develop a specialized active ingredient against lepidoptera by developing novel chemical derivatives. <p>2) R&D of metabolites from Actinomycetes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Heterologous expression of biosynthetic genes of target secondary metabolites on a industrial host is useful way of effective production of target metabolites - Also, the case of DBM-01 showed that the possibility of novel metabolites from alteration of genes or module of PKS of a industrial strain - Therefore, it is expected that it will be possible to shorten the period of obtaining the high yield strains and mass production process technology of promising metabolites from actinomycetes as pharmaceuticals, veterinary drug and crop protection agents. 				
Key words	Milbemycins	Streptomyces	Heterologous Expression	High yield strain	Mass production

<Contents>

1. Introduction	1
2. Current status of domestic and international R&D	12
3. R&D content and results	16
4. Accomplishment and contribution in the related field	121
5. Application plan	126
6. Overseas scientific technology reference	128
7. Security level of R&D accomplishments	129
8. Laboratory facility and equipment status registered in NTIS	130
9. Compliance with safety instructions of the laboratory	131
10. Representative accomplishments	134
11. Additional information	135
12. Reference	136

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	12
3. 연구수행 내용 및 결과	16
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	121
5. 연구결과의 활용계획 등	126
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	128
7. 연구개발성과의 보안등급	129
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	120
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	131
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	134
11. 기타사항	135
12. 참고문헌	136

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.



제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

작물보호제 및 동물의약품 소재로 사용되고 있는 방선균 이차대사산물인 밀베마이신 대량생산공정 개발을 목적으로 다음을 수행하였다.

- (1) 이중 생산균주 기반의 Milbemycin 생산균주 개발
- (2) 무작위 돌연변이 및 주요 전구물질 생산 및 조절유전자에 대한 평가를 통한 Milbemycin 생산균주 개량
- (3) 배양 및 배지조건 최적화를 통한 발효공정 개발 및 분리정제 공정개발
- (4) 생산된 Milbemycin을 이용한 시제품 생산

제 2절 연구개발의 필요성

1. 연구 개발의 필요성 및 중요성

가. 작물보호제 시장

전 세계 작물보호제 시장은 2012년 474억 달러로 전년대비 14.9% 증가하였으며, 인구 증가 및 육류 소비 증가로 인한 곡물 수요 증가, 이상 기후에 의한 병해충 증가와 바이오연료용 바이오매스 수요 증가 등으로 지속적 성장세를 보였다. 2015년 세계 작물보호제 시장은 제초제 238억 달러(41.4%), 살충제 167억 달러(29.1%), 살균제 153억 달러(26.7%) 및 기타 16억 달러 등 총 575억 달러에 달하며, 앞으로도 지속적인 성장이 예상된다 (그림 1).

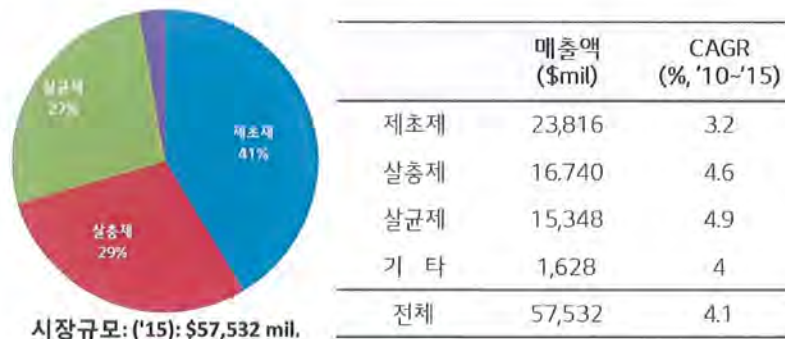


그림 1. 세계 작물보호제 시장 (Agriservice, 2016)

특히, 세계적으로 고품질 먹거리에 대한 요구가 증가하고 이에 필요한 작물보호제의 사용이

꾸준히 증가될 것이며 각국의 농업여건, 즉 미국의 농업법인이나 EU지역의 공동 농업정책 등으로 인하여 작물보호제의 사용이 증가할 것으로 예상되며, 동남아시아와 남미지역의 경제가 회복됨에 따라 작물보호제 시장 증가에 기여할 것으로 예상된다. 특히, 환경문제의 관심이 고조됨에 따라 환경 친화적인 미생물농약의 개발이 가속화되어 25억 달러 이상의 시장을 형성할 것으로 예상되고 있다.

나. 신규 작물보호제 개발

신규 작물보호제에 대한 개발수요 증가에 따라 글로벌 신규 작물보호제 개발 수는 1980년대 이후 총 367개가 개발되어 년 평균 11.5개가 개발되었으나, 2000년부터는 6.2개로 줄어들었다 (표 1). 그 원인은 1980년 이후 메이저 회사간 인수/합병으로 신규 작물보호제 개발 회사가 적어 졌고, 국제 환경 규제의 강화로 개발 비용이 증가하였기 때문이다. 또한 오리지널 개발사는 특허가 만료 될 원제에 대하여 방어 기술(제형, 종자 처리제 등) 개발에 집중하고 있으며, 추가로 종자/유전자 형질 연구로 shift 하였기 때문으로 생각된다.

특히 Phillip McDougall 사에서 주요 작물보호제 개발사를 대상으로 조사한 바에 따르면, 최근의 신규 작물보호제 출시까지 비용은 286백만불 정도로, 연구비용이 전체의 37.3%, 개발비용이 전체의 51.0%, 등록비용이 전체의 11.7% 정도가 소요되는 것으로 분석되고 있다. 1995년도와 비교 시 신규 작물보호제 출시까지의 비용은 1.3억불 이상 증가한 것을 알 수 있다 (그림 2).

표 1. 연도별 신물질 출시 수

Item	1980~1989	1990~1999	2000~2009	2010~2013	Sum	In R&D('14~'18)
Herbicides	51	57	39	4	151	10
Insecticides	29	37	27	6	99	11
Fungicides	36	30	32	14	112	10
Others	7	3	5	1	16	0
Total	123	127	103	25	378	31
No. of AI/yr	12.3	12.7	10.3	6.2	11.1	6.2

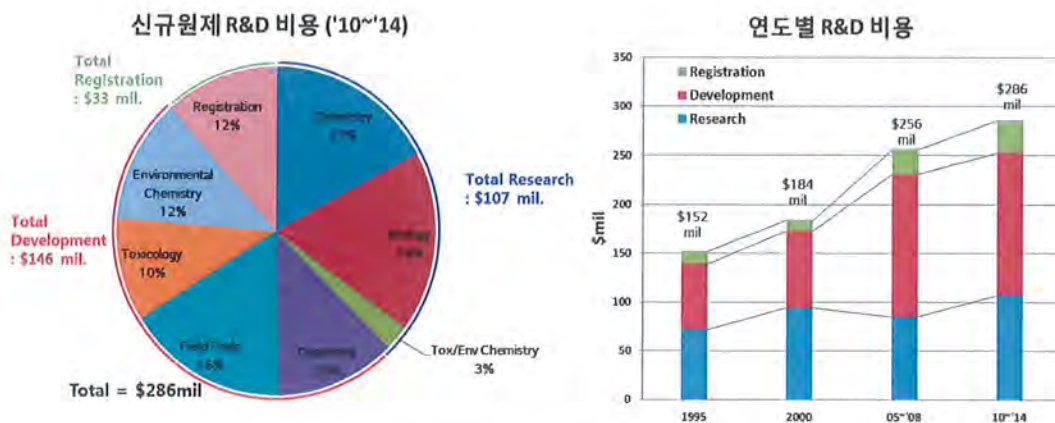


그림 2. 신규원제 R&D비용 분석 (Phillips McDougall, 2016)

신규 원제의 출시까지 소요되는 기간 역시 지속적으로 증가하여, '95년 평균 8.3년이 소요되던 개발기간이 '10~'14년 기간 동안은 평균 11.3년이 걸리는 것으로 분석되고 있다. 이는, 고속 스크리닝 시스템 및 fast track registration 과정이 도입되었음에도 불구하고, 안전성과 관련되어 요구되는 자료가 점점 방대해지고 복잡해짐에 따라 이에 대한 연구 시간이 크게 증가되었기 때문으로 생각되고 있다 (Phillips McDougall, 2016).

화합물 기반의 작물보호제의 경우 인축 독성이나 환경영향에 대한 이슈가 있다. 예를 들어 고독성 제초제인 Paraquat은 스웨덴, 중국, 한국 등에서 사용이 금지되었으며, 메소밀이나 말라치온 등의 제품 역시 재등록이 불가능한 상황이다. 또한, Glyphosate나 2,4-D 등의 합성 작물보호제의 경우 발암성을 의심받고 있다. 환경영향의 경우 꿀벌 독성으로 대표되는 생태계 오염가능성이 대두되었는데, 특히 대표적인 살충제인 Neonicotinoide 계 살충제의 경우 EU를 중심으로 사용이 제한이 논의되고 있다. 따라서, 화학물에 기반한 신규 작물보호제의 개발비용이 증가하고, 안전성 및 저항성 문제가 심화됨에 따라 개발비용을 줄이기 위한 me-too 원제의 개발이 늘고 안전성 및 저항성을 고려하여 약효가 뛰어나면서 환경영향이 적은 생물유래 작물보호제가 관심을 받고 있다.

다. 미생물 대사물질 기반 작물보호제 개발

미생물 대사물질 기반의 작물보호제 원제는 주로 미생물의 이차대사물질을 기반으로 하고 있으며 대표적으로 validamycin, polyoxin, kasugamycin, streptomycin과 같은 fungicide 및 bactericide 약제와 abamectin, milbemycin, spinosad 등의 살충제 계열로 나눌 수 있다. 특히, 미생물 대사물질 유래 살충제의 경우는 화학적 유도체를 개발하여 적용 해충의 범위를 넓혀 이용되고 있다 (표 2). 미생물 대사물질 유래의 살충제 시장은 최근 급속도로

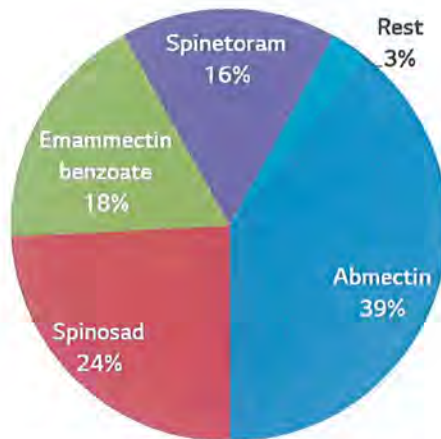
표 2. 미생물 이차대사산물 기반 살충제

계열	Avermectin		Milbemycin		Spinosyn	
성분명	Abamectin (Avermectin B1a+B1b)	Emamectin benzoate	Milbemectin (Milbemycin A3+A4)	Lepimectin	Spinosad (Spinosyn A+D)	Spinetoram
유래	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Abamectin Chemical Derivative	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>aureolacrimosus</i>	Milbemectin Chemical derivative	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Spinosyn J, L Chemical derivative
개발사	Merck (Syngenta)		Sankyo (Mitsui Chem)		Dow AgroSciences	
특허만료	'97	'11	'93	'15	'11	'17
작용기작	Glutamate-gated chloride channel allosteric modulators				Acetylcholine receptor stimulation	
적용 해충	응애, 가루이, 선충 등	나방 유충	응애, 소나무재선충	나방유충	나방유충, 총채벌레, 딱정벌레 등	총채벌레, 나방유충, 굴파리등
시장 규모 (백만\$, '15)	470	215	25	10	190	290



성장하고 있어 2009년 7.7억불 시장에서 2015년 12억불까지 연 평균 9.3%의 성장률을 기록하고 있다. 특히 미생물 유래 대사물질이기 때문에 환경에 대한 영향이 적은 것으로 인식되어 재등록이나 규제 조건 등에서 유리하다.

미생물 대사물질 유래 살충제 중 가장 시장이 큰 abamectin 은 종자처리제 시장으로 진입함으로서 약 5억불의 시장규모를 갖고 있으나 원재의 경우 중국계 Generic 업체들의 경쟁 심화로 인해 가격 하락이 심한 상황이다. 그러나 다른 미생물 대사물질 유래 살충제인 spinosad, emamectin benzoate, spinetoram 등의 성장률은 매우 크다. 반면 아직까지 milbemectin 의 시장규모는 25백만불 규모로 추정되어 과거와 거의 같은 규모로 유지되고 있는 상황이다 (그림 3).



Total market size ('15): \$ 1,200 mil

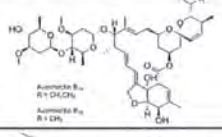
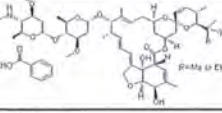
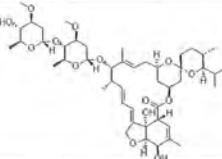
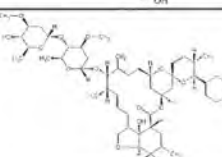
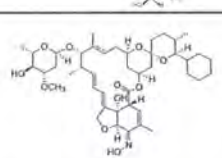
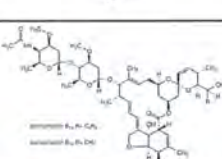
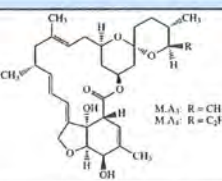
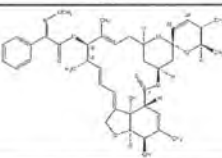
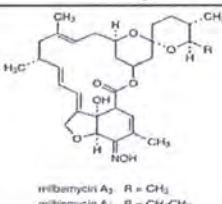
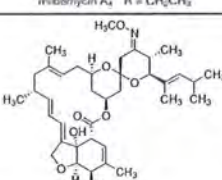
그림 3. 미생물 대사물질 유래 살충제 시장 규모 (Agriservice, 2016)

라. Milbemycin

방선균으로부터 생산되는 폴리케타이드 계열 16-membered macrolide 화합물 중 작물보호 avermectin 계열과 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*가 생산하는 Milbemycin 계열로 나눌 수 있다. Avermectin은 작물보호제로 사용되고 있는 Abamectin 및 화학적 유도체인 Emamectin benzoate 외에 동물의약품으로서 Ivermectin, Doramectin, Selamectin, Eprinomectin 등이 상업화 되었다 (표 3). Milbemycin은 작물보호제로서 Milbemectin 및 Milbemectin의 화학적 유도체인 Lepimectin이 있으며 동물의약품으로서 Milbemycin oxime이 있다. 또한 milbemycin의 유사물질인 nemadectin의 화학적 유도체 moxidectin이 상업화되어 있다 (표 3).

Milbemycin은 *Str. hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus* (Takiguchi *et al.*, 1980), *Streptomyces nanchangensis* (Sun *et al.*, 2002) 및 *Streptomyces bingchenggensis* (Xiang *et al.* 2007) 등의 이차대사산물로 알려져 있다. 현재 작물보호제로 사용되고 있는 milbemycin은 일본의 Sankyo사가 개발한 Milbemectin의 형태로 이용되고 있다 (그림 4).

표 3. 상품화된 Avermectin 및 Milbemycin 계열 미생물 대사물질

백틴계	품목명	구조	제조사	특허	제조법
Avermectin 계열	Abamectin		신젠타	특허만료 ('97년 10월)	발효 (<i>S. avermitilis</i>)
	Emamectin benzoate		신젠타	특허만료 ('11년 6월)	Abamectin에서 5단계 합성
	Ivermectin		머크, 메리얼	특허만료 ('98년 7월)	Abamectin에서 1단계 합성
	Doramectin		화이자	특허만료 ('10월 7월)	Mutasynthesis를 통한 발효
	Selamectin		화이자	특허 유지 (2019년)	Doramectin에서 3단계 합성
	Eprinomectin		Merial	특허만료 ('09년 7월)	abamectin에서 5단계 화학합성
	품목명	구조	제조사	특허	제조법
Milbemycin 계열	Milbemectin		미쯔이 케미칼	특허만료 ('93년 6월)	발효
	Lepimectin		미쯔이 케미칼	특허 유지 (2015년)	Milbemectin에서 5단계 화학합성
	Milbemycin Oxime		노바티스	특허만료 ('04년 6월)	Milbemectin에서 2단계 합성
	Moxidectin		Merial	특허만료 ('11년 3월)	Nemadectin으로부터 4단계 화학합성

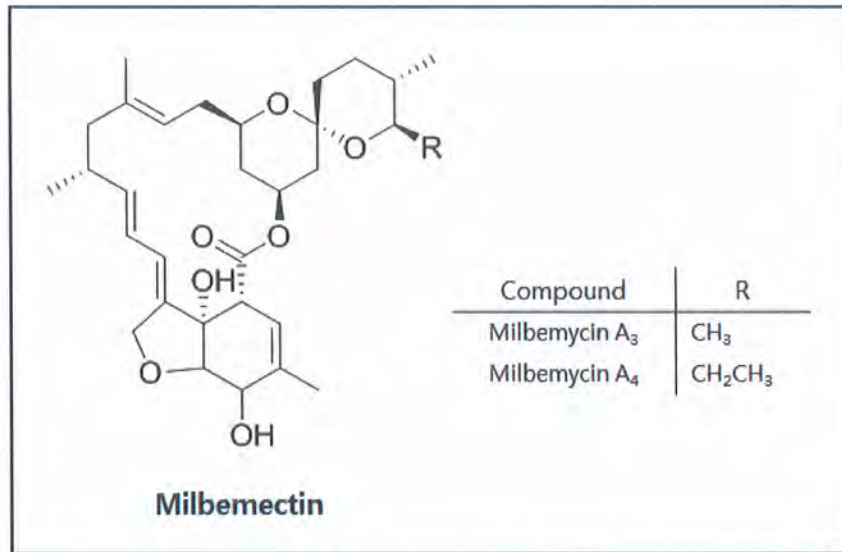


그림 4. Milbemectin의 구조

Milbemectin은 milbemycin A₃와 milbemycin A₄가 약 30 : 70 비율로 혼합되어 있는 형태로 일본의 Sankyo 사 (현 Mitsui Chemical 농업부문)에서 개발하였다. Milbemycin의 작용 기작은 abamectin과 동일하게 곤충의 신경계의 Glutamate-gated chloride channel을 stimulation하고 그 결과로 살충 활성을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다. 실제 상품화된 Milbemectin EC 1%는 표 4와 같은 살충효과를 보이는 것으로 알려져있다 (Milbeknock brochure, Mitsui Chemical). Milbemectin은 저독성 농약 (4급)으로 분류된다 [US-EPA, 2000]

표 4. Milbeknock™ (Milbemectin EC 1%)의 살충효과

	Egg	Young larva	Aged Larva	Pupa	Adult	
Spider mite	++++	++++		-	++++	++++: Excellent +++: Good ++: Fair +: Poor
Rust mite	++++	++++		-	++++	
Apple leafminer	-	+++		+++	+	
Aphid	+++	++++	++++	-	++++	
White fly	+++	++++		++	++	
Legume leafminer	++~+	++++	++	+	+	

표 4에서도 알 수 있듯이, milbemectin의 경우 주로 응애류에 효과인 것으로 알려져 있다. 특히 사과, 감귤, 고추, 딸기, 배, 수박, 장미, 차 등의 작물에서 사과응애, 귤응애, 차면지응애, 점박이응애, 감자와응애 등 번식이 빠르고 세대기간이 짧아 단시일 내에 밀도가 증가하는 응애류의 경우 빠른 내성발현이 문제가 되어 지속적으로 신규 약제가 도입되고 있는 실정이다. milbemectin과 abamectin의 경우는 다른 살비제에 비해 1/10이하의 약량으로도 효과를 보이며 아직까지 저항성 발현이 낮은 수준이다. 특히 동일 계열의 abamectin이 생애

보통독서 혹은 생태독성 1급인 반면에 milbemectin은 상대적으로 안전하며 응애 전단계 방제가 가능한 장점을 갖고 있다. 표 5에 milbemectin과 주요 살비제 원제를 비교하였다.

표 5. 주요 살비제 원제 비교

약제	Milbemectin	Abamectin	Spiromesifen	Cyenyoprafen	Bifenazate	Spirodiclofen
원제 개발사	Sankyo (현 Mitsui Chemicals)	Merck (현 Syngenta)	Bayer	Nissan	Chemtura (현 Platform)	Bayer
개발 연도	1991	1985	2005	2009	1999	2003
계열	미생물 대사물질	미생물 대사물질	Tetronic acid 계	Acrylonitrile 계	Carbazate 계	Tetronic acid 계
응애 방제	All stage	Mobile stage	Eggs & Immature	All stage	Mobile stage	Eggs & Immature
기준량 (ppm)	10	6	100	125	117.5	180
독성	저독성	보통독성	저독성	저독성	저독성	저독성
작용 기작	Glutamate-gated Chloride channel activator	Glutamate-gated Chloride channel activator	Acetyl-CoA carboxylase inhibitor	Mitochondria complex II Inhibitor	Unknown MoA	Acetyl-CoA carboxylase inhibitor

그림에도 불구하고 글로벌 시장에서의 비중을 비교하여 볼 때 작물보호제로서 Milbemycin은 abamectin에 비해 1/10 정도의 시장규모를 갖고 있으며 이는 milbemycin 자체의 가격경쟁력이 낮기 때문으로 예상된다. Abamectin의 경우는 특히 중국의 generic 업체가 다수 경쟁중이어서 원제 시장 진입은 어려운 상황이다. 반면 Milbemycin은 abamectin과 유사한 활성을 갖으면서 독성이 낮아 제조원가를 낮출 수 있다면 시장경쟁력을 갖을 수 있을 것으로 예상되었다 (그림 5).



그림 5. Milbemycin을 유효성분으로 하는 제품

이와 같이 milbemycin은 병해충의 예방에 효과적인 미생물 유래 작물보호제로서 개발 가치가 매우 높으므로 경쟁력 있는 대량생산공정을 개발한다면 시장 성장의 잠재력이 매우 높을 것으로 사료되었다.

미생물 이차대사산물을 기반으로 대량생산공정을 개발하는 데 있어 가장 많은 시간이 소

요되는 것이 고생산균주의 개발이다. 미생물 특히 방선균의 이차대사산물은 야생형 균주의 경우 수 mg/L 내외의 생산성을 보이는 것이 대부분이다. 따라서, 단기간에 milbemycin의 고생산균주를 확보하기 위해서는 이차대사산물을 효율적으로 생산할 수 있는 고생산 방선균을 기반으로 개발하는 것이 효율적일 것이다. 또한, 개발되어 있는 산업균주의 경우 대부분 연구가 활발히 진행되어 많은 정보를 얻을 수 있으며 대량 배양에 대한 여러 기술이 이미 확보되어 있기 때문에 이를 효율적으로 이용한다면 단기간 안에 이차대사산물을 효율적으로 생산할 수 있는 고생산 균주 및 대량생산 공정을 확보할 수 있을 것으로 사료되었다.

Milbemycin 고생산균주를 개발함에 있어 가장 유리한 숙주균주로서 avermectin 고생산균주를 고려할 수 있다. 이는 avermectin과 milbemycin의 물질 자체 구조가 유사하고, 출발물질을 제외하고 polyketide를 구성하는 malonyl-CoA와 methylmalonyl-CoA를 동량 요구하며, avermectin을 생산하는 *Str. avermitilis*에 대한 많은 연구가 축적되었기 때문이다. 따라서, avermectin 고생산균주를 확보하고 이를 기반으로 milbemycin 고생산균주를 개발하고자 하였다 (그림 6).

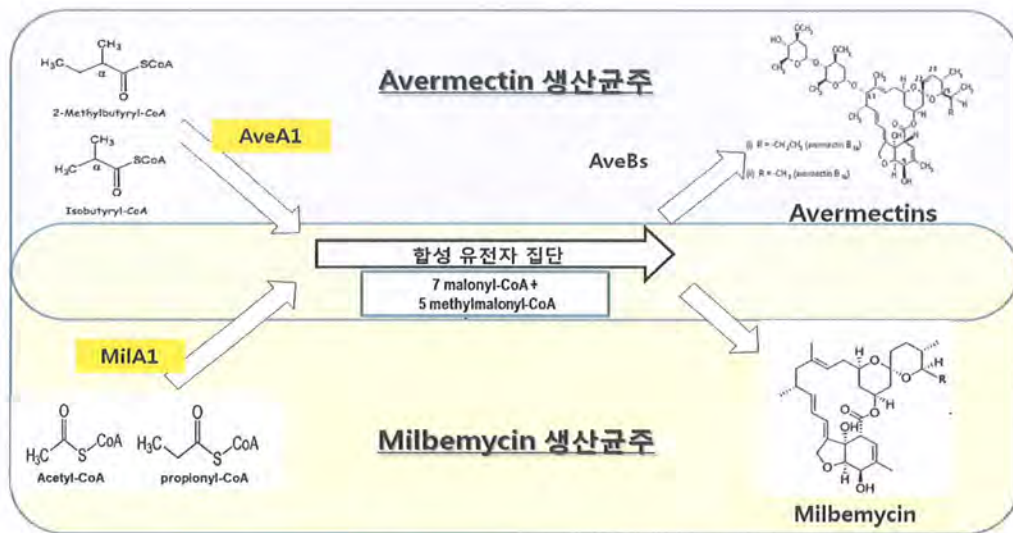


그림 6. avermectin 생산균주와 milbemycin 생산균주 비교

해외 방선균 연구의 경우 대사산물 기반 작물보호제 연구가 활발히 이뤄지고 있으나, 국내의 경우는 주로 의약품을 중심으로 조합생화학학을 통한 신규 물질 개발이 이뤄지고 있으며, 작물보호제로서 이차대사산물을 연구한 경우는 매우 드물게 보고되고 있다. 따라서, 본 연구의 개발을 통하여 국내 방선균 기반 미생물 대사물질 유래의 작물보호제 개발 연구로 국내 시장의 활성화 및 나아가 세계시장진출을 모색할 수 있는 방안을 마련할 수 있을 것으로 예상된다.

마. Milbemycin 특허분석

Milbemycin 계열 살충제의 물질특허 기간은 표 1에서 알 수 있듯이 주요 타겟 물질로

삼은 milbemycin (milbemectin)은 물질특허의 제한이 없어 본 과제를 통하여 milbemycin 고생산 균주 및 대량생산 공정 기술의 개발시 대량생산에 의한 상업화가 가능할 것으로 판단하였다. 또한, 본 연구과제에서 목표로 하고 있는 avermectin 고생산 균주 기반 milbemycin 고생산 균주 및 대량생산 공정 기술 관련 특허는 현재까지 보고되지 않아 본 연구과제를 통하여 지적재산권 확보 및 기술의 확보가 가능할 것으로 사료되었다.

제 3 절. 연구개발 범위

1. 연구개발의 최종 목표

가. 최종 목표

milbemycin 대량생산공정 (생산성 1.5g/L)을 개발하고 이를 기반으로 1% EC 형태의 시제품 개발을 하고자 함.

나. 세부 목표

- (1) milbemycin 생산균주:생산성 2.5 g/L의 milbemycin 고생산균주 확보
- (2) 발효조건 scale-up (300L 발효조 기준): milbemycin 농도 2.5g/L
- (3) 정제조건 최적화: 정제 수율 60%, milbemycin 순도 95% 이상
- (4) 원제품과 동질성 확인
 - (가) milbemycin 순수분리 및 구조분석
 - (나) 기초안전성 자료확보
- (5) 시제품 생산: 1% EC

2. 과제별 연구개발의 목표 및 내용

가. 제1 세부과제: Milbemycin 생합성 유전자 집단 확보 및 대량생산 공정개발 (㈜팜한농)

- (1) Milbemycin 생합성 유전체 집단분석
 - *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*의 생합성 유전자집단 확보 및 염기서열 분석
- (2) milA1 삽입균주 개발
 - Milbemycin 1번 생산 유전자인 milA1의 avermectin 생산균주 도입
- (3) Milbemycin 고생산 균주 확보
 - 돌연변이를 통한 균주 개량
 - Milbemycin A4 생산 강화 균주 개발
- (4) Milbemycin 생산공정 시스템 확립 및 대량 생산 공정 개발
 - Flask 수준에서의 숙주균주인 avermectin 고생산 균주 생산 최적화 및 균주 개량
 - 5L Jar fermenter 수준에서의 이중발현 균주인 milbemycin 고생산 균주의 milbemycin 생산 최적화
 - 실험계획법을 통한 배지 조건 최적화 (위탁연구)

- Milbemycin 분리정제 공정 개발
- Milbemycin 대량 배양공정 scale-up
- Milbemycin 순수분리 및 구조분석
- 기초안전성 자료 확보
- 시제품 제작

(5) DBM-01 대사물질 생물활성 검증

- 용에 및 나방류에 대한 생물활성 확인

나. 제1 협동과제: Milbemycin 고생산 균주 개발 (이화여자대학교)

(1) Avermectin 고생산 균주의 유전자 조작법 확립

(2) Milbemycin 이중생산 균주 제작

- milA3 유전자 삽입을 통한 milbemycin 생산균주 제작

(3) 대사공학을 통한 Milbemycin 생산균주 개량

- Milbemycin A4 생산 강화 균주 개발
- 전구체 생산 강화를 위한 유전자 조작
- 조절유전자 조작을 통한 milbemycin 생산성 향상

(4) Milbemycin 등의 분석방법 확립

- Milbemycin 및 avermectin HPLC 분석조건 확립
- Milbemycin 및 avermectin ESI/MS 분석조건 확립

3. 연차별 세부목표

구분	세부연구목표	가중치 (%)	평가의 착안점 및 기준
1차년도 (2014)	Milbemycin 야생생산균주의 생산유전자 집단 분석	20	• 생합성 유전자집단의 염기서열 분석 완료 여부
	Milbemycin 생산유전자집단 조립	20	• Milbemycin 생합성 유전자 집단의 클로닝 여부
	Avermectin 고생산 균주의 유전자 조작법 확립	5	• Control vector의 형질전환 여부
	이중균주로 이용하기 위한 avermectin 고생산 숙주균주 개량	15	• Avermectin 생합성 유전자 집단 제거 균주 제작 여부
	Flask 수준에서의 숙주균주 발효조건 최적화	20	• Total avermectin 3 g/L
	5L 발효조에서 숙주균주 발효	10	• Total avermectin 2 g/L
	Milbemycin 생산 확인을 위한 분석 방법 확립	10	• Milbemycin 및 Avermectin HPLC 분석조건 확립 여부 • Milbemycin 및 Avermectin LC-ESI/MS 분석조건 확립 여부

2차년도* (2015)	Milbemycin 이중생산균주 제작	20	<ul style="list-style-type: none"> • milA3 유전자를 avermectin 고생산 균주 내 도입한 균주의 제작 • milbemycin A4 생산강화 균주 개발 진행
	대사공학을 통한 Milbemycin 생산균주 개량	15	<ul style="list-style-type: none"> • 전구체 생산 강화 유전자 및 조절유전자 도입균주 제작여부
	생산균주 개량	15	<ul style="list-style-type: none"> • milbemycin A4 생산강화균주 개발 진행 • 돌연변이를 통한 균주개량 • Milbemycin 생산농도 1g/L 이상
	5L 발효조 생산공정 최적화	20	<ul style="list-style-type: none"> • milA1 균주 및 milbemycin 생산균주 발효조건 최적화 • 실험계획법에 의한 배지 최적화 진행
	Milbemycin 분리정제 공정 개발 연구 진행	20	<ul style="list-style-type: none"> • Milbemycin 분리정제공정 개발 -추출 유기용매 설정, 조건 확립 -분리정제수율 40% dltkd
	DBM-01 및 milbemycin 생산균주 생물활성 검증	10	<ul style="list-style-type: none"> • 점박이용에 및 배추좀나방 활성 검증
3차년도 (2016)	Milbemycin 생산균주 개량	25	<ul style="list-style-type: none"> • 조절 네트워크 최적화: Milbemycin 생산농도 2.5g/L
	대량생산 공정 확립 및 시제품 생산	75	<ul style="list-style-type: none"> • 300L pilot 발효조를 이용하여 대량 배양공정 Scale-up - 300L scale, 발효농도 2.5 g/L • 정제조건 최적화 - 정제수율 60% 이상 • milbemycin 순수분리 및 구조 분석 - 원제품과의 동질성 확인 • 기초 안전성 자료 확보 - 원제품과 동질성 확인 • 시제품 생산 - 1% EC

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 미생물 대사물질 유래 살충제 생산균주 개발 동향

1. Avermectin 생산균주 *Str. avermitilis*의 개발

가. *Str. avermitilis*의 개량

Avermectin을 생산하는 방선균인 *Str. avermitilis*의 abamectin 생산성을 올리기 위한 최근의 연구는 거의 중국 내 연구기관이 주도하고 있다. 야생형의 *Str. avermitilis*의 경우 8종류의 avermectin을 생산하고 있는데, 이중 유효성분인 B1a의 함량과 발효농도를 증가시키기 위한 연구가 집중되었다. 중국 내 연구가 시작된 '88년 초기 0.009g/L 였던 B1a의 발효농도는 '15년 9g/L 까지 약 1,000 배 증가하는 결과를 보였다 (Chen *et al.*, 2016).

개발 초기 연구방향에 있어 균주의 개발은 주로 무작위 돌연변이를 유발하여 스크리닝 하는 방법을 활용하였다 (표 6). 이러한 고전적인 방법은 노동집약적이긴 하지만 오랜기간 유효성을 검증받아왔다. 특히, High throughput screening 결합하여 각 돌연변이의 활성을 빠르게 비교함으로써 균주 생산성 향상 속도를 빠르게 증진시킬 수 있었다 (Gao *et al.*, 2010). 배지 및 배양조건의 최적화에 있어서 실험계획법을 활용하여 배지 성분의 최적화를 수행하였으며, 여러 전구물질 첨가물 및 탄소원의 추가첨가 등을 통해 avermectin B1a의 생산성을 향상시켰다 (Gao *et al.*, 2009). 또한, avermectin 생산성에 중요한 역할을 하는 DO (dissolved oxygen) 및 OUR (Oxygen uptake rate) 등을 control 함으로써 20% 이상의 생산성 향상을 꾀할 수 있었다 (Yin *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2011).

표 6. *Str. avermitilis*의 avermectin 생산성 향상에 사용된 mutagen (Ref. Chen *et al.*, 2016)

Class	Mutagens
Physical mutagenesis	Ultraviolet rays (UV)
	$^{12}\text{C}^{+6}$ Heavy ion beams
	Co^{60} gamma rays
	High-magnet gravitational environment (HMGE)
	RF APGD plasma jet
	Spaceflight
Chemical mutagenesis	MMS (methyl methanesulphonate)
	N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)
	Nitrous acid (NA)
Composite mutagenesis	UV + HNO_2 + NTG+ L-Ile
	UV + LiCl
	UV + NTG
	Co^{60} gamma rays - Met-5-fluorouracil

나. Metabolic engineering

avermectin 고생산성 균주 개발을 위해 전구물질의 공급과 조절유전자 강화/제거등이 주요하게 연구되고 있다.

(1) 전구물질 공급 강화

*Str. avermitilis*의 생합성 유전자 집단 및 genome sequence가 밝혀지면서 아바멕틴의 생합성 전구물질인 methylmalonyl-CoA, malonyl-CoA 및 starter unit의 공급을 늘리기 위해 및 당의 transporter에 관여하는 *malEFG*의 과발현 등 carbon source의 이용성을 증가시키기 위한 노력이 있었다 (Li et al., 2010). 또한, 방선균의 다양한 2차 대사산물의 생산에 관여하는 것으로 알려진 S-adenocylmethionine (SAM)의 세포내 농도를 증가시키기 위해 SAM 합성효소를 도입하였다. 이 경우 야생형의 *Str. avermitilis*에서는 avermectin의 생산성 향상을 확인할 수 있었으나, 산업균주에서는 생산성 향상이 확인되지 못하였다 (Yoon et al., 2006, Zhao et al., 2013).

(2) 조절유전자의 강화/제거

Avermectin 생합성 유전자 집단 및 전구물질 합성에 관여하는 일련의 대사관련 효소의 발현 조절은 타이트하게 조절되고 있다. 우선적으로 avermectin 생합성 유전자 집단 발현에 관여하는 pathway specific regulator인 *aveR*의 제거는 avermectin 생합성을 완전히 저해하였으며, 과발현의 정도에 따라 avermectin의 생산성에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다 (Kitani et al., 2009, Guo et al., 2010). 그 외의 다양한 조절유전자들이 직간접적으로 avermectin 생합성 유전자 집단 및 전구물질과 경쟁 이차대사산물의 생산에 관여하고 있고 이들을 강화/제거함으로써 avermectin의 생산성에 대한 영향을 평가하였다. 이들은 크게 *hrdB*, extracytoplasmic function sigma factor 등의 sigma factor, ribosome recycling factor (*frr*), autoregulatory signaling, avermectin 생합성 전구물질 합성에 관여하는 조절유전자들로 나눌 수 있었다.

2. 이중 숙주균주를 이용한 방선균 2차 대사산물의 생산

이중의 2차 대사산물 고생산 방선균을 숙주균주로 이용하여 타겟 2차 대사산물의 생산성을 증진시킨 연구가 지속되어왔다 (표 7). 표에서 알 수 있듯이 고생산성 균주를 숙주균주로 이용하여 효과적으로 생산성을 증진시킬 수 있음을 알 수 있다.

미생물 대사물질을 이용한 살충제인 *spinosad*의 경우에 있어서도 원 균주인 *Saccharopolyspora spinosa*로부터 *spinosad*의 생합성 유전자집단을 확보하여 erythromycin 고 생산균주인 *Sac. erythraea*의 erythromycin 생합성 유전자 집단의 위치에 순차적인 재조합 방법을 통해 도입하고, 이를 UV 돌연변이 및 대사공학적인 방법을 통해 생산성을 증가시킴으로써 *spinosad* 고생산 균주를 확보하였다 (Huang et al., 2016).

표 7. 이중 산업균주를 이용한 타겟 물질의 생산성 증가 예 (Baltz, 2010)

PKS Class	타겟 물질	모균주 생산성	이중균주 및 도입시 생산성	비고
PKS type I	Daptomycin	<i>Str. roseosporus</i> (120mg/L)	<i>Str. lividans</i> (55mg/L)	PKS 유전자집단 도입
	Migrastatin	<i>Str. plantensis</i> (58mg/L)	<i>Str. albus</i> J1074 (186mg/L)	
	A54145	<i>Str. fradiae</i> (135mg/L)	<i>Str. ambofaciens</i> (386mg/L)	
	Hybrid 16-membered macrolide	<i>Str. fradiae</i> (야생형)	<i>Str. fradiae</i> 산업균주 (~2g/L)	Hybrid PKS
	Erythromycin	<i>Sac. erythraea</i> (200 mg/L)	<i>Sac. erythraea</i> 생산균주 (1.3g/L)	산업균주 생산성 유지
PKS type II	Midecamycin	<i>Str. fradiae</i>	<i>Str. mycarofaciens</i> 산업균주 (1g/L)	산업균주 생산성 유지
	Tetracenomycin	<i>Str. glaucescens</i> (0.2~0.6g/L)	<i>Str. cinnamonensis</i> (3~5g/L)	

*Str. avermitilis*의 경우에 있어서도 최근 다른 방선균 유래 이차 대사산물을 생산하기 위한 숙주균주로 사용하고자 하는 시도가 있어왔다. Komatsu 등은 *Str. avermitilis*의 주요 이차 대사산물을 생산하는 생합성 유전자 집단을 제거하고 여기에 타 균주 유래 이차대산물 생합성 유전자 집단을 도입하여 이차 대사산물이 효과적으로 생산됨을 확인하였다 (Komatsu et al., 2013). 또한, *Str. avermitilis*의 avermectin 생합성 유전자의 일부를 치환하여 ivermectin 및 ivermectin 유사물질을 생산한 것이 보고되었다 (Huang et al., 2015, Zhang et al., 2015).

3. Milbemycin 생산균주의 연구 동향

현재까지 milbemycin 및 milbemycin congener를 생산하는 것이 밝혀진 균주는 다음과 같다 (표 8). 이중 nemadectin polyketide synthase의 module 구성은 milbemycin polyketide

표 8. Milbemycin 및 milbemycin congener를 생산하는 것으로 알려진 방선균

균주	보고 년도	개발그룹	주요 생산물질	Ref
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>aureolacrimosus</i> (현 <i>Str. milbemycinicus</i>)	1980	Sankyo Co., Ltd (Mitsui Chem)	Milbemycins	Takiguchi, 1980
<i>Streptomyces cyaneogriseus</i> sp. <i>noncyanogenus</i>	1988	American Cyanide	Nemadectin	Carter, 1988
<i>Streptomyces nanchangensis</i>	2002	Shanghai Jiaotong Univ.	Meilingmycin (Milbemycin congener) Nanchangmycin	Sun, 2002
<i>Streptomyces bingchenggensis</i>	2007	Northeast Agricultural Univ.	Milbemycins	Xiang, 2007

synthase의 module 구성과 상이한 것으로 알려져 있다.

milbemycin 생산균주로서 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*에 대한 연구는 주로 야생형 균주 및 돌연변이 균주가 생산하는 다양한 milbemycin congener에 대한 구조 및 생합성 경로를 구명하는 것에 초점이 맞춰져 왔다. milbemycin의 생산과 관련하여서 scale-up시 milbemycin 생산성을 유지하기 위한 key factor로서 용존산소량이 중요함을 보고한바 있다 (Okada and Iwamatu. 1997).

균주의 생산성 향상에 관한 연구는 주로 *Str. bingchengensis*를 대상으로 보고되어 왔다. 조절유전자인 nsdA의 삭제를 통하여 milbemycin A4의 생산성이 0.67 mg/ml에서 1 mg/ml로 약 1.5 배 향상되었고, nanchangmycin은 0.23 mg/ml에서 2.07 mg/ml로 약 9 배 향상됨이 보고되었다 (Wang et al. 2009). *Str. bingchengensis*에서 milbemycins A3/A4에 메틸화 시키는 milD를 삭제하여 1.3 mg/ml에서 2.2 mg/ml로 milbemycins A3/A4의 생산성을 향상시켰음이 보고되었다 (Zhang et al., 2013). 또한, plasma mutagenesis 및 genetic engineering을 통해 5'-oxomilbemycins A3/A4의 생산량을 모균주 대비 2배 가량 증가시켰다 (Wang et al, 2014). 또한, milbemycin 생합성 집단의 발현에 관여하는 pathway specific activator인 milR 유전자를 고생산 *Str. bingchengensis*로 도입하여 milbemycin의 생산량을 모균주 대비 38% 증가시켜 최대 4 g/L의 milbemycin 생산균주를 보고하였다 (Zhang et al. 2016). 따라서, Milbemycin 생산균주에 대한 연구가 지속되고 있음을 알 수 있다.

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 개발 전략의 개요

1. 밀베마이신 생산균주 제작

Avermectin 고생산 균주를 숙주균주로 하여 밀베마이신 생산유전자를 도입함으로써 밀베마이신 생산균주를 제작하고자 하였다. 목표물질인 Milbemycin 과 숙주균주가 생산하는 avermectin은 그림 7 에서 알 수 있듯이 화학물의 구조상 3곳의 차이점이 있다.

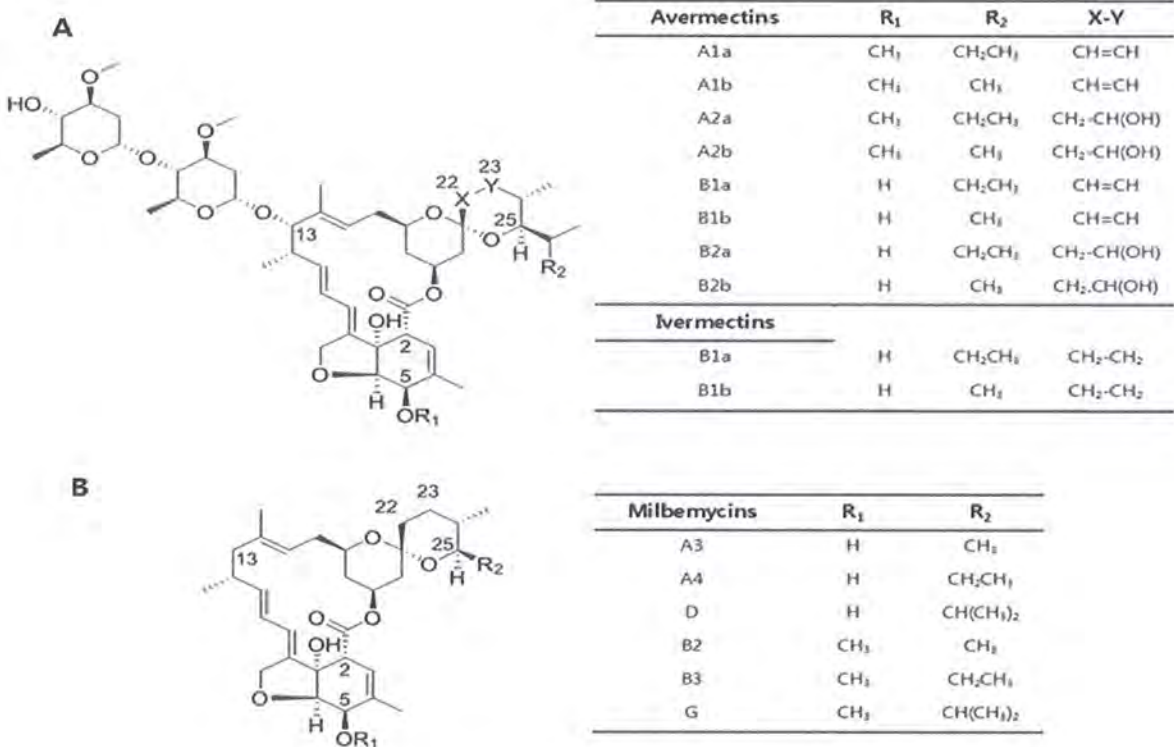
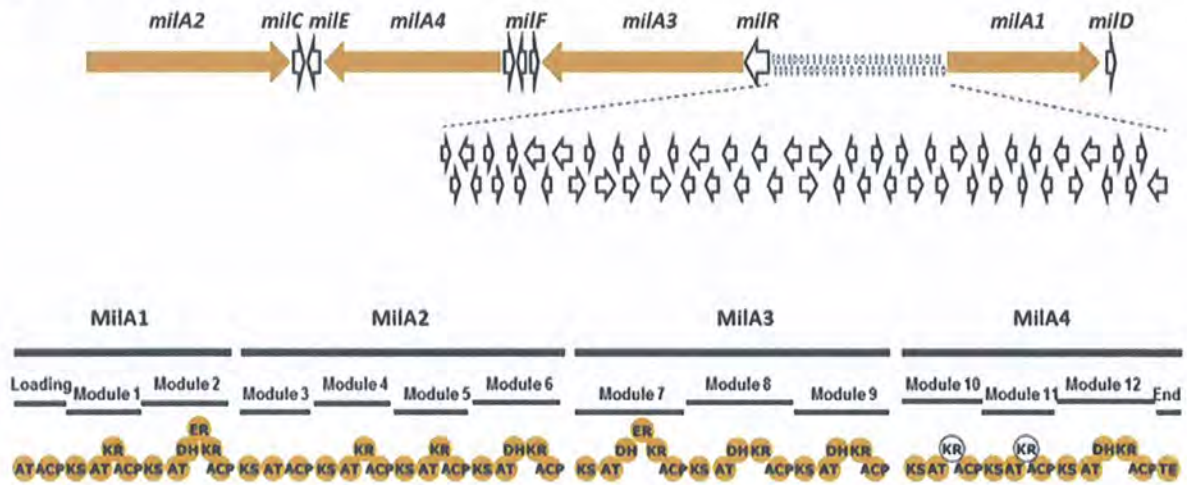


그림 7. Avermectin 및 milbemycin의 구조

하나는 13번 탄소에 hydroxyl group의 유무로 avermectin의 경우 -OH가 있어 이후 당이 결합하나 milbemycin은 -OH group이 없는 alkane 형태로 존재 한다. 다른 곳은 25번 탄소 위치의 알칸사슬의 크기 차이로 avermectin은 isopropyl, sec-butyl 형태로, Milbemycin은 methyl과 ethyl 형태이며, 또 다른 곳은 22번-23번의 탄소결합으로 avermectin은 double bond로 milbemycin은 single bond로 구성된다.

22번-23번 탄소결합 및 25번 탄소 위치의 알칸사슬의 크기는 avermectin 또는 milbemycin을 합성하는 polyketide synthase (이하 PKS) 1번 유전자에 의하여 결정되며, 13번 위치의 -OH의 존재는 각 PKS 3번 유전자 내의 module 7번의 domain 구성에 의해 결정된다. 따라서, avermectin PKS gene cluster 에서 avermectin과 milbemycin의 차이를 결정하는

A *S. bingchenggensis* BCW-1



B *S. avermitilis* SA-01

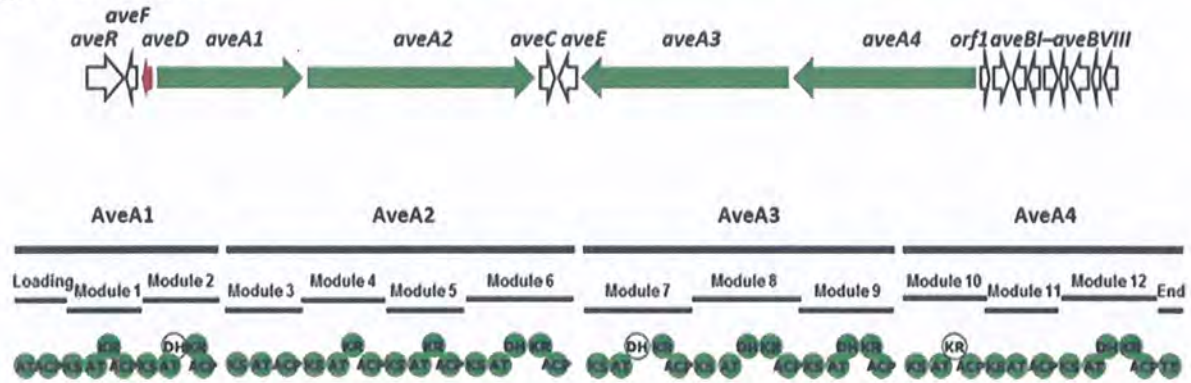


그림 8. *Str. bingchenggensis* BCW-1 유래 milbemycin 생합성 유전자집단과 *Str. avermitilis* SA-01의 avermectin 생합성 유전자집단의 구성 비교

유전자인 aveA1를 milA1로, aveA3를 milA3 (혹은 aveA3의 module 7을 milA3의 module 7)으로 치환하는 경우 avermectin 고생산 균주를 milbemycin 생산 균주로 전환할 수 있을 것으로 예상하였다. 이는 milbemycin 생산유전자 집단 전체를 도입하는 것과 동일한 효과를 보일 것으로 예상하였다. 또한, milbemycin 과 avemectin의 구조적 차이를 유발하는 milbemycin 생산유전자인 milA1과 milA3 (혹은 module 7) 만을 순차적으로 도입함으로써 milbemycin 생산균주로의 전환을 효율적으로 수행하고자 하였다.

2. Milbemycin 생산균주의 개량

Milbemycin 생산량을 증가시키기 위해 avermectin의 5-methyl 형태의 유도체를 생성하는데 관여하는 것으로 알려진 aveD의 활성을 우선적으로 제거하여 milbemycin A3, A4 및 D의 생산비율을 증가시키고자 하였다. 확보된 milbemycin 생산균주를 대상으로 milbemycin 합성에 이용되는 세포내 전구물질의 생성량을 증가시키기 위한 대사공학 기반의 유전자 강화 및 milbemycin 생산과 관련한 pathway specific 생산성 향상을 유발하는 것으로 알려



진 1) 대사공학 기반의 milbemycin 생합성 전구체 생산 강화에 의한 고생산균주 개발 및 2) milbemycin 생산과 관련한 pathway specific 조절유전자와 global 조절 유전자를 제거 혹은 강화하고자 하였다.

1차적으로 avermectin의 5-methyl 형태의 유도체를 생성하는데 관여하는 것으로 알려진 aveD의 활성을 제작된 milbemycin 생산균주에서 제거하였으며, 연구 개발 기간 동안 유전자 제거 혹은 강화를 통해 milbemycin 생산성을 증가시킬 수 있는 유효 유전자 형질을 발굴하고 더불어 균주 개량에 널리 사용되고 있는 무작위 돌연변이 방법을 적용하였다. 이를 위해 random mutagenesis 조건의 설정 및 24-well plate를 활용한 균주 생산성 평가 시스템을 개발하여 균주 평가 시간을 단축하고자 하였다. 또한, milbemycin A4의 시작 전구물질 생산 유전자 도입 및 시작 전구물질을 선호하도록 효소를 개량하여 요구되는 milbemycin A4의 비율을 증가시키고자 하였다.

최종적으로 생산성이 강화된 통합균주를 확보하기 위해 무작위 돌연변이를 통해 얻어진 우수균주에 대해 생산성 향상이 검증된 유효 유전자 형질을 순차적으로 도입하였다.

3. 배지/배양 최적 조건의 선정

milbemycin 생산균주의 배지 최적 조건 선정을 위해 기존 avermectin 고생산 균주에서 사용되고 있는 생산배지를 기반으로 하여 생산능력이 우수한 탄소원 및 질소원을 비교하여 선정하고자 하였다. 또한, 미량원소 첨가 시 milbemycin의 생산에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 일련의 연구에서, milbemycin과 같은 macrolide의 생산성 향상을 위해 전구물질인 acetyl-CoA, propionyl-CoA, malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA의 전구물질로 사용될 수 있는 아미노산이나 유기산을 배지 내 첨가하여 생산성 향상을 보인바 있다. 따라서, 이에 근거하여 숙주균주 및 제작된 균주의 배지상에 아미노산이나 유기산 등을 첨가하여 milbemycin 생산성 향상에 영향을 파악하고자 하였다.

Flask 배양을 토대로 결정된 최적발효 조건을 바탕으로 소형 발효조 (5 L)에서 최대 생산 조건을 선정하기 위해 종균배양 조건 및 생산배지 성분 및 여러 물리 이화학적 조건을 결정하고 300L 스케일 발효조에 적용하고자 하였다.

4. 분리 정제과정 최적화

제작된 milbemycin 생산균주로부터 milbemycin을 효과적으로 분리 정제하기 위해 유기용매를 이용한 추출방법을 확보하였다. 또한, silica column chromatography를 기반으로 milbemycin 분리 정제법을 확보하고자 하였다. 또한, 보다 경제적으로 유리하고 환경친화적인 다단계 유기용매 추출법에 기반한 분리 정제공정을 개발하고자 하였다.

5. Milbemycin 분석법 확립 및 안전성 검증과 시제품 생산

표준품 milbemycin A3, milbemycin A4 등을 활용하여 milbemycin의 분석법을 확립하였다. 분리정제된 milbemycin을 분석하여 표준품과 물질의 동등성을 확인하고 기초안정성 자료를 확보하였다. 또한 1% EC 시제품을 제작하여 대조제품과 활성을 비교하였다.

제 2 절. Milbemycin 생산균주의 제작

1. Milbemycin 야생생산 균주의 생산유전자 집단 분석

가. Milbemycin 생산유전자 염기서열 분석

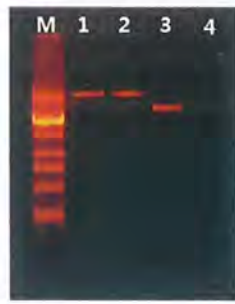
milbemycin 계열의 물질을 생산하는 방선균 균주로서 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*, *Str. bingchenggensis* 및 *Str. nanchangensis* 등이 알려져 있다. 이중 *Str. nanchangensis*의 경우는 meilingmycin (milbemycin 유사체)의 생산유전자 집단, *Str. bingchenggensis*의 경우는 미생물 전체 genome sequence가 알려져 있다. 그러나, 본 연구에서 사용된 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*의 경우 milbemycin 생산유전자 집단에 대한 염기서열이 알려진바 없다. 따라서, milbemycin 생산 이종균주를 제작하기 위해서 milbemycin 생산유전자 염기서열 분석이 필요하였다.

나. milA1의 염기서열 분석

Str. bingchenggensis 및 *Str. nanchangensis*의 milbemycin 생합성 유전자집단은 폴리케타이드 합성에 관여하는 4개의 유전자 milA1, milA2, milA3, 및 milA4와 spiroketal formation을 유도하는 milC, furan ring을 형성하는 milE, 5번 탄소위치의 ketone group을 hydroxylation 하는 milF 및 milF에 의해 생성되는 hydroxyl group을 methylation 시키는 milD로 구성되어 있다. 이 중, 첫번째 유전자인 milA1의 경우, 일반적인 polyketide synthase gene 과 달리 milbemycin 생합성유전자집단지역과 염색체 상에 100 kb 이상 떨어져 있는 것으로 알려져 있다 (Wang et al. 2010). 따라서, 이를 1차 유전자 분석 타겟으로 선정하였다. 우선, milbemycin 생산을 확인한 야생형 균주인 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus* 염색체로부터 milA1을 PCR로 증폭하기 위해 GenBank상에 등록된 *Str. bingchenggensis* 및 *Str. nanchangensis*의 milA1 (혹은 meiA1)의 염기서열을 기반으로 Primer를 합성하였다 (표 9).

표 9. milA1 염기서열 분석을 위한 primer design

Primer Name	Sequence	Tm	Position	Direction
A1CT1-F	GCAAGGTCGTCCTTTGTGTGC	61.8	9024	Forward
A1CT2-F	CGATGAGAAGAGCGATACGTC	60	9181	Forward
A1MD1-R	CGGTGGTAGGTGAGGGTTT	59.8	9693	Reverse
A1MD2-R	TGGTGGACGAGGGTAGTGA	60.1	9906	Reverse
A1NT1-F	GAGGGACGCTGCTATGTGA	60	286	Forward
A1NT1-R	CCGTCAACCGTGGAGTAGA	59.7	5040	Reverse
A1NT2-F	GAACCGTGTGCGGAAGAA	60.8	682	Forward
A1NT2-R	GAGGTTGGTGAGGATGTGGT	59.8	5287	Reverse



Lane	Name	크기
M	1 kb ladder	
1	NM11	9.4 kb
2	NM21	9.0 kb
3	CT12	5.6 kb
4	CT22	5.6 kb

그림 9. PCR 증폭단면의 회수

milA1 의 예상 크기는 13kb 정도로 PCR로 한번에 증폭하기엔 너무 크기 때문에 두 부분으로 나누어 위 Primer를 조합하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭 후 비특이적 band가 없는 DNA fragment를 회수하고 (그림 9), 이를 T-vector에 cloning 하였다. 확보된 Cloning vector에 대한 염기서열을 결정하고 GenBank 상에 등록된 *Str. bingchenggensis*의 milA1 유전자와 염기서열을 비교하였다. 그 결과 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*의 DNA 염기서열은 GenBank 상에 등록된 *Str. bingchenggensis*의 DNA 염기서열과 100% 동일하였다 (NM21: 9,012 bp, %GC =73%; CT22: 5,616bp, %GC = 74%). milA1과 동일지역에 존재하는 milD의 경우 역시 *Str. bingchenggensis*의 milD와 100% 동일하였다.

다. milbemycin 생산유전자 집단염기서열 결정

milbemycin 생합성 유전자집단의 염기서열 분석을 위해 *Str. bingchenggensis*의 milbemycin 생합성 유전자집단의 염기서열에 기초하여 전체 유전자 집단을 10kb 정도 나눠 PCR primer를 design하였다. 앞서 milA1의 경우와 동일하게 PCR을 통해 DAN를 증폭한 후, T-vector에 클로닝하고 DNA 염기서열을 결정하였다.

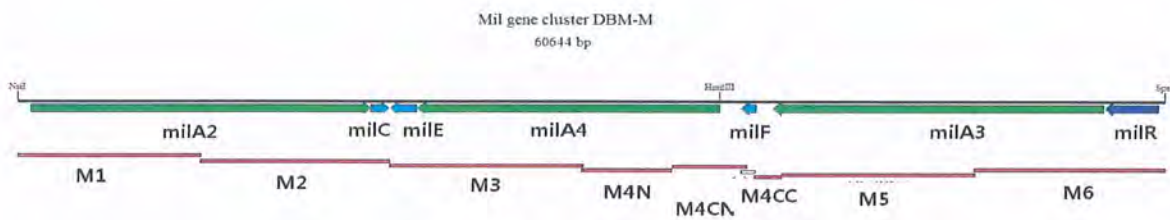


그림 10 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus* 의 milbemycin 생산유전자 집단

그 결과, *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus* 생산유전자 집단의 염기서열은 기존 GeneBank 상에 등록된 *Str. bingchenggensis* 의 milbemycin 생합성 유전자집단의 염기서열과 매우 유사함을 알 수 있었다. 각 fragment의 염기서열 분석결과와 *Str. bingchenggensis*의 염기서열 비교결과를 표 10에 정리하였다.

라. milbemycin 생산 유전자집단 유전자 분석



milbemycin 생합성 유전자 집단에 존재하는 각 유전자에 대한 ORF 정보와 milbemycin을 생산하는 *Str. bingchenggensis*, *Str. nanchangensis*와 *Str. avermitilis*의 avermectin 생합성 유전자 집단간의 상호 비교 결과 milA1, milC, milE, milF, milR은 *Str. bingchenggensis*와 DNA level에서 100% 동일하였지만, milA2는 *Str. bingchenggensis*와의 homology가 상대적으로 낮은 것으로 파악된다 (표 11).

표 10 DNA Clone 염기서열 정보

Fragment	예상크기(bp) Str. bingchenggensis		Plasmid Clones	<i>Str. hygrosopicus</i> subsp. <i>aureolacrimosus</i> 실제크기	지역	동등성 identity
M1	9,640		M1-12, M1-15	9,748	milA2 앞부분	89%
M2	9,539		M2-1, M2-2	10,046	milA2 뒷부분, milC	94%
M3	10,180		M3-1, M3-2	10,205	milE, milA4 앞부분	99%
M4	M4N	4,598	M4N-3	4,808	milA4 중간부분	99%
	M4CN	3,407	M4CN-3	4,018	milA4 뒷부분	100%
	M4CC	1,496	M4CC-1	1,498	milA3 끝부분	100%
M5	10,183		M5-2	10,207	milA3 뒷부분	99%
M6	10,194		M6-1, M6-4	10,172	milA3 앞부분, milR	99%

표 11. 야생형 균주의 milbemycin 생합성 유전자 집단의 염기서열 비교

Gene	ORF (Open Reading Frame)	Homology with (%)		
		<i>Str. bingchenggensis</i>	<i>Str. nanchangensis</i>	<i>Str. avermitilis</i>
milA2	17,992 bp/5992 aa	86.8	96.2	58.9
milA3	17,460 bp/ 5819 aa	97.3	96.0	59.9
milA4	15,903 bp/ 5300 aa	99.4	97.2	67.6
milR	2,817 bp/ 938 aa	100	98.0	51.2
milC	993 bp/ 330 aa	100	98.5	50.6
milE	1,380 bp/ 459 aa	100	99.8	60.0
milF	783 bp/ 260aa	100	98.5	63.4
milA1	13,032/ 4343 aa	100	97.0	55.9

2. Milbemycin 고생산 균주개발을 위한 유전자 및 균주조작법 확립

가. 유전자 발현 벡터의 선별

본 연구에서 이중숙주균주로 사용되는 *Str. avermitilis*의 생산 물질인 avermectin과 목표 물질 milbemycin의 구조적 차이인 C22-23 위치의 탄소결합 및 C25 위치의 알칸사슬의 형태는 polyketide synthase (PKS)의 A1 유전자에 의해 결정된다 (그림 4). 또한, C13 위치에서 당의 결합을 형성하게 될 -OH 존재유무는 해당 PKS의 A3 유전자 내 module7의 구성 도메인 차이에 기인한다. 즉, avermectin PKS module7의 경우 KS-AT-nonfunctional DH-KR-ACP로 이루어진 반면 milbemycin 생합성 유전자 집단의 module7은 KS-AT-DH-ER-KR-ACP로 구성되어 있다. 따라서, avermectin 고생산 모균주인 *Str. avermitilis* SA-01 의 aveA1을 milA1으로 치환한 균주를 제작하고 이로부터 생성되는 대사



물질을 확인한 뒤, 추가적으로 aveA3 대신 milA3 (혹은 module7)를 발현하여 최종 목표물질인 milbemycin을 생산하고자 하였다. 이를 위한 milbemycin 유전자 도입 벡터는 pKC1139 및 pSET152로 선별하였다.

온도 민감성 *E. coli*-*Streptomyces* shuttle 벡터 pKC1139는 plasmid mediated-homologous recombination에 익히 사용되어 오고 있는 것으로, 특정 유전자 영역의 삭제 및 원하는 유전자로의 치환이 가능하여 milbemycin 유전자의 avermectin 고생산 균주내로의 삽입에 용이할 것으로 사료되었다. 한편, pSET152는 *Streptomyces* chromosome의 phage-attachment site인 attB site에 선택적으로 integration이 가능한 벡터로 erythromycin 생산 균주 유래의 강력한 promoter인 ermE*가 클로닝되어 있다 (그림 11).

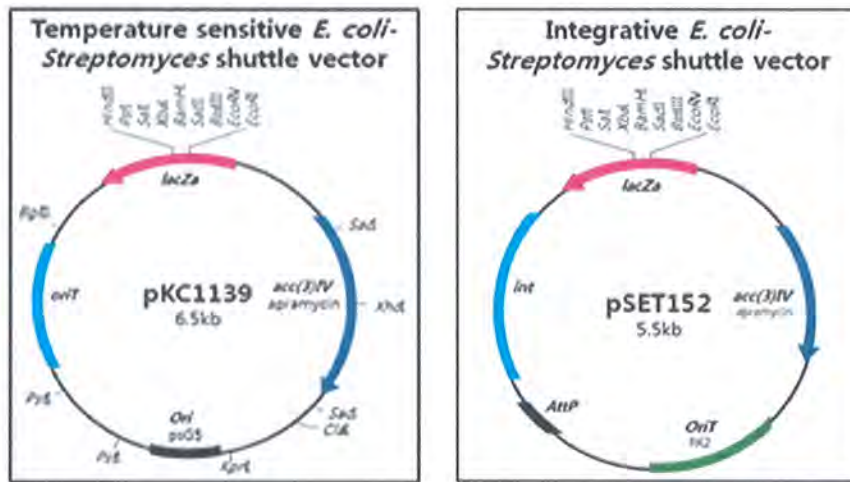


그림 11 유전자조작을 위한 *E.coli*-*Streptomyces* shuttle vector

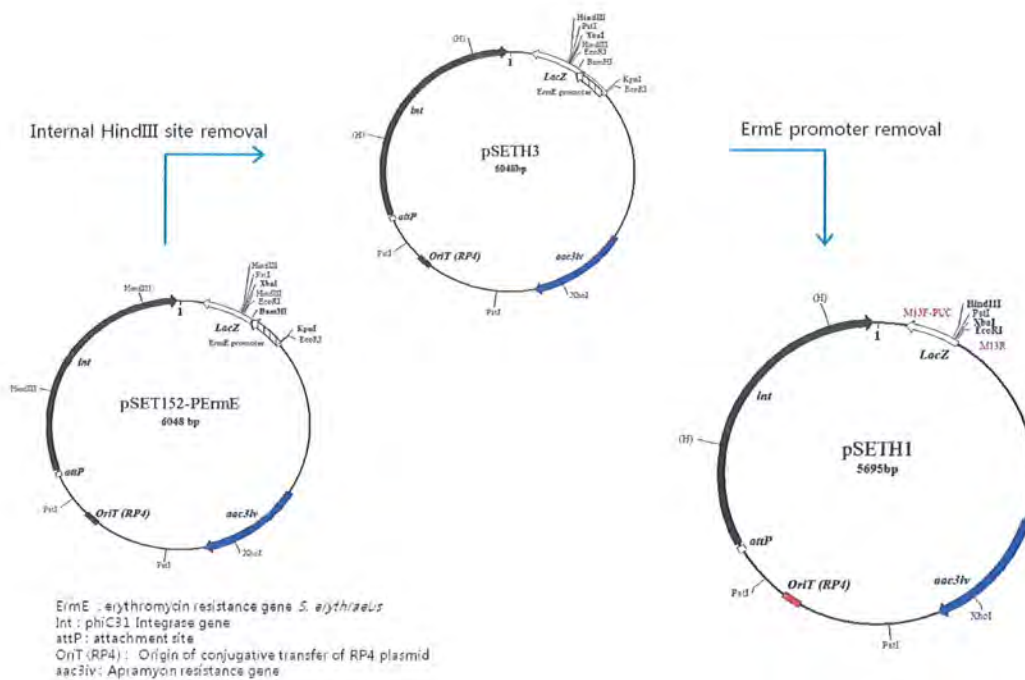


그림 12. pSETH1의 제작

경우에 따라, ermE* promoter에 의한 강제적 전사가 아닌 Native promoter를 이용하여 생산균주의 자연스러운 발현 조절을 받는 것이 유리한 경우가 있다. 이를 위해 pSET152의 ermE promoter와 벡터의 HindIII 인식부위를 제거한 벡터를 자체제작하고 pSETH1으로 명명하였다 (그림 12).

나. Avermectin 고생산 균주의 형질전환법 확립

*Str. avermitilis*에 적용 위한 형질전환법으로는 protoplast를 우선 제작하여 이에 DNA를 섞어 배양하여 형질전환을 수행하는 방법과 donor strain으로 *E. coli*를 사용하는 conjugation 방법을 사용하였다.

(1) 형질전환 (Transformation)

숙주균주인 avermectin 고생산성 균주의 형질전환을 위해 기존 문헌을 참조하여 방선균의 일반적인 형질전환이 가능한지 여부를 확인 하였다. Protoplast를 이용한 형질전환 시 protoplast 제작에 필요한 P medium 및 P buffer의 조성은 다음과 같다 (표 12, 13).

표 12 Protoplast 제작을 위한 시약조성

P medium	g/L	P buffer	g/L
Glycerol	10.0	Sucrose	205.0
Yeast extract	10.0	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.97
Sucrose	205.0	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12.81
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.97	KCl	0.075
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12.81		
Glycine	10.0		
			pH 6.6

표 13. Protoplast 제작을 위한 시약조성

2X P buffer	g/L	R medium	g/L
Sucrose	410.0	Sucrose	205.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.95	Glycerol	5.0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	25.6	NaCl	2.0
KCl	0.15	KNO ₃	1.0
		NaHPO ₄ ·2H ₂ O	0.53
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50
		KH ₂ PO ₄	0.10
		Trace element	100ul
		Agar (0.4%)	4.0
pH 6.6		pH 6.5	

Avermectin 생산 균주의 spore를 25 mL의 P medium (표 12)을 포함하는 baffled flask (250 mL) 에 분주하고 200 rpm, 28 °C에서 45~48 시간 배양하였다. 이 배양액을 4000 rpm, 15 °C에서 원심분리하고 상층액을 제외한 나머지를 P buffer (표 13)에 넣어 격렬하게 섞어 준 뒤 이 과정을 한번 더 반복하였다. 이후, P buffer를 넣고 lysozyme solution을 처리하여 30 °C에서 45분간 50 rpm으로 shaking incubation 시켰다. Lysozyme 반응액을 filtering 후



4000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 이 과정을 동일하게 한번 더 수행하여 protoplast를 제조하였다 (-70 °C 보관). Protoplast로 제조된 균주내로 삼입할 plasmid DNA는 2X P buffer (표 13)에 섞어준 뒤, 실온에 꺼내어 둔 protoplast에 swirling하여 50 % PEG1000 첨가한 후 가볍게 재 swirling한 채 실온에서 1분간 반응시켰다. P buffer를 넣어 반응을 중지시킨 뒤 실온의 R medium (표 13)을 반응종료된 반응액에 섞어 R medium agar plate에 도말하고 28 °C에서 24 시간 배양하였다. Plasmid가 발현되어 형질전환된 균주를 항생제 저항성 유전자의 발현을 통하여 확인하기 위해 적절한 항생제를 P buffer에 섞어 반응 plate에 overlay 후 7~10 일 배양 (28 °C)하여 transformant를 확보하였다.

Protoplast 를 농축하여 10⁹ 이상을 사용할 때, 형질전환 효율이 높아졌으며, 특히 20kb 이상의 큰 plasmid를 이용한 형질전환이 가능한 것을 확인하였다 (표 14).

표 14. 최적화 조건에서의 형질전환 효율

	배양 final pH	흡광도	Protoplast (/mL)	재생율 (%)	Transformants	
					pKC1139	pKC-ADu*
Optimum	6.5	1.54	8.3X10 ⁸	10%	>500	100
Minmum	6.1	1.2	4.0X10 ⁸	5%	100	5

* pKC1139: 6.5 kb; pKC-ADu: 23kb

(2) 접합법 (conjugation)

숙주균주로 사용된 avermectin 고생산균주에 대한 접합법 적용여부를 확인하였다. Conjugation을 통한 형질전환을 위해서 플라스미드가 형질전환된 E.coli ET12567/pUZ8002를 30 °C에서 LB 혹은 2xTY (trptone 16 g/l, yeast extract 10 g/l, NaCl 5 g/l) 액체 배지를 이용하여 배양한 후, 다음날 1 mL의 배양액을 25 mL의 LB 혹은 2xTY에 옮기고, 37 °C에서 광학 밀도 (optical density)가 0.25-0.6이 될 때까지 배양하였다. 배양액의 세포는 LB 혹은 2xTY 로 두 번 세척하고, 0.5mL의 LB 혹은 2xTY 로 농축함. Str. avermitilis 포자액 60 uL를 원심분리하고 500 uL LB 혹은 2xTY 에 녹인 후 50 °C에서 10분 동안 incubation 하였다. 500 uL의 E.coli 농축액과 500 uL의 균사액을 서로 혼합한 후 ISP4 배지에 도포하고 28 °C에서 24시간 동안 배양한 뒤 1 mg의 날리딕신산 (nalidixic acid)과 플라스미드 발현 여부를 확인하기위한 적절한 항생제 1 mg을 도말하고, 7~10 일 후 확인하여 형질전환된 colony를 선별하였다. 그 결과 avermectin 고생산 균주 역시 일반 방선균에서 사용되고 있는 접합법을 적용할 수 있는 것으로 확인되었다.

(3) 유전자 제거 및 치환

온도 민감성 origin을 갖는 pKC1139 vector를 이용하여 숙주 균주인 Str. avermitilis에서 homologous recombination을 통한 염색체 내 유전자 제거 및 치환조건을 확립하였다. 확립된 protocol을 이용하여 avermectin 생합성 유전자 및 주요 조절유전자의 조작 및 milbemycin

생합성 유전자 도입을 수행하였다.

3. Avermectin 및 Milbemycin 분석방법의 확립

(1) HPLC를 이용한 Avermectin 및 milbemycin의 분석방법 확립

각 연구기관에서 보유중인 분석기기를 활용하여 avermectin 및 milbemycin 생산 확인을 위한 분석 방법을 확립하였다 (그림 13).

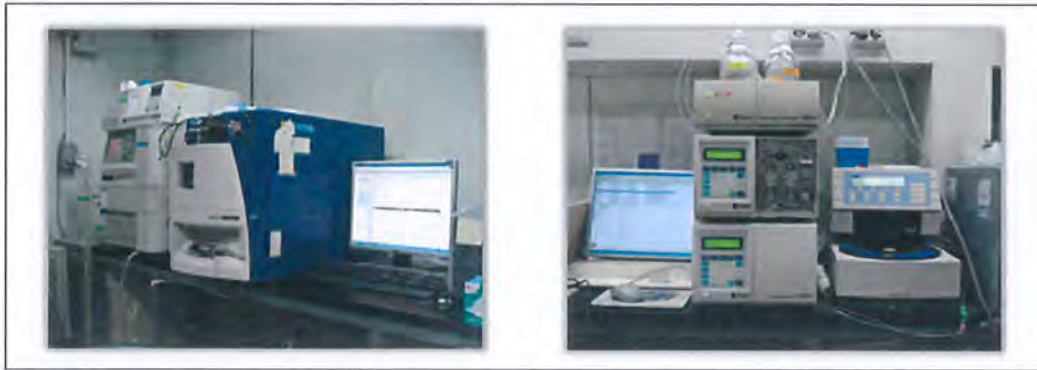


그림 13. Milbemycin 생산 확인 및 정량 분석을 위한 분석기기 예

대사산물인 avermectin의 표준 분석법을 확립하기 위해 순도 98.9%의 abamectin (avermectin B1a, B1b 혼합품, Sigma)을 표준품으로 사용하였다. HPLC 분석을 위한 장비로 Agilent Model 1100 series (Agilent, USA)를 사용하였으며 분석용매로 acetonitrile (HPLC grade)을 이용하여 분석하였다. 분석 column은 Atlantis C18, 4.6*250mm column을 이용하였다. 분석 용매는 acetonitrile을 이용하였으며 용매기울기 조건은 표 15와 같다. Flow rate는 1 ml/min로 하였으며 245nm UV 조건에서 분석하였다. injection volume은 10 μ l 였다.

표 15 Avermectin의 생산확인을 위한 용매기울기

Time	Acetonitrile (%)	Water (%)
0	40	60
5	40	60
35	90	10
45	90	10

배양액 내 avermectin 시료를 분석하기 위해 균체를 포함한 배양액 1 mL에 3 mL의 ethanol을 첨가하여 혼합한 후, 10분간 초음파 추출하였다. Sample을 원심분리하여 고형분을 제거한 뒤 0.22 μ m filter를 통과하여 분석시료를 준비하였다. Abamectin 표준품과 *Str. avermitilis* 배양액의 대사산물을 비교한 결과, *Str. avermitilis*가 생산하는 avermectin을 정량적으로 분석할 수 있음을 확인하였다 (그림 14).

Milbemycin의 분석을 위해서 milbemycin A3 / A4의 순도가 각각 98.9 % , 98.1 % 인 표준품

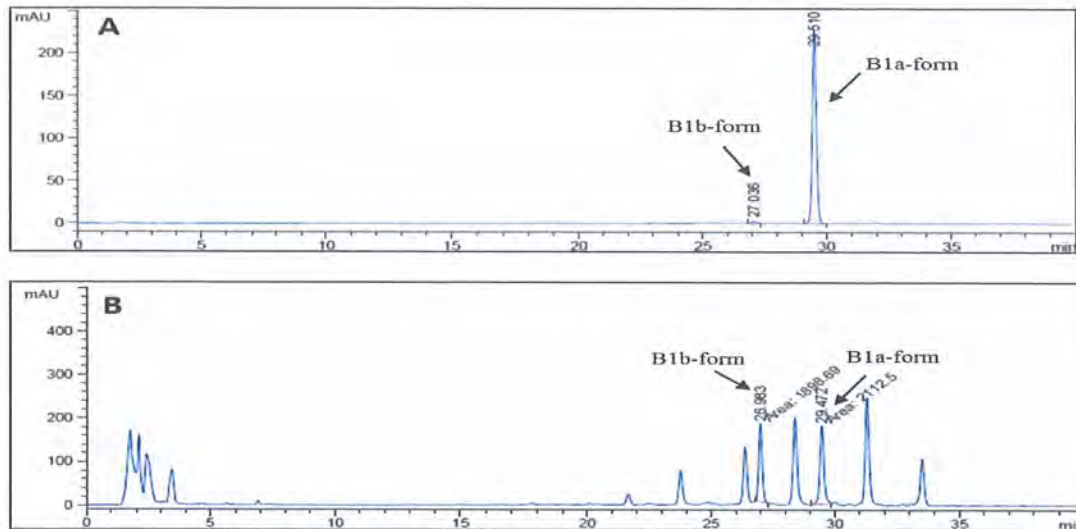


그림 14. *Str. avermitilis* 배양액 분석 A. abamectin 표준품, B. *Str. avermitilis* SA-01 배양액

(BioAustralis, Australia) 을 이용하였다. HPLC 분석의 조건은 avermectin의 분석 조건과 동일하게 진행하였다. 우선 회수율 시험을 위하여 균주 배양액에 milbemycin 표준액 10 ppm, 1 mL을 첨가한 후 시료 전처리 과정을 동일하게 진행하였고, 표준품 50 mg을 50 mL volumetric flask에 넣어 acetonitrile로 표선을 맞춘 후 완전 용해시킨 뒤에 이를 희석하여 표준 용액을 제조하였다. 회수율 시험 결과는 다음과 같다 (표 16).

표 16. 회수율 시험 분석결과

시료	Recoveries ± sd (%)	
	Milbemycin A3	Milbemycin A4
Milbemycin 배양액 (n=4)	98.5 ± 0.6	99.0 ± 0.7

Milbemycin을 균주 배양액으로부터 추출 및 분석하기 위해 milbemycin 생산 야생형 균주인 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*를 배양하여 분석을 수행하였으며, 배양 시료의 전처리를 위하여 시료 1 mL을 ethanol (v/v) 3 mL과 혼합하였다. 10 분간 초음파 추출 후 원심분리하여 고형물을 제거 한 뒤 교반하여 용액을 균질화한 후, 0.22 µm filter를 통과하여 분석시료를 준비하였다. Milbemycin 표준품과 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus* 배양 추출물의 HPLC 분석 비교결과는 다음과 같다 (그림 15). 이를 통해 milbemycin 야생형 균주가 생산하는 milbemycin을 정량적으로 측정할 수 있었다.

Milbemycin을 생산하는 *Str. avermitilis*의 배양액을 분석하는 과정에서 경쟁 이차대사산물인 oligomycin과 milbemycin A3의 HPLC peak 가 거의 동일한 retention time을 갖고 있음을 알 수 있었다. 따라서, 분석 조건을 수정하여 oligomycin과 milbemycin A3가 효과적으로 분리될 수 있도록 하였다. 이를 위해 이동상 (mobile phase)의 acetonitrile 과 DDW의 비율을 50:50으로 1분간 분석한 후 용매 비율을 85:15까지 20분간 기울기를 줘 분석하였다. 이후 85:15의 비율로 분석하였다. Flow rate는 0.9 mL/min 이었으며 245 nm에서의 흡광 패

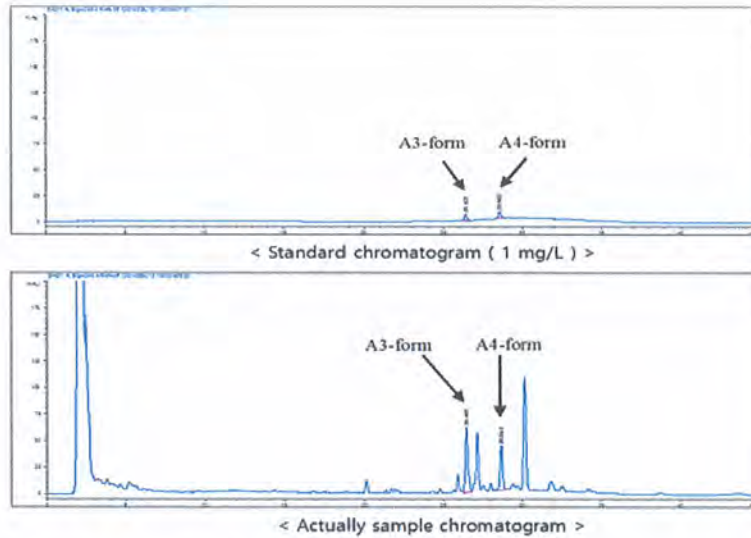


그림 15. Milbemycin A3 및 A4의 HPLC분석

턴을 확인하였다. injection volume은 10 μl 였다. 표준품 milbemycin A3, A4, D와 이중생산 균주의 배양액을 비교한 결과 oligomycin과 milbemycin A3의 peak가 분리되어 분석됨을 알 수 있었다 (그림 16).

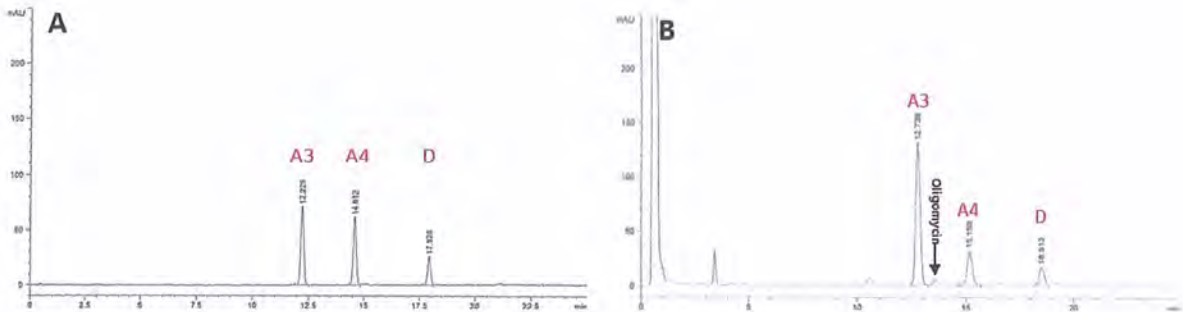


그림 16. Milbemycin 생산 Str. avermitilis 배양액 분석. A. milbemycin 표준품, B. DBM-04 배양액

(2) Q-TOF-HS-MS/MS 분석

Milbemycin 생산 이중균주의 배양액 및 분리 정제한 milbemycin의 분자량등을 추가로 분석하기 위해 XEVO[®] G2S Q-TOF mass spectrometer (Waters, USA)와 Acquity UPLC[®] system (Waters, USA)로 구성된 Acquity I-Class system을 사용하였다. 분석을 위한 column은 Xselect[®] CSH column XP (2.1 X 100 mm, 2.5 μm)를 이용하였다. 분석 용매는 물과 acetonitrile을 이용하였으며 이동상의 flow rate는 0.4 mL/min 으로 하였다. 용매 기울기는 50% Acetonitrile 로 1분간 분석한 후, 50%에서 75% 까지 6분간 분석, 75%에서 90% 까지 8분간 분석하였으며 90%에서 3분간 분석 후, 50% acetonitrile로 2분간 분석하였다. injection volume은 4 μl 였다. MS system은 negative ionization mode로 electrospray ionization (ESI) 상에서 수행하였다. 일반적으로 이용된 operating parameter는 다음과 같다.



- Analyser: resolution Mode
- Capillary voltage (volt.): 2.5kV; Sampling cone volt.: 25kV
- Source Temp.: 120°C; Source offset Temp.: 80°C; Desolvation temp.: 300°C
- Cone gas flow: 10L/h, Desolvation gas flow: 600L/h

Mass spectrometer의 tuning 및 calibration을 위해 leucine encephalin을 lockspray 및 reference material로 사용하였다. MassLynx V4.1 software (Waters)를 instrument control, acquisition 및 sample analysis에 사용하였다.

4. milA1 삽입균주의 제작

avermectin 고생산 균주를 이용하여 milbemycin 이중생산 균주를 제작하기 위해 avermectin과 milbemycin 물질의 구조적 차이를 결정하는 유전자인 aveA1과 aveA3 (또는 module 7)을 각각 milA1과 milA3 (또는 milbemycin 원 생산균주 module7)로 치환하여 milbemycin 생산균주를 제작하고자 하였다. 개발 가능성을 확인하기 위해 우선 milA1을 avermectin 생산균주에 삽입하여 대사물질의 변화를 확인하였다.

가. aveA1 유전자 제거 균주 개발

Avermectin 고생산균주에서 avermectin 생산을 억제하기 위해 avermectin 생산유전자 중 첫 번째 유전자인 aveA1을 제거하고자 하였다 (그림 17).

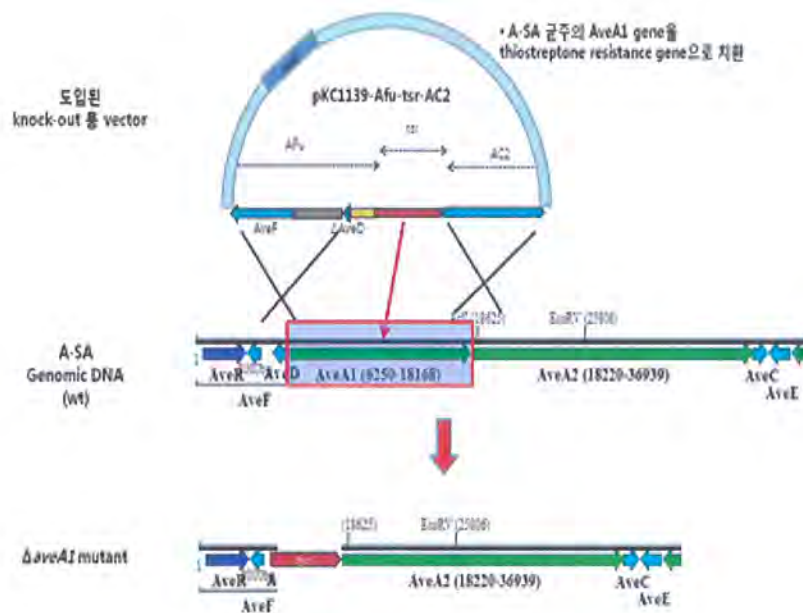


그림 17. aveA1 제거균주의 제작 모식도



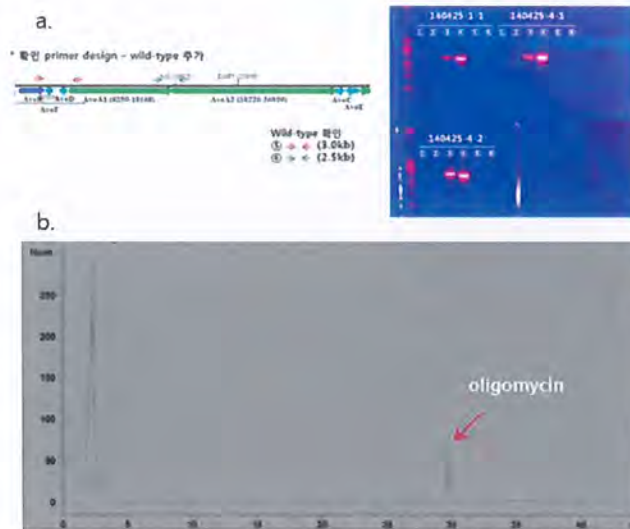


그림 18. aveA1 유전자 제거

aveA1의 활성을 제거하기 위해 aveA1의 위치에 항생제인 Thiostreptone의 저항성 유전자를 도입하기 위한 vector를 제작하고 이를 숙주균주에 도입하였다. Single crossover를 유도하기 위해 항생제 배지에 도말 후 37도에서 배양하여 균주를 확보하였으며, 확보된 균주는 콜로니별로 항생제가 있는 배지와 없는 배지에 스트리킹 하고 다시 37도에서 배양하여 두 plate 중 항생제가 없는 배지에서만 성장할 수 있는 항생제 내성이 없는 균주를 확보하였다.

확보된 colony 중 PCR을 통해 항생제 thiostreptone 내성 유전자인 tsr이 염색체의 aveA1 위치에 삽입되고 aveA1이 제거된 균주를 확보하고, 이를 배양하여 avermectin 생산이 억제됨을 확인하였다 (그림 18).

나. milA1 발현백터의 제작

상기 aveA1 제거균주에 도입하기 위해 pSETH1 백터를 이용하여 milA1 발현백터를 제작하였다 (그림 19). milA1 발현백터의 insert는 milA1 자체 promoter와 전체 유전자를 갖는 pSETH1-milA1과 milA1 자체 promoter 대신 aveA1의 promoter와 milA1의 docking domain 대신 aveA1의 docking domain을 갖는 ADu-milA1-Ac2를 도입하였다. 또한 control로 활용하기 위하여 aveA1을 insert로 한 발현백터를 제작하였다.

다. 발현백터를 통한 milA1의 도입

avermectin 생합성 과정의 aveA1의 활성을 milA1으로 치환하면 avermectin의 22-23번 탄소의 double bond와 25번 탄소 위치의 탄소사슬의 길이가 milA1에 의하여 22-23탄소의 single bond 및 25번 탄소 위치의 탄소사슬이 methyl, ethyl, isopropyl 의 형태로 전환될 것으로 예상되었었다. 따라서, aveA1을 milA1으로 치환한 균주를 제작하고 대사물질의 변화를 확인하여 이중숙주에 의한 물질생산이 가능하지를 확인하고자 하였다. 이러한 hybrid

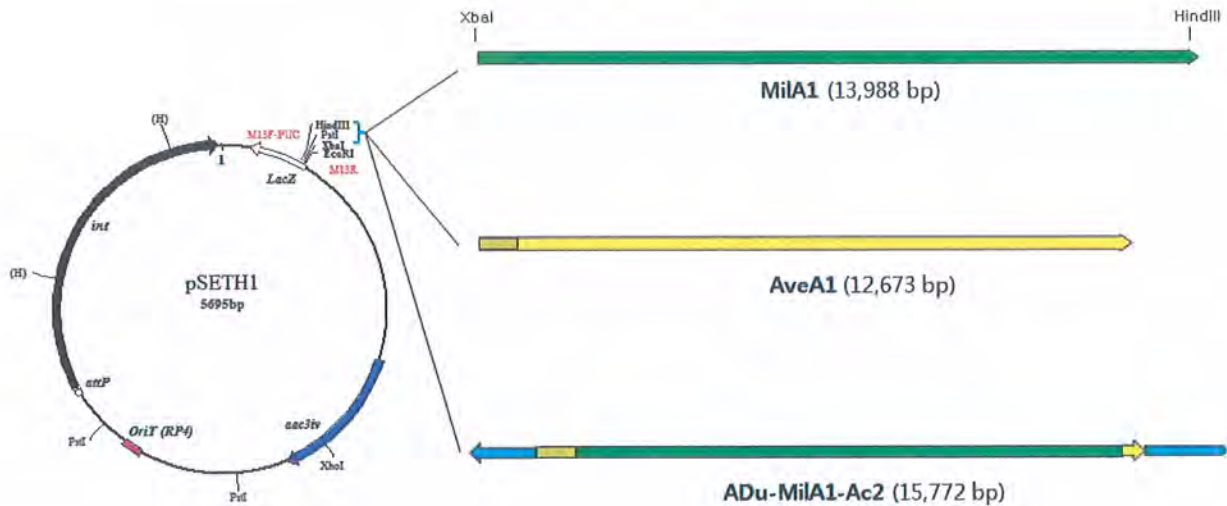


그림 19. milA1 발현벡터의 제작

polyketide synthase를 구성하기 위해 milA1의 발현과 단백질 상호작용에 대한 고려가 필요하다. milA1의 promoter에 결합하는 milR과 aveA1의 promoter에 결합하는 aveR은 아미노산 수준에서 상당한 차이 (homology 51.2%)가 있어 인식하는 DNA 염기서열 역시 상이할 수 있다. 따라서, milA1의 promoter를 aveA1의 것으로 교체하여 숙주균주의 aveR이 인식할 수 있도록 하여야 할 필요가 있다. 또한, Polyketide synthase의 경우 각 module 간의 상호작용이 효소활성을 원활하게 하는데 매우 중요하며 이는 각 module의 docking domain 부위가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 제작되는 hybride polyketide synthase에서 MilA1은 다음 단계의 AveA2와 상호작용하여야 하므로 milA1의 C-terminal의 docking domain 부위를 aveA1의 것으로 바꿔 aveA2와의 상호작용을 원활하게 하고자 하였다. 각 발현벡터는 pSETH1을 이용하여 제작하였으며, 각 발현벡터를 aveA1의 활성이 제거된 *Str. avermitilis*- Δ aveA1 균주에 도입하고 활성을 확인하였다 (표 17).

표 17 milA1 도입균주의 활성 평가

균주명	도입 유전자 특징	Mectin 생산성 (mg/L)
A-SA (Control)	원 숙주균주	avermectin B1a+B1b 1,020 mg/L
A-SA Δ aveA1	aveA1 활성 제거균주	-
pSETH1-aveA1	aveA1 유전자 및 aveA1 promoter	avermectin B1a+B1b 37.4 mg/L
pSETH1-milA1	milA1 유전자 및 milA1 promoter	-
pSETH1-ADu	C-terminal의 dockin domian을 aveA1으로 치환한 milA1 및 aveA1 promoter	신규 물질 31.2 mg/L

결과에서 알 수 있듯이 aveA1을 deletion 하여 avermectin의 생성을 억제한 균주에 milA1을 도입하였을 때, 자체의 promoter 시스템을 갖는 경우는 활성을 보이지 않았으나, aveA1의 promoter로 교체한 pSETH1-ADu의 경우 물질이 생성되는 것을 알 수 있었다. 특히,

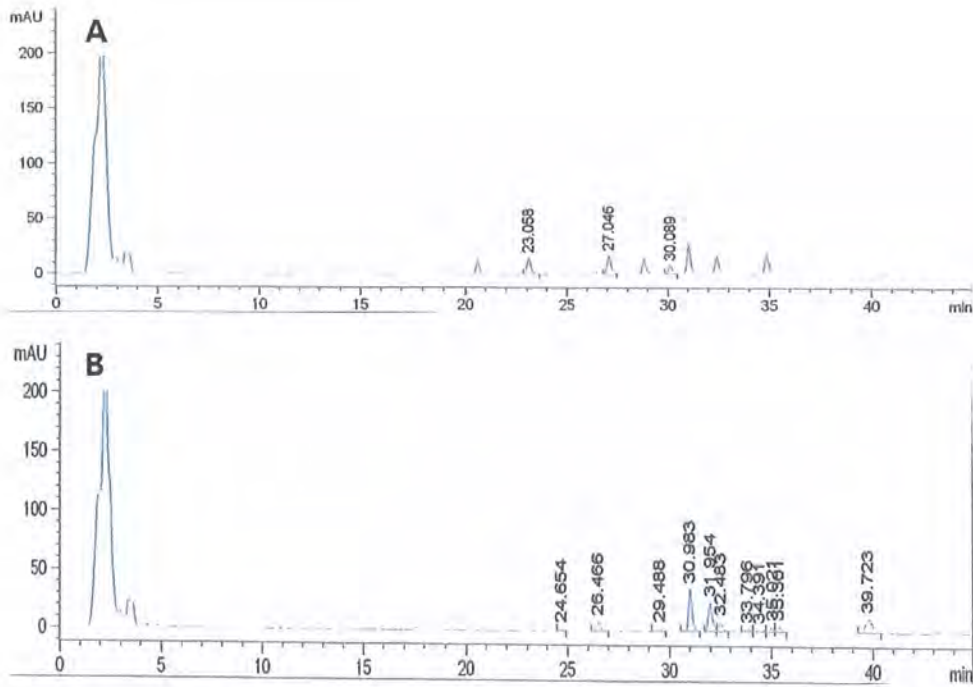


그림 20. 발현백터 도입에 의한 배양액 분석 A. pSETH1-aveA1의 도입, B. pSETH1-ADu 도입

각 균주의 대사물질의 HPLC chromatogram을 확인한 결과 aveA1이 도입된 균주와 modified milA1이 도입된 경우의 물질 생성 pattern이 다른 것을 확인할 수 있었다. 따라서, milA1이 숙주균주에서 작동을 할 수 있으나 물질을 생성하기 위해서는 프로모터와 C-terminal의 docking domain을 변경하여야 할 것으로 생각되었다. 또한, aveA1을 vector 형태로 보상하는 경우와 control을 비교하였을 때, 물질의 생산성이 매우 감소하는 것으로 보아 integration vector를 이용하여 milbemycin 생산유전자를 숙주균주에 도입하는 것은 생산성을 감소시킬 수 있는 것으로 생각되어 avermectin 합성유전자를 milbemycin 생합성 유전자로 직접 치환하는 것이 적합할 것으로 판단되었다.

라. milA1 치환균주의 제작

(1) milA1 삽입백터 제작을 위한 3' region의 구성

milA1을 삽입하기 위한 삽입백터를 제작하였다. 우선 aveA1의 docking domain 부위와 milA1의 module2 부분을 연결하기 위해 그림 21의 염기서열로 DNA를 합성하였다. 합성된 DNA를 앞서 Cloning 한 milA1의 C-terminal 부위 (pCR-CT)에 BamHI site를 이용하여 삽입하여 milA1의 C-terminal 부위가 aveA1의 것으로 치환된 vector를 제작하였다 (그림 22). milA1 삽입을 원활하게 하기 위해 교차가 일어나는 지역을 길게 하고자 숙주균주의 genomic DNA로부터 aveA1의 N-terminus 부분을 증폭하여 pCR2.1-CT-Ac의 3' 말단에 infusion ligation을 이용하여 연결하고 이를 pCR-CT-AC2로 명명하였다 (그림 23). 전체 milA1 삽입백터를 구성하기 위해 milA1 3' region인 pCR2.1-CT-Ac2와 5' region을 cloning 한 pCR2.1-NM을 NdeI/XbaI으로 각각 digestion 한 후 ligation 하여 전체 삽입되는

유전자의 C-terminal 부위를 클로닝 하였고 이를 pCR2.1-milA1-AC2로 명명하였다 (그림 24).

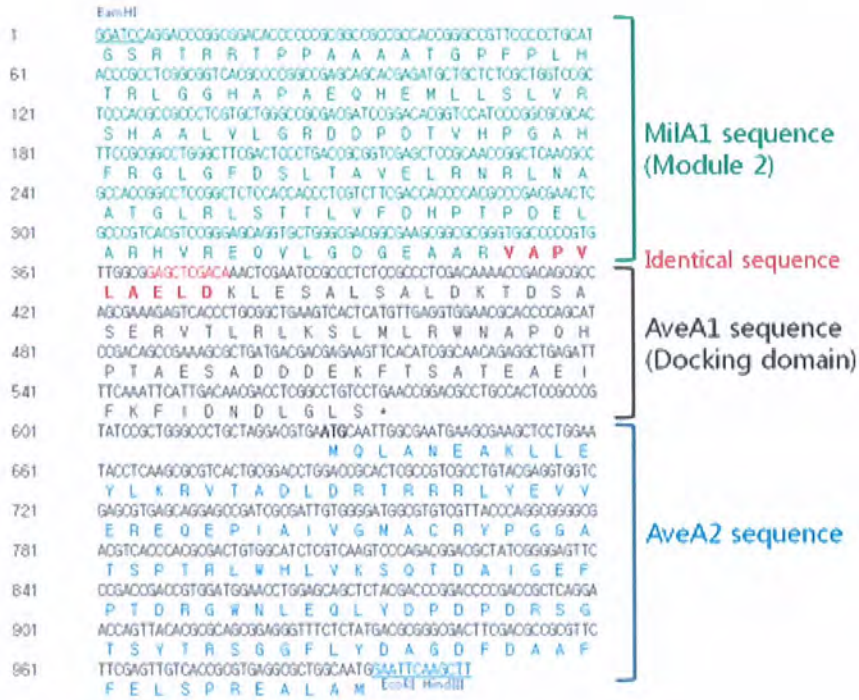


그림 21. C-terminal docking domain 부위 합성

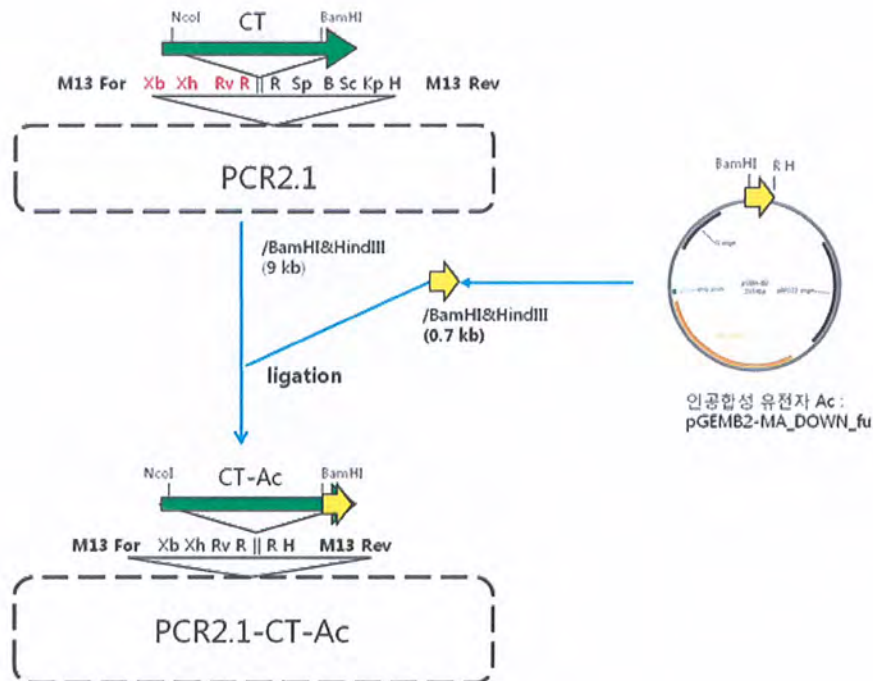


그림 22. pCR2.1-CT-Ac 제작

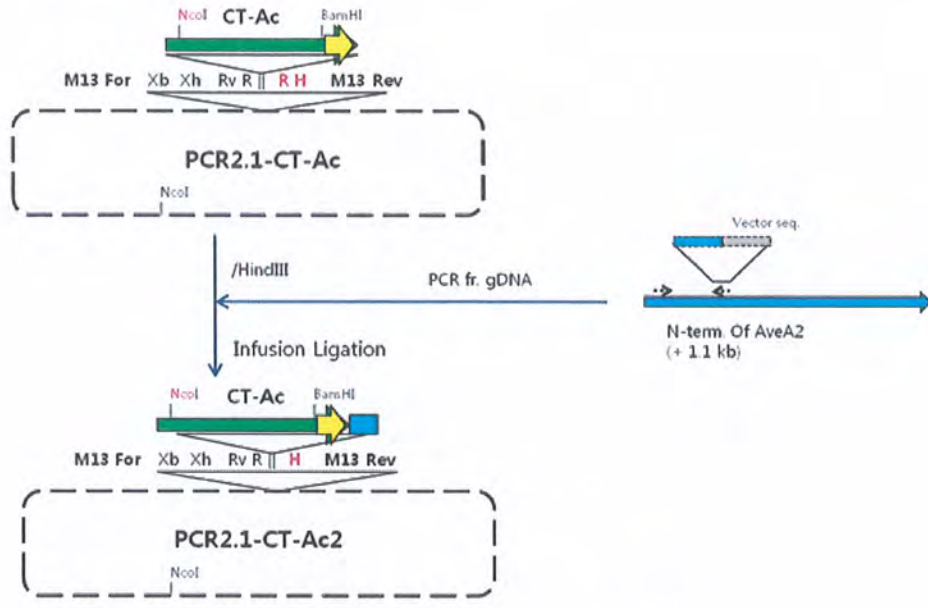


그림 23. pCR2.1-CT-Ac2 의 제작



pCR21-MilA1-AC2 확인
 Lane 1 : marker
 Lane 2~7: pCR21-MilA1-AC2 / NdeI&XbaI
 Upper band : pCR21-NM21 fragment (9.0kb)
 Lower band : pCR21-CT12-AC2 (8.8kb)

그림 24. 삽입유전자의 클로닝

(2) milA1 삽입백터 제작을 위한 5' region의 구성

숙주균주의 genomic DNA와 milA1의 N-terminal 부분이 cloning 된 pCR-NM 으로부터 삽입백터의 5' region에 해당하는 부분을 PCR로 증폭하고 infusion ligation을 통해 결합하여 milA1 삽입유전자의 5' region을 cloning 한 pCR2.1-Adu-M1Age를 구성하였다 (그림 25).

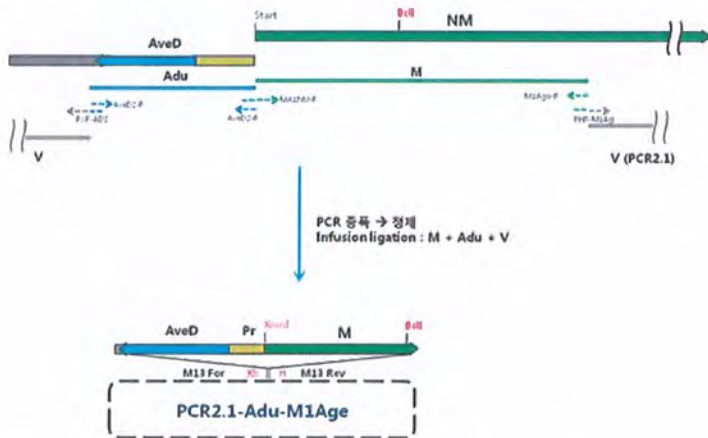


그림 25. milA1의 5'-지역의 구성

삽입될 전체 insert를 구성하기 위해 앞서 제작한 pCR2.1-milA1-Ac2 와 pCR2.1-Adu-M1Age 를 infusion ligation을 통해 하나로 ligation 하여 cloning 하였다 (그림 26). 제작된 삽입벡터를 제한효소로 처리하고 insert를 Streptomyces-E. coli shuttle vector인 온도민감성 pKC1139에 subcloning 하여 삽입벡터를 제작하였고, 이를 pKC-Adu-milA1-Ac2로 명명하였다.

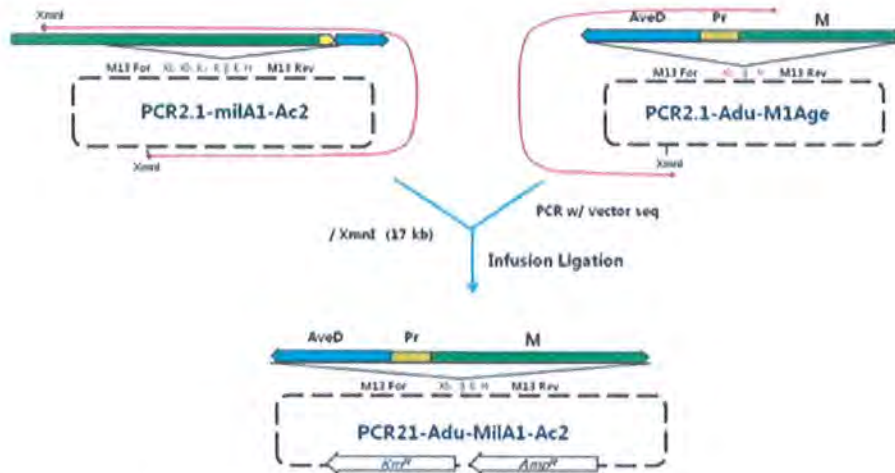


그림 26. milA1 삽입벡터 Adu-milA1-Ac2의 제작

마. avermectin 생산균주로 milA1 삽입

확보된 pKC-Adu-milA1-Ac2를 E. coli JM110으로 형질전환하여 demethylated 형태로 전환한 후, 이를 conjugation을 통해 avermectin 고생산성 Str. avermitilis SA-01로 도입하였다. Apramycin 이 첨가된 고체배지를 이용하여 벡터가 도입된 colony 만 선별하였다. 1차 교차를 유발하기 위해 확보된 colony를 Apramycin 이 25 µg/mL 첨가된 ISP-4 배지에 streaking 하고 37도에서 7일간 배양하여 염색체에 벡터가 integration된 균주만을 확보하였다 (그림 27).

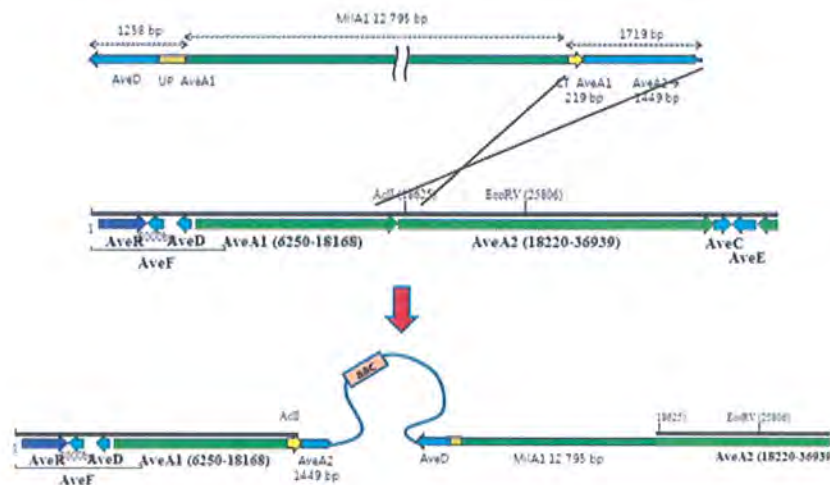
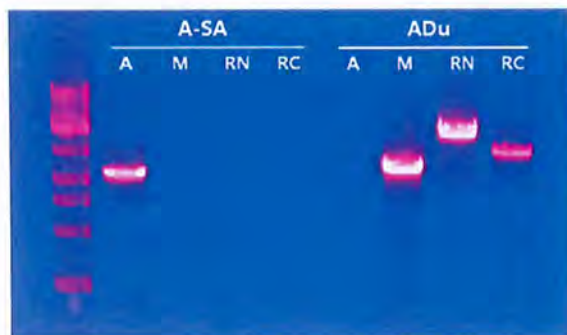


그림 27. 1차 교차균주의 제작

1차 교차가 일어난 colony를 회수 한 후, 벡터부위를 제거하기 위한 2차 교차를 유도하였다. 1차 교차와 동일한 조건에서 colony를 배양한 후, apramycin 내성이 제거된 균주를 확보하여 PCR을 통해 milA1이 삽입된 균주를 확보하였다. 그림 28에서 알 수 있듯이 milA1이 삽입된 균주인 ADu의 경우 milA1 특이적인 primer (lane M), milA1의 5' 과 AveD 에 특이적이 primer (lane RN), 삽입된 milA1의 3' region과 aveA2에 특이적인 primer (lane RC)에 의해 DNA가 증폭되어 aveA1의 위치에 milA1이 삽입되었음을 확인할 수 있었다. 확보된 균주를 *Str. avermitilis* DBM-01로 명명하고 생성하는 대사물질을 분석하였다.



A : aveA1 지역 (2.2K)
M : milA1 지역 (2.4K)
RN : N-fusion (4.0K)
RC : C-fusion (3.3K)

그림 28. PCR을 통한 삽입균주의 확인

바. milA1 삽입균주의 대사물질 비교

Str. avermitilis DBM-01을 생산배양 한 후 확보한 물질 분석 조건에 따라 milA1 삽입균주의 대사물질을 HPLC를 통해 분석하였다 (그림 29). 모균주인 avermectin 고생산균주가 avermectin 계열의 8 종류의 물질을 생산하는 반면, milA1으로 치환한 DBM-01 균주의 경우 확연히 다른 물질 생산 패턴을 보이는 것을 알 수 있다.

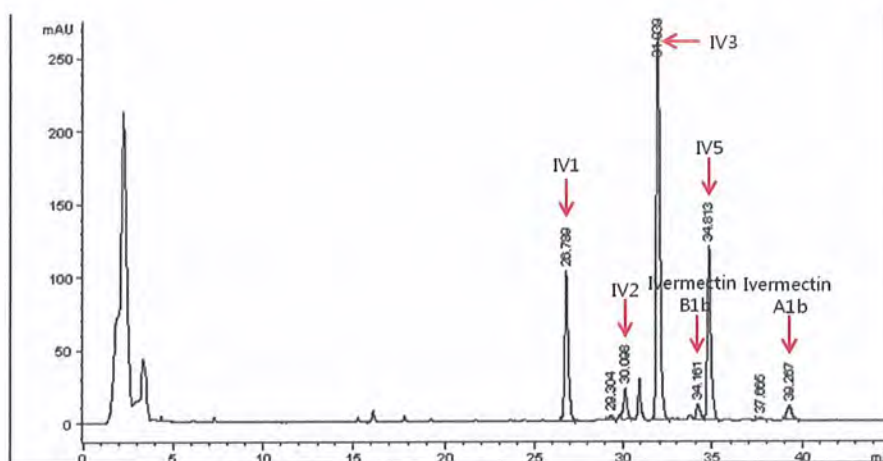


그림 29. DBM-01 발효액의 HPLC chromatogram

사. milA1 삽입균주의 대사물질 구조 확인

각 물질이 milA1의 활성에 의해 생성된 물질인 경우 기존의 avermectin에서 22번과 23 탄소의 결합이 single bond로 변화되며, 25번 탄소의 알칸 사슬의 길이 역시 methyl, ethyl, isopropyl 형태로 바뀐 25-methyl-22,23-dihydroavermectin(IV1), 25-ethyl-22,23-dihydroavermectin (IV2), 25-isopropyl-22,23-dihydroavermectin (Ivermectin B1b), 그리고 이들의 5-methoxy 형태의 5-methoxy-25-methyl-22,23-dihydroavermectin (IV3), 5-methoxy-25-ethyl-22,23-dihydroavermectin (IV5), 5-methoxy-25-isopropyl-22,23-dihydroavermectin (A1b)의 6종의 물질이 생성될 것으로 예상되었다. 물질의 구조를 분석하기 위해 peak 별로 물질을 분리하였으며, 이에 대한 LC-MS 분석을 수행하였다 (표 19).

표 18 Ivermectin analogues 의 분리 정제 및 LC-MS

Peak 번호	HPLC RT (min)	시료무게 (mg)	순도 (HPLC, %)	M97.85ass (ES(+), m/z)	Mass-Na +	예상물질
1	26.8	14.1	98.8	856.26	833.27	IV1
2	30.1	16.8	90.7	870.23	847.24	IV2, IV4
3	32.0	14.6	99.1	870.29	847.30	
4	34.1	13.1	98.3	884.26	861.27	B1b, IV3
5	34.8	5.2	91.9	884.32	861.33	
6	39.2	3.0	97.9	898.29	875.30	A1b

분석 결과 각각의 peak의 분자량은 예측된 분자의 분자량과 잘 일치하였다. 특히, 2번과 3번 peak, 4번과 5번 peak의 분자량은 거의 일치하였기 때문에 명확한 구조분석을 위해 6개의 물질에 대한 구조분석을 NMR을 통해 수행하였다.

이중 알려진 물질인 Ivermectin A1b는 peak 6에 해당되었고, Ivermectin B1b는 peak 4에 해당되었다. 이들 물질의 분광학적 특성은 Chabala 등의 연구결과에 보고된바 있다 (Chabala et al., 1980). peak 1과 peak 2에 대한 분광학적 특징을 분석하였을 때, 각 peak에 해당하는 물질은 각각 IV1, IV2로 하였다 (표 20).

표 19. peak 1 (IV1)과 peak 2(IV2)의 분광학적 특성

IV1	δ_{H} : 3.16 (m, H-2), 5.35 (d, $J = 1.4$, H-3), 1.75 (s, 3H, H-4a), 4.16 (m, H-5), 3.70 (m, H-6), 4.55 (m, H-8a), 5.74 (dd, $J = 1.9$ & 11.3, H-9), 5.81 (ddd, $J = 3.4$ & 11.4 & 14.2, H-10), 5.65 (ddd, $J = 1.9$ & 9.7 & 14.8, H-11), 2.59 (m, H-12), 1.09 (m, H-12a), 3.93 (m, H-13), 1.48 (s, 3H, H-14a), 5.15 (m, H-15), 2.24 (m, H-16), 3.63 (m, H-17), 0.75 (m, H-18), 1.85 (m, H-18), 4.98 (m, H-19), 1.14 (m, H-20), 2.11 (m, H-20), 1.24 (m, H-22), 1.44 (m, H-23), 1.52 (m, H-23), 1.18 (m, H-24), 0.77 (d, $J = 6.6$, 3H, H-24a), 3.25 (m, H-25), 1.08 (m, H-26), 4.76 (m, H-1'), 2.23 (m, H-2'), 3.46 (m, H-3'), 3.34 (s, 3H, 3'-OMe), 3.12 (m, H-4'), 3.76 (m, H-5'), 1.17 (m, H-6'), 5.26 (d, $J = 3.2$, H-1''), 1.57 (m, H-2''), 3.36 (H-3''), 3.40 (s, 3H, 3'-OMe), 3.64 (m, H-4''), 2.97 (m, H-5''), 1.15 (m, H-6'')
IV2	δ_{H} : 3.16 (m, H-2), 5.35 (d, $J = 1.5$, H-3), 1.75 (s, 3H, H-4a), 4.17 (m, H-5), 3.71 (m, H-6), 4.55 (m, H-8a), 5.75 (dt, $J = 2.2$ & 11.3, H-9), 5.82 (dd, $J = 11.2$ & 14.9, H-10), 5.65 (dd, $J = 9.8$ & 14.9, H-11), 2.59 (m, H-12), 1.10 (d, $J = 7.0$, H-12a), 3.92 (m, H-13), 1.48 (s, 3H, H-14a), 5.13 (m, H-15), 2.44 (m, H-16), 3.62 (m, H-17), 0.77 (m, H-18), 1.85 (m, H-18), 5.00 (m, H-19), 1.16 (m, H-20), 2.13 (m, H-20), 1.26 (m, H-22), 1.66 (m, H-22), 1.15 (m, H-23), 1.43 (m, H-23), 1.24 (m, H-24), 0.76 (d, $J = 6.5$, 3H, H-24a), 3.05 (m, H-25), 1.29 (m, H-26), 0.93 (t, $J = 7.3$, H-27), 4.75 (m, H-1'), 2.24 (m, H-2'), 3.56 (m, H-3'), 3.32 (s, 3H, 3'-OMe), 3.12 (m, H-4'), 3.65 (m, H-5'), 1.18 (d, $J = 6.2$, H-6'), 5.26 (d, $J = 3.2$, H-1''), 1.56 (m, H-2''), 3.35 (H-3''), 3.35 (s, 3H, 3'-OMe), 3.64 (m, H-4''), 2.94 (m, H-5''), 1.15 (d, $J = 6.2$, C-6'')

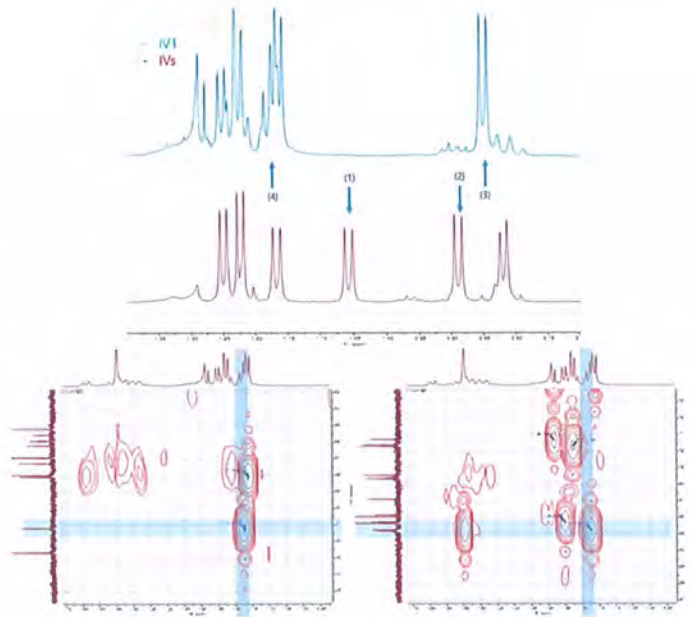


그림 30. IV 1과 ivermectin proton-NMR의 비교 및 HMBC-NMR

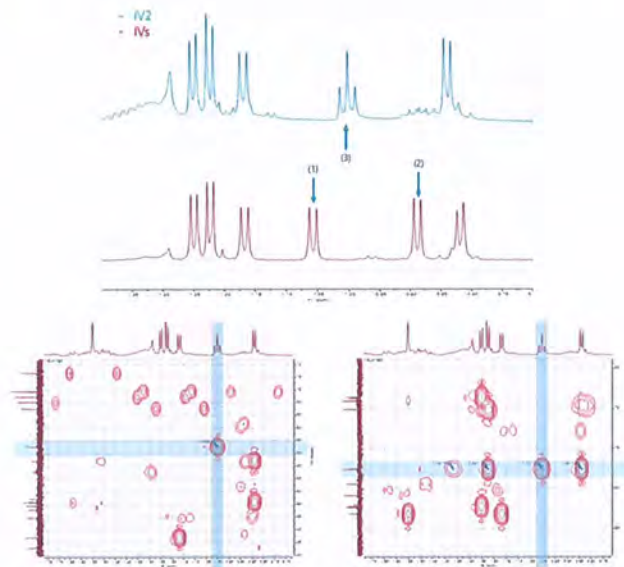


그림 31 IV2와 ivermectin proton NMR 비교 및 HMBC-NMR

IV1의 proton NMR spectrum ivermectin B1b(IVs)의 주요 피크를 모두 가지고 있어, 기본적인 ivermectin 골격을 공유하고 있다. Ivermectin의 proton NMR peak 중 H-27, H-28 methyl기에 해당하는 (1), (2) peak가 없어졌으며, H-24a methyl기에 해당하는 (3) peak의 위치가 변한 것을 확인할 수 있었다 (그림 30). 확대한 proton spectra 비교에서 (4) 위치에서 신규 methyl기를 확인할 수 있었으며, 해당 methyl기는 HMBC 결과에서 C-24 및 C-25와 correlation을 가지고 있음을 확인하여 25-methyl 구조를 유추하였다 (그림 30).

Ivermectin 유도체 2 (IV2)의 proton NMR spectrum ivermectin B1b(IVs)의 주요 피크를 모두 가지고 있어, 기본적인 ivermectin 골격을 공유하고 있음을 확인할 수 있었다. IVs의



proton NMR peak 중 H-27, H-28 methyl기에 해당하는 (1), (2) peak Ivermectin 유도체 2 (IV2)의 proton NMR spectrum ivermectin B1b(IVs)의 주요 피크를 모두 가지고 있어, 기본적인 ivermectin 골격을 공유하고 있음을 확인할 수 있었다. IVs의 proton NMR peak 중 H-27, H-28 methyl기에 해당하는 (1), (2) peak 가 없어지고 신규한 triplet peak (3)이 나타남을 확인할 수 있었다. 확대한 proton spectrum 비교에서 표시된 (3) peak의 triplet으로 나타난 methyl기를 확인할 수 있으며, HMBC 결과에서 해당 proton이 C-25 및 C-26과 correlation을 나타내고 있음을 확인하여 25-ethyl 구조를 유추할 수 있었다 (그림 31).

위 분광학적 결과를 바탕으로 IV1과 IV2의 구조를 유추한 결과, IV1는 25-methyl-22,23-dihydro-avermectin, IV2는 25-ethyl-22,23-dihydro-avermectin임을 결정하였다 (그림 32).

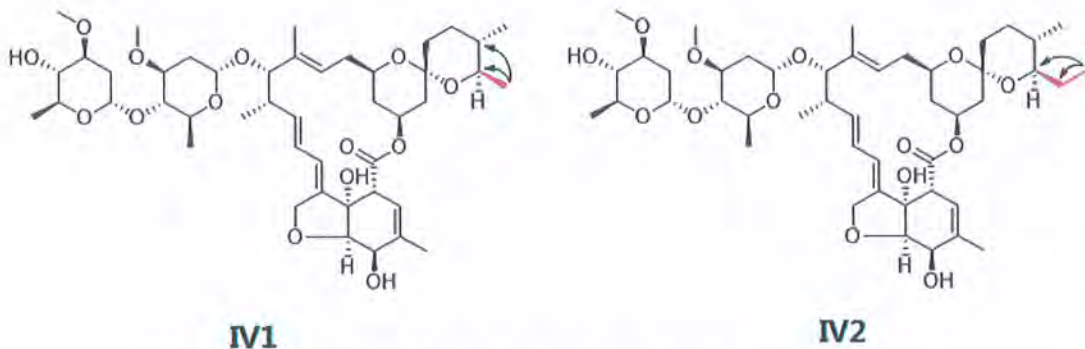


그림 32 IV1과 IV2의 물질구조

동일한 방법을 통해 Peak 3과 Peak 5의 구조를 결정하였다. Peak 3과 Peak 5의 분광학적 특징은 표 13에 나타내었으며, 각 peak 에 해당하는 물질은 각각 IV3, IV5로 하였음 (표 20). 분광학적 특성을 분석한 결과 IV3는 5-methoxy-25-methyl-22,23-dihydro-avermectin, IV5는 5-methoxy-25-ethyl-22,23-dihydro-avermectin임을 결정하였다 (그림 33).

표 20. IV3, IV5의 분광학적 특성

IV3	<p>¹H: 3.16 (m, H-2), 5.42 (d, J = 1.4, H-3), 1.74 (s, 3H, H-4a), 3.92 (m, H-5), 3.41 (s, 5-OMe), 3.90 (m, H-6), 4.58 (m, H-8a), 5.77 (dd, J = 1.9 & 11.3, H-9), 5.85 (ddd, J = 3.4 & 11.4 & 14.2, H-10), 5.68 (ddd, J = 1.9 & 9.7 & 14.8, H-11), 2.59 (m, H-12), 1.09 (m, H-12a), 3.90 (m, H-13), 1.48 (s, 3H, H-14a), 5.17 (m, H-15), 2.24 (m, H-16), 3.63 (m, H-17), 0.75 (m, H-18), 1.86 (m, H-18), 5.00 (m, H-19), 1.14 (m, H-20), 2.11 (m, H-20), 1.24 (m, H-22), 1.44 (m, H-23), 1.52 (m, H-23), 1.18 (m, H-24), 0.77 (d, J = 6.6, 3H, H-24a), 3.25 (m, H-25), 1.08 (m, H-26), 4.76 (m, H-1'), 2.23 (m, H-2'), 3.46 (m, H-3'), 3.34 (s, 3H, 3'-OMe), 3.13 (m, H-4'), 3.81 (m, H-5'), 1.17 (m, H-6'), 5.28 (d, J = 3.2, H-1''), 1.57 (m, H-2''), 3.36 (H-3''), 3.40 (s, 3H, 3''-OMe), 3.64 (m, H-4''), 2.97 (m, H-5''), 1.15 (m, H-6'')</p> <p>¹³C: 173.4 (C-1), 47.0 (C-2), 121.4 (C-3), 135.4 (C-4), 20.0 (C-4a), 78.56 (C-5), 57.8 (5-OMe), 80.9 (C-6), 82.2 (C-7), 141.5 (C-8), 68.7 (C-8a), 121.9 (C-9), 126.7 (C-10), 138.5 (C-11), 41.2 (C-12), 21.0 (C-12a), 82.7 (C-13), 136.3 (C-14), 15.4 (C-14a), 120.1 (C-15), 35.2 (C-16), 69.1 (C-17), 38.1 (C-18), 69.9 (C-19), 42.7 (C-20), 99.1 (C-21), 30.7 (C-22), 36.9 (C-23), 38.0 (C-24), 18.2 (C-24a), 72.7 (C-25), 19.8 (C-26), 96.3 (C-1'), 36.2 (C-2'), 79.7 (C-3'), 57.0 (3'-OMe), 82.3 (C-4'), 69.9 (C-5'), 19.1 (C-6'), 99.9 (C-1''), 37.3 (C-2''), 79.5 (C-3''), 57.6 (3''-OMe), 69.2 (C-4''), 77.1 (C-5''), 18.3 (C-6''). HRESQTOF m/z 869.4662 [M+Na]⁺ (calcd for C₄₆H₇₀O₁₄Na)</p>
IV5	<p>¹H: 3.16 (m, H-2), 5.41 (d, J = 1.5, H-3), 1.74 (s, 3H, H-4a), 3.93 (m, H-5), 3.41 (s, 5-OMe), 3.91 (m, H-6), 4.57 (m, H-8a), 5.76 (dt, J = 2.2 & 11.3, H-9), 5.82 (dd, J = 11.2 & 14.9, H-10), 5.66 (dd, J = 9.8 & 14.9, H-11), 2.59 (m, H-12), 1.11 (d, J = 7.0, H-12a), 3.92 (m, H-13), 1.47 (s, 3H, H-14a), 5.13 (m, H-15), 2.43 (m, H-16), 3.62 (m, H-17), 0.78 (m, H-18), 1.85 (m, H-18), 5.00 (m, H-19), 1.15 (m, H-20), 2.13 (m, H-20), 1.25 (m, H-22), 1.66 (m, H-22), 1.14 (m, H-23), 1.43 (m, H-23), 1.24 (m, H-24), 0.76 (d, J = 6.5, 3H, H-24a), 3.04 (m, H-25), 1.29 (m, H-26), 0.93 (t, J = 7.3, H-27), 4.75 (m, H-1'), 2.24 (m, H-2'), 3.56 (m, H-3'), 3.32 (s, 3H, 3'-OMe), 3.12 (m, H-4'), 3.65 (m, H-5'), 1.18 (d, J = 6.2, H-6'), 5.26 (d, J = 3.2, H-1''), 1.56 (m, H-2''), 3.35 (H-3''), 3.35 (s, 3H, 3''-OMe), 3.64 (m, H-4''), 2.94 (m, H-5''), 1.15 (d, J = 6.2, H-6'')</p> <p>¹³C: 173.5 (C-1), 47.1 (C-2), 121.5 (C-3), 135.3 (C-4), 20.2 (C-4a), 78.4 (C-5), 57.7 (5-OMe), 80.8 (C-6), 82.1 (C-7), 141.4 (C-8), 68.8 (C-8a), 121.9 (C-9), 126.8 (C-10), 138.3 (C-11), 41.2 (C-12), 21.0 (C-12a), 83.3 (C-13), 136.4 (C-14), 15.3 (C-14a), 120.4 (C-15), 35.2</p>

(C-16), 69.1 (C-17), 38.0 (C-18), 70.2 (C-19), 42.7 (C-20), 99.1 (C-21), 30.7 (C-22), 29.2 (C-23), 35.6 (C-24), 18.2 (C-24a), 77.5 (C-25), 26.8 (C-26), 10.6 (C-27), 96.4 (C-1'), 36.2 (C-2'), 80.9 (C-3'), 56.9 (3'-OMe), 82.2 (C-4'), 70.1 (C-5'), 19.1 (C-6'), 99.9 (C-1''), 36.8 (C-2''), 79.4 (C-3''), 57.6 (3''-OMe), 70.2 (C-4''), 77.5 (C-5''), 18.2 (C-6''). HRESQTOF m/z 883.4823 [M+Na] ⁺ (calcd for C ₄₇ H ₇₂ O ₁₄ Na)
--

결과적으로 avermectin 고생산 균주의 aveA1 유전자를 milA1으로 치환한 DBM-01 균주는 숙주 균주인 Str. avermitilis와 다른 대사물질 생산패턴을 보이며, 이들의 구조 분석 결과 예상한 바와 동일하게 Ivermectin의 유사물질인 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Polyketide 합성효소의 유전자를 치환함으로써 예상 가능한 물질을 생산하는 재조합 균주를 제작할 수 있음을 보이는 것으로 해당 과제 목표인 milbemycin 이종생산균주를 제작하기 위해 aveA3 (또는 module 7)을 milA3 (또는 milbemycin 원균주의 module 7)으로 치환하였다.

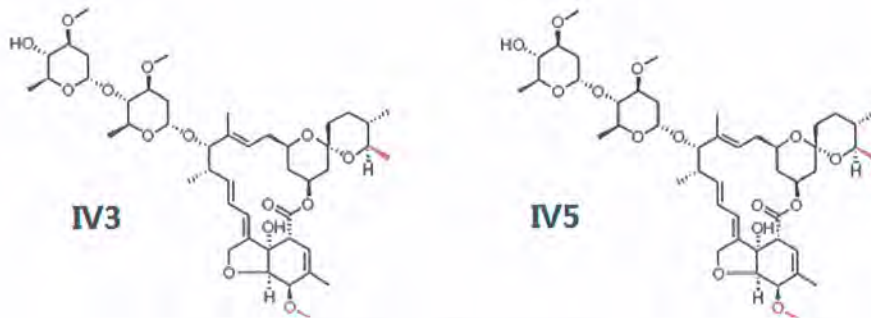


그림 33. IV3과 IV5의 구조

5. Milbemycin 생산 이종균주 제작

상기한 DBM-01 균주를 기반으로 milbemycin과 avermectin간의 구조적 차이를 유발하는 A3 영역을 치환하여 milbemycin 생산 이종균주를 제작하고자 하였다. 이를 위해 aveA3 전체 영역을 milbemycin 생산 유전자인 milA3로 치환하는 방법과 두 물질의 화학적 차이를 결정하는 module 7 위치만을 치환하는 방법 두 가지를 사용하였다.

가. AveA3의 thiostreptone resistance 유전자 치환 균주의 제작

DBM-01 균주를 기반으로 avermectin과 milbemycin간의 구조적 차이를 유발하는 A3 영역을 치환하고자 하는 목적 하에 추후 돌연변이 균주 선별의 용이성을 높이는 한편 pSET152 벡터를 통한 milA3 유전자의 도입을 위해 약 1 kb의 thiostreptone resistance 유전자를 해당 영역에 aveA3 대신 우선적으로 삽입하였다. 이 때, milA3 유전자의 치환 시, aveA3의 N-terminal 및 C-terminal의 docking 부분만을 avermectin PKS의 것으로 남겨두는 경우와 함께 aveA3의 N-terminal·C-terminal의 docking 영역에 더해 module 7의 KS (KS7)·module7-AT (AT7) 및 module9-ACP (ACP9)가 avermectin PKS의 domain들로 보존되는 경우로 계획하였기에, 이 두 경우에 대해 thiostreptone resistance 유전자를 포함하는 pKC1139 기반의 벡터 pK7A9thior, pD7K9thior를 제작하였다. 이들 벡터를 DBM-01로 각각 도입하여 확보된 균주를 각각 Str. ave DBM-01-K7A9thior, DBM-01-D7K9thior로 명명하였다 (그림 34).

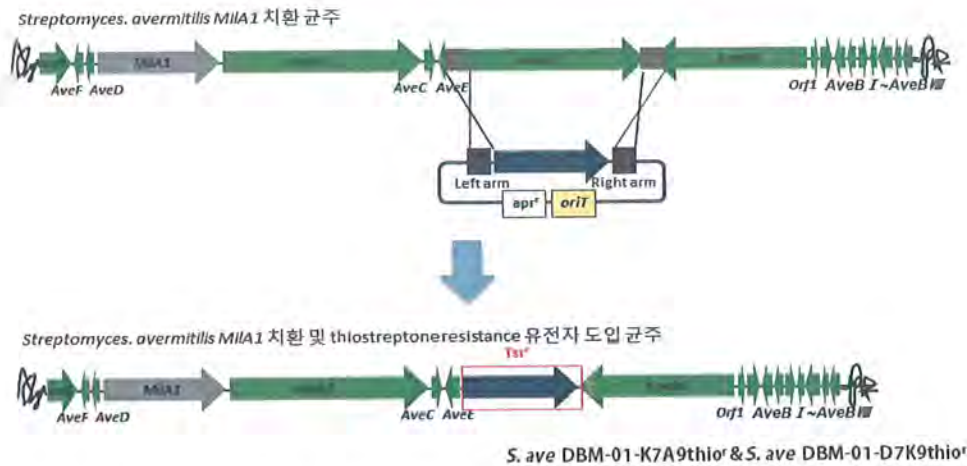


그림 34. aveA3의 KS7-ACP9 및 DH7-KR9 영역 thioStreptone resistance gene 도입균주 제작

나. MilA3 발현 벡터의 제작

MilA3은 약 17.5 kb에 해당되는 매우 큰 생합성 유전자로서 유전자의 안정적인 발현을 위해 여러 변수가 고려되어야 한다. 따라서, 두 가지 방법 ① pKC1139 벡터를 사용하여 avermectin 생합성 PKS 내 aveA3의 milA3로의 직접치환 및 ② avermectin 생합성 PKS의 aveA3 삭제 균주를 제작하고 pSET152 벡터를 이용한 milA3의 발현을 통하여 milA3을 DBM-01 에서 발현하고자 하였다. Avermectin 생합성 PKS 내 aveA3의 milA3로의 직접치환을 위해 milA3를 암호화하는 유전자 영역과 함께 avermectin 생합성 PKS 에서의 homologous recombination을 위한 aveA3의 upstream 및 downstream 각 1.2 kb 영역이 pKC1139에 연결되도록 벡터를 디자인 하였다 (그림 35)

PKS 상에서 domain·module 및 protein의 치환 시 각 gene을 연결하는 docking 부분간의 interaction은 해당 PKS의 정상적 발현에 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 한편, ketosynthase (KS), acyltransferase (AT), dehydratase (DH), enoylreductase (ER), ketoreductase (KR), acyl carrier protein (ACP) 등으로 이루어진 multi-enzyme PKS에서 각 module의 KS와 AT pair는 upstream ACP와 상호작용하는 것으로 보고된바 있다. 이는 protein-protein interaction의 정도를 결정하는 주요인이며, aveA3 영역이 milA3 유전자로 치환될 avermectin PKS의 정상적 작동과 해당 유전자의 발현을 위해서는 치환이 일어나는 염기서열의 위치가 매우 중요하게 고려되어야 함을 의미한다. 위의 근거를 고려하여, module 7, 8, 9 로 구성된 milA3의 유전자의 치환 시, aveA3의 N-terminal 및 C-terminal의 docking 부분만을 avermectin PKS의 것으로 남겨두는 경우와 함께 aveA3의 N-terminal·C-terminal의 docking 영역에 더해 module 7의 KS (KS7) ·module7-AT (AT7) 및 module9-ACP (ACP9)가 avermectin PKS의 domain들로 보존되는 경우로 발현 벡터를 디자인하였다. Avermectin과 milbemycin의 KS 영역 및 ACP 영역, AT-DH intermodular 영역 및 KR-ACP intermodular 영역의 sequence alignment를 통해 공통적인 amino acid를 암호화하는 지점을 치환이 일어나는 fusion site로 결정하고, amino acid의 sequence에 변화를 주지 않는 범위에서 restriction enzyme site를 도입하였다 (그림 36).

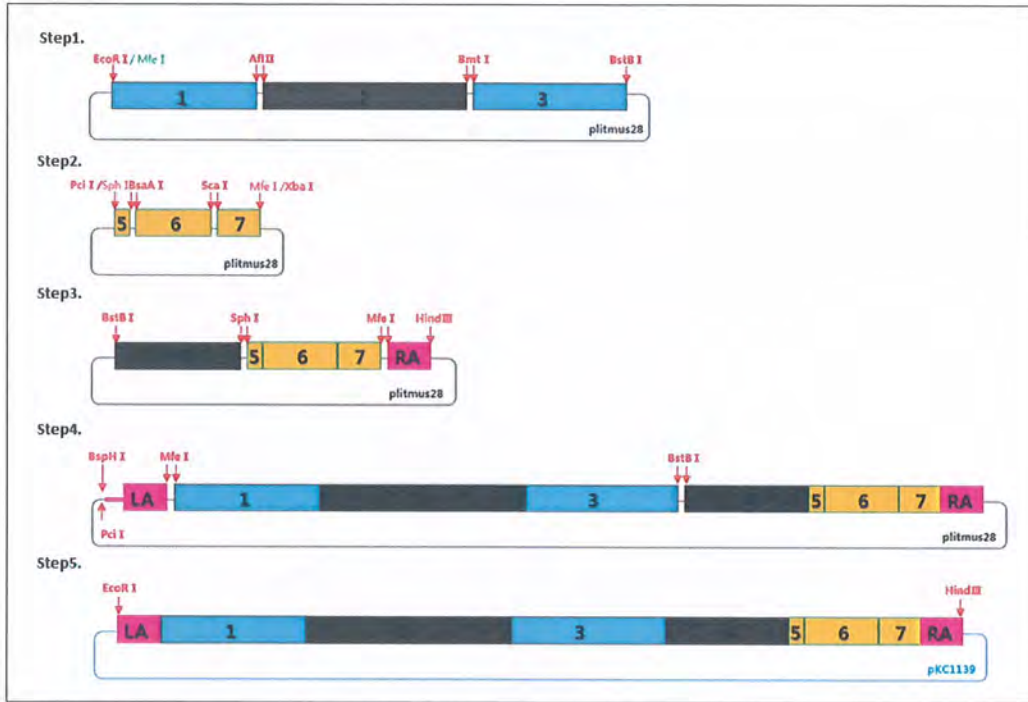


그림 35. MilA3 발현벡터 제작을 위한 클로닝 전략

Gene	Position	Sequence	Restriction Site	Notes
aveA3	1	NDTSSEKLVLDALRASLEKNOTLRARNEGLAAMEASSE	Mfe I	N-terminal of K57
milA3	1	M +K+++ALRASL N+ R EQ+ A+ E AI+GGACR+FGV SPE+LM		
	61	ELVAGGDAIGEFPAQRGWDLEGLDFSDPRSGTSSVARYGGFLYAGEFDADFFGISPRE		fusion site / restriction enzyme
	58	ELVA+G DAIG FP RGWD+E L+D DP+R+GTS ++GGFL+AGEFD FFGISPRE		
	121	ALAMDPOORLLEISREVFERAGIDFASVRSRTGVFAGVMYHDYGRSLHTVPEGFQVY		fusion site / restriction enzyme
	118	ALAMDPOORLLEISREVFERAGIDFASVRSRTGVFAGVMYHDYGRSLHTVPEGFQVY		
aveA3	5396	FDSLTAVELRNRLSHTTGLRFLPTLAFDHFNPTLTHLMT	Mfe I	C-terminal of ACP9
milA3	5696	FDSL LAVELRNRL TT L LP T FDNF P L HL T ++AA A		
	5456	FGFSELSELERLEAVLSSTSSAFLDGGARTPLASRLMSLAGRLN-----GDD		fusion site / restriction enzyme
	5755	+EL RLE+ V S + LDD R+ LA RL SLA+K+ G		
	5507	TAPDLAETSDEHFALIDREV		fusion site / restriction enzyme
	5803	DL +D+EMF LID+EV		
aveA3	890	AEDVTAIGSLRRGNDTRRFLTALANHTHTGIGTPTTWHNHHTHHTHFNHML	Pgl II	AT7-DH7 intermodular region
milA3	868	T +GSLRRG++D R LT+LA H G+ P N HY P +K+ETPT		
	950	FGR+ YWLDAP GDV AAGL P HPLL A V LA+ DG LLTGR+ +HPL D+		fusion site / restriction enzyme
	924	FGRRYWLDPATTDVTAAGLAPVGHFLGAAVGLAEGDGYLLTGRAPHTHFWLIDHA		
	1010	VGGAVLGGSAFTYELAVVGGYCTRIEQLTVHAPLVVFGGGVSVVGVAAADGEGRR		fusion site / restriction enzyme
	984	VAGTVLLGGTAYVELAVHVGGLCCFRLLEELTMAPLVLPDGGVALQVAVGAPDETGR		
aveA3	5221	AAGILGSAQQNYAANAALDRLAYRRAAGLPGVSLANGLNIEASGMTHLAGTMRRI		K9-ACP9 intermodular region
milA3	5520	AAG+LG+AGQNYAANA LDALA RRA GLP +SLANGLNIE+ SGMTHL TD RI		
	5281	INPRLHPSHTFDALALFDALALDRFVLLPA--DLR---PAPFLFLQLLPATRRRT		fusion site / restriction enzyme
	5580	RRL F++T DALALFDALA DRP L+FA DLR A FL +FA RIT		
	5336	RTTTGGALNGAGLNGRLAGQTHECOHTLALVRSRIATVLGHTTPTDITPDRFRDLG		fusion site / restriction enzyme
	5637	R + GA+ A L RLA O +G FLI +VR+H A VLGH T + FD AFR+LG		

그림 36. MilA3 발현벡터 제작을 위해 수행한 fusion site 결정을 위한 sequence alignment

MilA3를 구성하는 영역은 milbemycin 야생생산균주인 *Str. hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*로부터 확보된 생합성 유전자를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 결

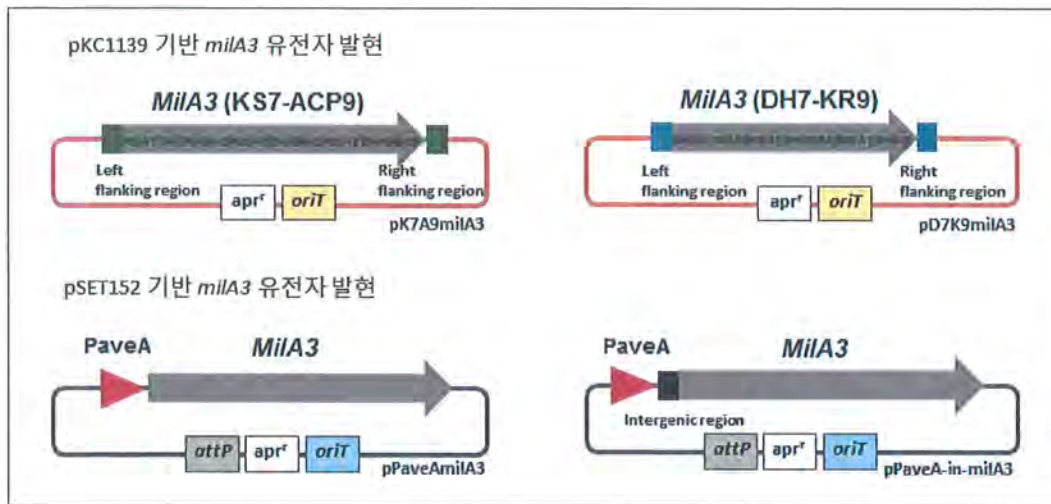


그림 37. pKC1139 및 pSET152 기반의 milA3 발현 벡터

과물은 pGEMTeasy 혹은 pLitmus28에 클로닝되어 enzyme digestion을 통해 일차적 확인 후 DNA sequencing을 통해 그 염기서열이 분석되었으며, 확인된 milA3 구성조각들은 앞서 언급한 aveA3의 upstream 및 downstream 조각과 함께 다단계의 ligation 반응을 거쳐 pKC1139에 클로닝하였다. 이에 제작완료된 pKC1139 기반의 milA3 치환 벡터를 각각 pK7A9milA3, pD7K9milA3으로 명명하였다 (그림 37).

한편, 생합성 유전자의 이중숙주발현에 있어 해당 이중숙주의 native promoter를 사용 시, 외래 promoter를 도입한 경우에 비해 효과적으로 이중발현 된다는 보고가 있다. 따라서, pSET152 벡터를 이용하여 milA3을 이중숙주에서 안정적으로 발현하기 위하여 avermectin 고생산균주의 native promoter (PaveA)를 milA3 유전자 upstream에 cloning하였다. 또한, milbemycin 야생생산균주인 *Str. hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*의 milbemycin 생합성 PKS 내에 존재하는 milA3과 milA4 유전자 간의 intergenic 영역이 milA3의 발현여부에 기여할 가능성을 고려하여 해당 intergenic region의 포함 여부에 따라 두 종류의 pSET152 기반 integration 벡터 pPaveAmilA3, pPaveA-in-milA3를 제작하였다 (그림 37).

다. Module 7의 치환벡터 제작

avermectin과 milbemycin의 구조적 차이를 결정하는 합성 유전자 중 하나인 aveA3와 milA3의 경우 각 단백질 부위를 구성하는 module 중 module 7의 차이에 의해 대사물질의 구조적 차이가 유발되는 것이다. Polyketide 합성 효소간의 module의 단백질-단백질 상호 작용은 Polyketide 합성 효소간의 상호작용에 중요하므로 전체 유전자를 교체하는 것이 바람직할 것이나, 앞서 기술한 바와 같이 milA3 유전자의 크기가 매우 크기 때문에 module 7만을 치환 하는 것을 고려하였다. 앞서 구성된 발현벡터들과 마찬가지로 단백질 간의 상호 작용 및 이중 숙주 균주에서 발현이 가능한 프로모터가 중요하기 때문에 module7 교체 부위를 그림과 같이 구성하였다 (그림 38). *Str. avermitilis* DBM-01로의 도입을 위해 상기 교체부위를 pKC1139 벡터에 도입하여 pKC-Mmo7A, pKC-Mmo7B 로 명명하였다.

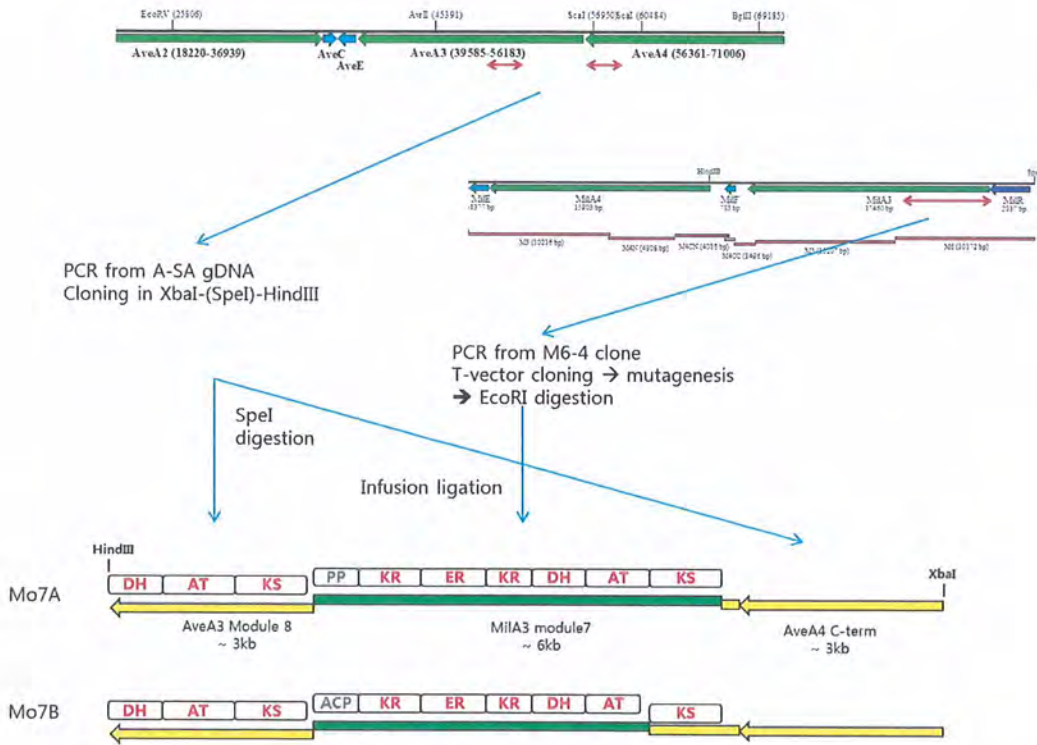


그림 38. module 7 교체부위의 제작

라. milA3 발현벡터의 *Str. avermitilis* DBM-01 내로의 도입

제작한 pKC1139 기반의 milA3 발현 벡터 pK7A9milA3, pD7K9milA3는 *Str. avermitilis* DBM-01 균주 및 *Str. avermitilis* DBM-01-K7A9thior, DBM-01-D7K9thior로 각각 도입하였다. 이때, conjugation을 통한 벡터의 도입을 수행하고 7 ~ 10 일 뒤 아프라마이신 저항성을 지닌 콜로니를 선별하여 37 °C에서의 배양을 통해 항생제 저항성 여부를 재확인 후 얻은 콜로니에 대해 PCR 및 PCR 결과물에 대한 sequencing을 수행하여 일차교차 균주를 선별하였다. 이 콜로니로부터의 generation을 통해 apramycin 저항성을 잃은 콜로니를 선별하고 PCR 분석을 통해 최종 milA3가 치환된 이차교차 균주를 확보하였다.

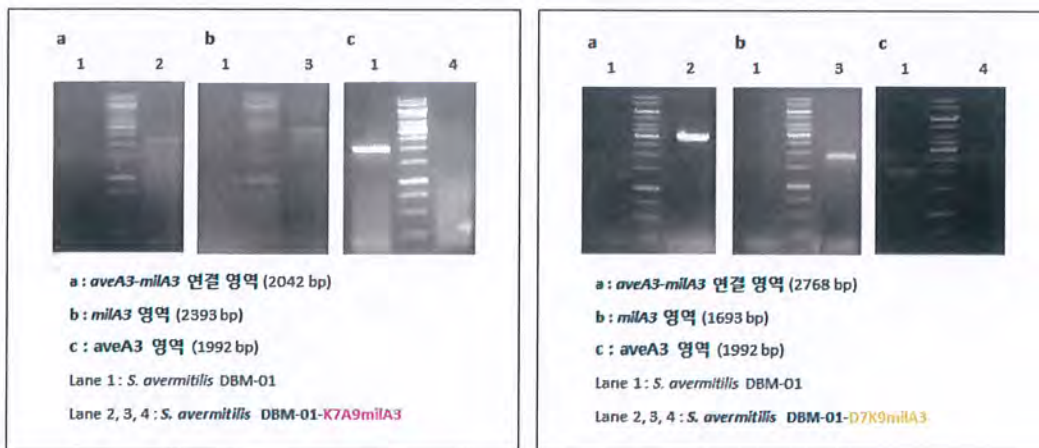


그림 39 PCR 분석을 통한 milA3 치환 균주의 확인

해당 *milA3* 치환균주를 각각 *Str. avermitilis* DBM-01-K7A9*milA3* 및 DBM-01-D7K9*milA3* 으로 명명하였다 (그림 39).

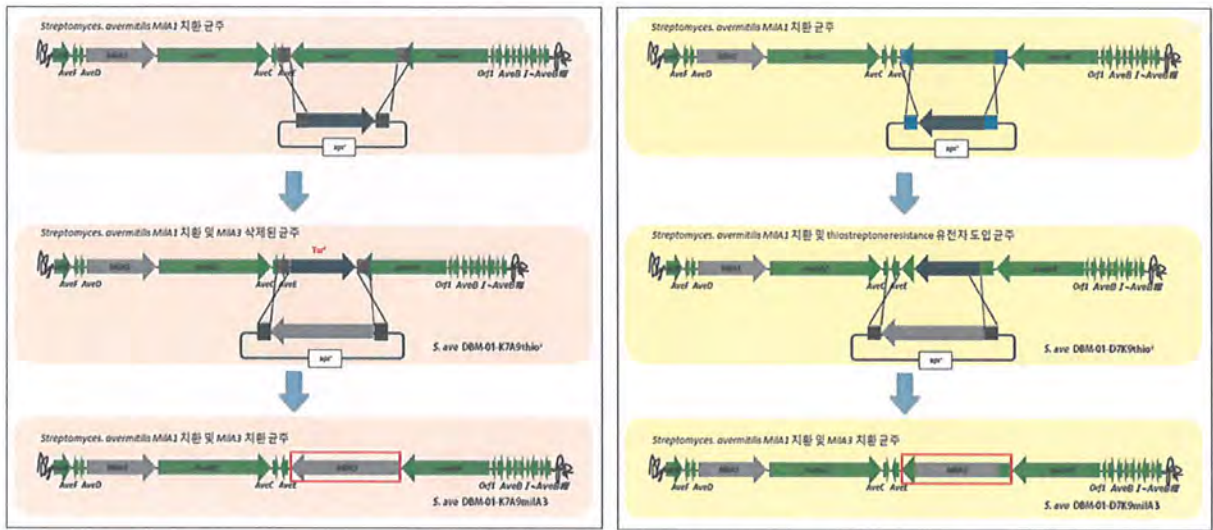


그림 40. *Str. avermitilis* DBM-01 기반 *AveA3*의 KS7~ACP9 영역 혹은 DH7~KR9 영역이 *milA3*로 치환된 균주의 제작

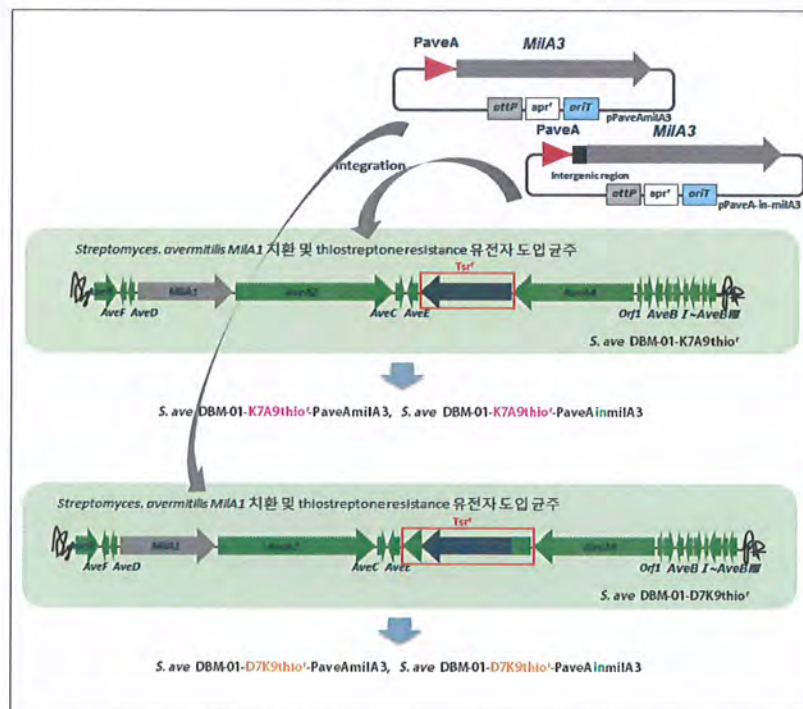


그림 41. *Str. avermitilis* DBM-01 기반 *aveA3*의 KS7~ACP9 영역 혹은 DH7~KR9 영역 deletion 및 *milA3* integration 벡터 도입균주의 제작

pSET152 기반의 *milA3* integration 벡터 pPaveAmilA3, pPaveA-in-milA3 또한 conjugation 방법을 통해 DBM-01-K7A7thior 및 DBM-01-D7K9thior로 형질전환 하였다. 이를 통하여 *milA3*가 도입된 4가지 종류의 밀베마이신 생산균주 *Str. avermitilis* DBM-01-K7A9thior - PaveAmilA3, DBM-01-K7A9thior - PaveAinmilA3, DBM-01-D7K9-

thiorPaveAmilA3, DBM-01-D7K9thior-PaveAinmilA3를 얻을 수 있었다 (그림 40, 41).

마. module 7 치환 벡터의 *Str. avermitilis* DBM-01로의 도입

Module 7 치환벡터를 *Str. avermitilis* DBM-01 균주내로 도입 시키고, 상동재조합이 일어나도록 유도하여 *Str. avermitilis* DBM-01 균주의 module7이 milA3의 module7로 치환된 형태의 균주를 확보하고자 하였다. 이를 위해 앞서 제작한 pKC-Mmo7A, pKC-Mmo7B를 형질전환법을 통해 *Str. avermitilis* DBM-01로 도입하고 1, 2차 교차를 통해 DBM-01의 aveA3의 module 7 위치가 milA3의 module 7으로 치환된 균주를 PCR을 통해 확인하였다 (그림 42, 43).

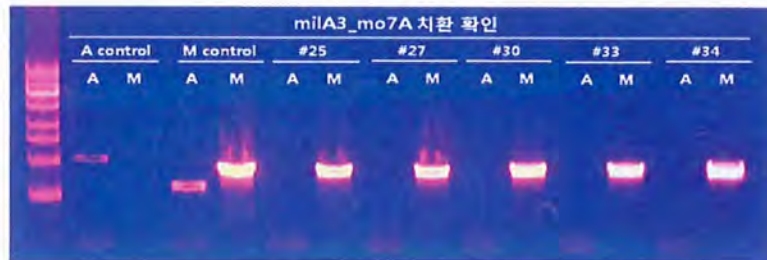


그림 42. Mo7A 형태로 치환된 균주의 확인. A는 aveA3 특이적 primer, M은 milA3_module7 특이적 primer를 이용하여 PCR을 수행한 경우임.

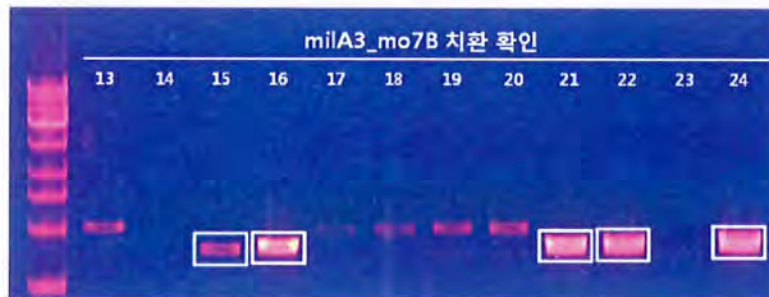


그림 43. Mo7B 형태로 치환된 균주의 확인.

Mmo7A가 치환된 것이 확인된 균주는 *Str. avermitilis* DBM-03-A로 명명하였고 한국생명공학원에 2015년 8월 31일 기탁하였다 (수탁번호 KCTC12890BP). Mmo7B가 치환된 것이 확인된 균주는 *Str. avermitilis* DBM-03-B로 명명하고 한국생명공학원에 2015년 8월 31일 기탁하였다 (수탁번호 KCTC12891BP).

바. milA3 발현 균주의 배양

Milbemycin의 생산확인을 위한 종균배양 및 생산배양 배지의 조성은 아래와 같다 (표 21). 제시된 각 분량의 soluble starch, yeast extract, corn steep liquor, KH₂PO₄는 삼차수를 사용하여 혼합된 후 NaOH를 사용하여 pH 7.0로 맞춰진 뒤 121 °C에서 20 분간 고압 멸균하였다. ISP4 고체배지 (표 21)에 배양한 조절 유전자 과발현 균주의 포자 혹은 포자액을 250mL 플라스크 내 25 mL 종균배지에 접종한 뒤 28 °C, 230 rpm에서 40~48 시간 배양하



였다.

표 21. ISP4 배지 조성

Reagents	g/L
Soluble starch	10.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
NaCl	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
CaCO ₃	2.0
Trace salt solution	1 mL
Agar	20.0

Soluble starch, soybean flour, skim milk, KH₂PO₄를 pH 7.0에 맞춰 제조한 생산배양 배지를 종균배양 배지와 같은 조건하에서 고압멸균한 뒤, 25 mL의 배지를 포함하는 250 mL 생산배양 플라스크를 사용, 생산배지 총 부피의 5 % 비로 종균배양액을 접종하여 230 rpm 28 °C 조건에서 10~15 일간 배양하였다(표 22).

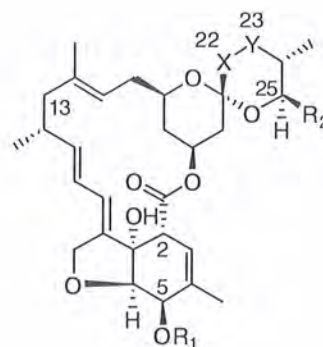
표 22. 종균배양 및 생산배양 배지 조성

Seed culture	g/L	Main culture	g/L
Soluble starch	30.0	Soluble starch	80.0
Yeast extract	15.0	Soybean flour	10.0
Corn steep liquor	5.0	Skim milk	15.0
KH ₂ PO ₄	0.4	KH ₂ PO ₄	0.5

Str. avermitilis DBM-01 균주 내로 milA3 발현 벡터가 도입됨에 따라 생성 될 수 있는 예상 milbemycin의 구조는 다음과 같으며 (표 23), Milbemycin A3/A4의 30/70 % 표준품인 milbemectin (Bioaustralis, Australia) 및 milbemycin D (Bioaustralis, Australia)을 사용하여 본 HPLC 분석 조건에서의 해당 milbemycin의 retention time (RT) 및 245 nm에서의 absorbance를 확인하였다.

표 23. Milbemycin 의 구조

Milbemycins	R1	R2	X-Y
A3	H	CH ₃	CH ₂ -CH ₂
A4	H	CH ₂ CH ₃	CH ₂ -CH ₂
D	H	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ -CH ₂
B2	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH ₂
B3	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ -CH ₂
G	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ -CH ₂



확보된 균주의 배양 추출물을 분석한 결과, pSET152 integration을 통해 milA3를 *Str. avermitilis* DBM-01 균주로 도입한 경우 및 aveA3의 N-terminal, C-terminal의 docking 영역만이 PKS 내에 보존된 채 milA3의 KS7~ACP9 영역을 pKC1139를 통해 도입한 경우에는 올리고마이신의 peak만이 관찰된 반면, aveA3의 N-terminal, C-terminal의 docking 영역에 더해 KS7, AT7 및 ACP9를 avermectin PKS 내에 남겨두고 milA3를 발현한 경우인 *Str. avermitilis* DBM-01-D7K9milA3의 경우 milbemycin A3, A4, B2, D, B3, G 가 모두 생산됨을 확인하였고 이중 A3, A4, D는 표준품 milbemycin과 동일 RT값을 지님이 확인되었음 (그림 44). Milbemycin 생산이 확인된 균주 *Str. avermitilis* DBM-01-D7K9milA3는 *Str. avermitilis* DBM-03-C로 명명하였고 한국생명공학연구원에 KCTC13083BP (기탁일 2016.08.24) 기탁하였다.

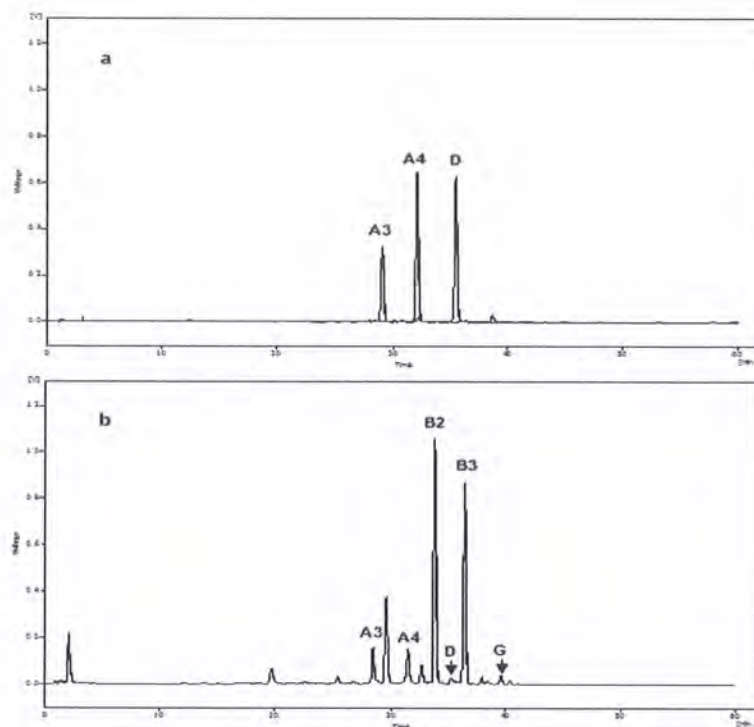


그림 44 표준품 milbemycin A3, A4, D (a) 및 milA3 치환 균주 *Str. avermitilis* DBM-01-D7K9milA3 (DBM-03-C)의 배양 추출물 (b) HPLC 분석 크로마토그램

Milbemycin A3/A4의 30/70 % 혼합물인 milbemectin의 농도 기울기에 따른 HPLC 분석결과를 사용하여 정량곡선을 유도한 뒤 이를 기반으로 배양 시료로부터 추출된 milbemycin의 양을 결정하였다. 총 3회 이상의 배양을 통해 얻은 평균값으로 계산된 여섯 종류 milbemycin의 플라스크 수준에서의 총 생산량은 305 mg/L 로 예상되었다.

HPLC 상에서 분석된 여섯 milbemycin의 해당 분자량 값은 Xselect® CSH column XP (2.1 × 100 mm, 2.5 μm)을 통해 Waters XEVO® G2S Q-TOF mass spectrometer 상에서 확인되었다. milbemycin A3에 해당하는 m/z=527.3027, A4 및 B2에 상응하는 m/z=541.3171, D와 B3를 나타내는 m/z=555.3327, G의 값인 m/z=569.3484을 negative ion mode에서 확인할 수 있었다 (표 25).

표 24. 생산 milbemycin의 HPLC 및 UPLC-qTOF-HR-MS 분석

Milbemycin	HPLC RT (min)	Q-TOF-HR-MS RT (min)	[M-H]	[M+Na ⁺]
A3	29.2	3.07	527.3087	551.2979
A4	32.1	3.70	541.3244	565.3136
B2	34.7	4.25	541.3244	565.3136
D	35.7	4.75	555.3400	579.3292
B3	36.9	5.03	555.3400	579.3292
G	40.2	6.20	569.3557	593.3449

사. module 7 치환 균주 배양

module 7이 치환된 DBM-03-A, DBM-03-B의 배양을 통해 생산되는 물질을 확인하기 위해 표준 배양조건과 동일하게 배양을 수행하고 배양액을 HPLC를 이용하여 분석하였다 (그림 45)

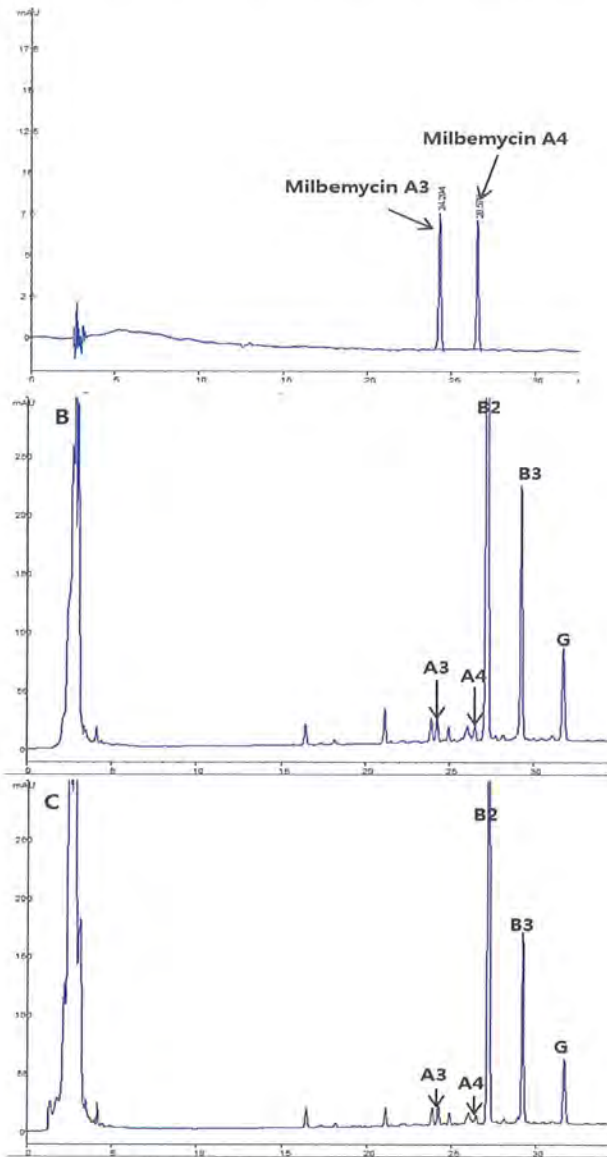


그림 45. module 7 치환균주의 배양 Profile

그 결과 module 7 치환의 경우 milA3 발현백터 도입의 경우와 동일하게 milbemycin을 생성함을 알 수 있다

6. 5-methylated milbemycin 제거를 위한 aveD 유전자 활성제거

상업용으로 생산되고 있는 milbemycin의 경우 5번 탄소 위치가 hydroxylation 되어 있는 milbemycin A3와 A4로 구성되어 있다. 5-위치가 hydroxylation 되어 있는 milbemycin B-type에 비해 A-type의 활성이 높기 때문으로 생각된다. 5 탄소 위치의 hydroxyl group을 methylation 시키는 데 관여하는 효소는 aveD (milbemycin 생산 원균주의 경우 milD)로 aveD의 활성을 제거하면 B-type의 milbemycin 이 제거될 것으로 예상하였다.

가. aveD 활성 제거를 위한 백터 제작

aveD 유전자의 활성을 제거하기 위한 방법으로, 유전자 내에 stop codon을 도입하였다 (그림 46).

```

1      ATGATGGCCGTCCCGGAGCAGACCCCGCCCTCTTCCCTGGAAGTGGGGGACTACTACGAC
i      M M A V P E Q T P P S S L E V G D Y Y D
1      D G R P G A D P A L F P G S G G L L R

                                           TGA
61     CGTTTGACCGACCTCATGAATCGTGGCTGGGTGGGAACACCCACCTCGGATACTGGCCG
21     R L T D L M N R A L G G N T H L G Y W P
20     P F D R P H E S C A G W E H P P R I L A

ADstR1 -> ACGGCAGTTGACCGGGCAAG <- ADstF1
121    CAGCCGGGGGACGGCAGTTCACCGGGCAAGGCCGCCGACCGGTCACCGATCTCCTCATC
41     Q P G D G S S P G K A A D R L T D L L I
40     A A G G R Q F T G Q G R R P A H R S P H

181    GGCAAGCTGAGAGGCATCACGGCCCGCCGGTCTGGACGTCGGCTGCGGTTCGGAAAG
61     G K L R G I T G R R V L D V G C G S G K
60     R Q A E R H H G P P G P G R R L R F R K
    
```

그림 46. aveD 활성 제거 설계

AveD 불활성화를 위해 DBM-03-A 균주 genomic DNA, pCR2.1 백터를 template로 다음 그림과 같이 primer를 제작하여 3개 fragment를 PCR을 통해 확보하고, 이를 ligation 하여 AveD 불활성화 백터를 제작하였다 (그림 47).

나. aveD 활성억제 백터의 DBM-03 균주로의 도입

제작된 aveD 활성억제 백터를 E. coli-Streptomyces shuttle 백터인 pKC1139에 클로닝한 후, conjugation을 통해 DBM-03 균주로 도입하였다. pKC1139 백터의 marker인 apramycin에 저항성이 있는 colony를 확보한 후 apramycin 항생제가 첨가된 ISP-4 배지에 스트리킹 한 뒤 37°C에서 배양하여 일차교차 균주를 확보. 일차교차 균주를 항생제가 첨가되지 않은 ISP-4에서 배양하여 apramycin 저항성이 없어진 colony를 선별하고 이들의

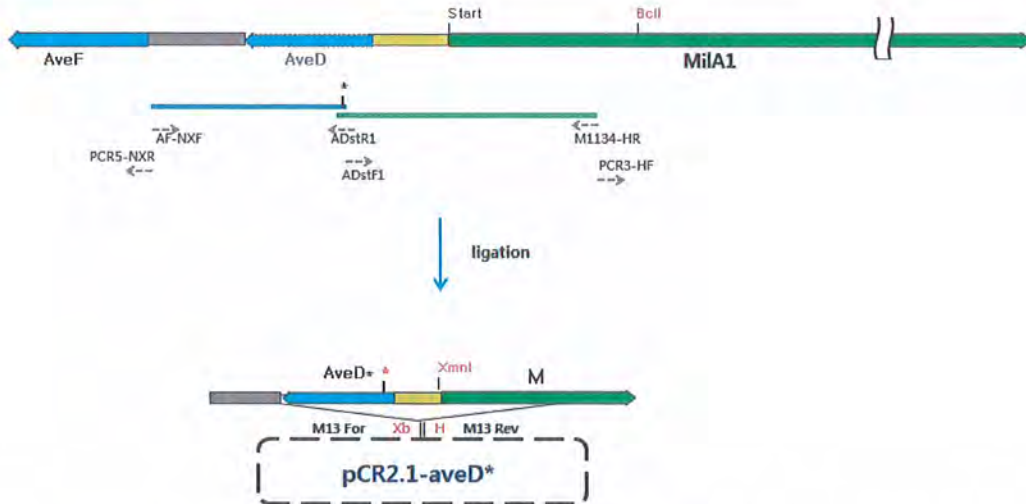


그림 47. aveD 불활성화 벡터의 제작

genomic DNA의 염기서열을 확인하여 stop codon이 치환되었는지 확인 한 후 최종 균주를 선발하고 *Str. avermitilis* DBM-04 (이하 DBM-04)라 명명하였다 (그림 48).

```

TGGCCGTCCCGGAGCAGACCCCGCCCTCTTCCCTGGAAGTGGGGGACTACTACGACCGTT 374
|||||Sbjct 5758
TGGCCGTCCCGGAGCAGACCCCGCCCTCTTCCCTGGAAGTGGGGGACTACTACGACCGTT 5699 Query 375
TGACCGACCTCATGAATCGTGCCTGGGTGGGAACACCCACCTCGGATACTGGCCGCAGC 434
|||||Sbjct 5698
TGACCGACCTCATGAATCGTGCCTGGGTGGGAACACCCACCTCGGATACTGGCCGCAGC 5639 Query 435
CGGGGACGGCAGTTGACCGGGCAAGGCCGCCGACCGGCTCACCGATCTCCTCATCGGCA 494
|||||Sbjct 5638
CGGGGACGGCAGTTCAACGGGGCAAGGCCGCCGACCGGCTCACCGATCTCCTCATCGGCA 5579 Query 495
AGCTGAGAGGCATCACGGGCCGCCGGTCTGGACGTGGGCTGCGGTTCCGAAAGCCGG 554
|||||Sbjct 5578
AGCTGAGAGGCATCACGGGCCGCCGGTCTGGACGTGGGCTGCGGTTCCGAAAGCCGG 5519 Query 555
CGGTGCGGCTCGCCCTGAGCGGCCCGTCGATGTCGTGCGGCTGACGGTGAGCGAGGTTTC 614
|||||Sbjct 5518
CGGTGCGGCTCGCCCTGAGCGGCCCGTCGATGTCGTGCGGCTGACGGTGAGCGAGGTTTC 5459
  
```

그림 48. stop codon이 치환된 균주의 확인

aveD 활성이 제거된 DBM-04 균주의 경우 flask 배양에서 milbemycin A3를 주로 생산하고 milbemycin A4와 milbemycin D를 동시에 생산하는 것을 알 수 있었다 (그림 49). 또한, RT 13분에 milbemycin과 동일한 흡광 스펙트럼을 갖고 있는 부산물이 생성됨을 확인할 수 있었다.

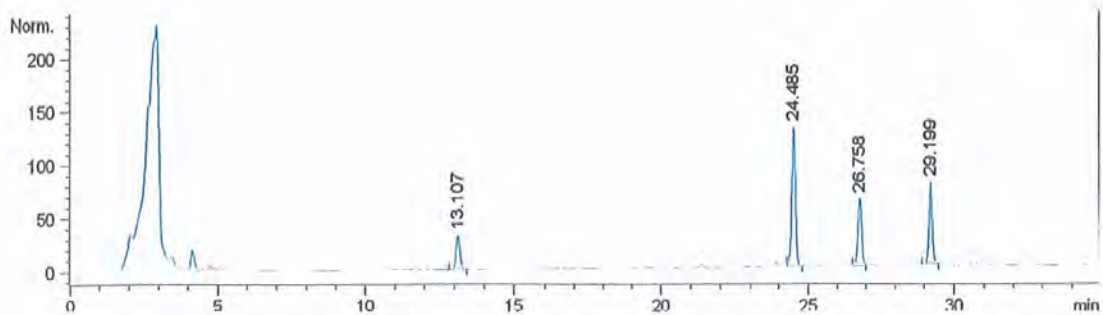


그림 49. aveD 활성 제거 균주의 milbemycin 생산 패턴

따라서, milbemycin A3, A4를 생산하는 *Str. avermitilis*를 제작할 수 있었다. milbemycin 균주의 개발과정을 그림 50에 정리하였다.

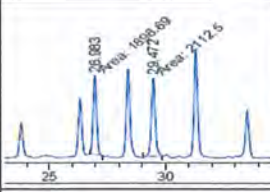
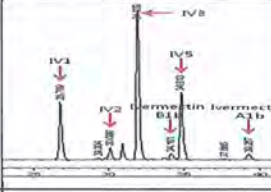
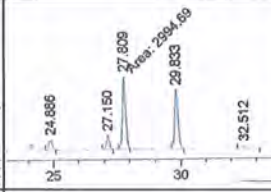
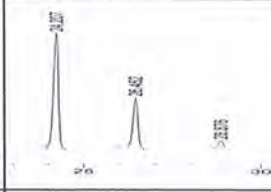
균주	Avermectin 생산균주	DBM-01	DBM-03	DBM-04
유전적 특징	모균주 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	모균주의 aveA1 유전자 위치에 milA1 도입	DBM-01 균주 aveA3 에 milA3 삽입	DBM-03 균주의 aveD 활성 제거
HPLC profile				
주요 대사물질	Avermectin A1a, B1a, A1a, B1b A2a, B2a, B2a, B2b	Ivermectin analogue IV1, IV2, IV3, IV4, IV5, IV6	Milbemycin 5-OH type: A3, A4, D 5-methoxy type: B2, B3, G	Milbemycin A3, A4, D

그림 50. Milbemycin을 생산하는 *Str. avermitilis*의 제작

제 3 절 밀베마이신 생산균주 개량

aveD 활성이 제거된 DBM-04의 milbemycin 생산성을 증진시키기 위해 스크리닝 시스템을 구축하고 무작위 돌연변이를 수행하였다. 또한, milbemycin 생산에 관여하는 대사 전구물질을 및 milbemycin 생산 유전자 집단 발현을 강화하기 위해 전구물질 합성과 관여하는 효소 및 조절유전자를 도입 혹은 제거하여 milbemycin 생산성을 증가하고자 하였다. 또한, milbemycin A4의 전구물질인 propionyl-CoA의 이용도를 강화하여 milbemycin A4의 비율을 증가시키고자 하였다.

1. 무작위 돌연변이에 의한 Milbemycin 생산균주 생산성 증가

가. 스크리닝 시스템 구축

방선균의 경우 생산 배양시간이 길고 배양조건에 따라 대상물질을 생산하지 않는 경우도 많기 때문에 다수의 돌연변이 균주의 생산성을 확인할 수 있는 효과적인 스크리닝 시스템을 구축하는 것이 필요하다. 이를 위해 24-well plate를 기반으로 한 small scale fermentation 조건을 확립하고 butanol 추출 후 흡광을 이용한 분석조건을 확립하였다.

(1) 24-well plate 기반의 small scale fermentation 조건 확립

생산성 향상 정도를 비교하기 위해서는 배지 및 배양조건에 있어 균주의 생산능력 외 가능한 제약조건이 없는 것이 바람직함. 특히 방선균의 경우 대부분 고생산성을 보이기 위해서는 산소요구도가 높으며 장기간 배양하여야 하기 때문에 영양물질의 고갈 및 증발문제

도 고려해야 한다. 이를 위해 산소투과도가 높은 membrane 시스템을 갖춘 EnzyScreen사의 24-well 배양시스템을 채택하여 사용하였다 (그림 51).

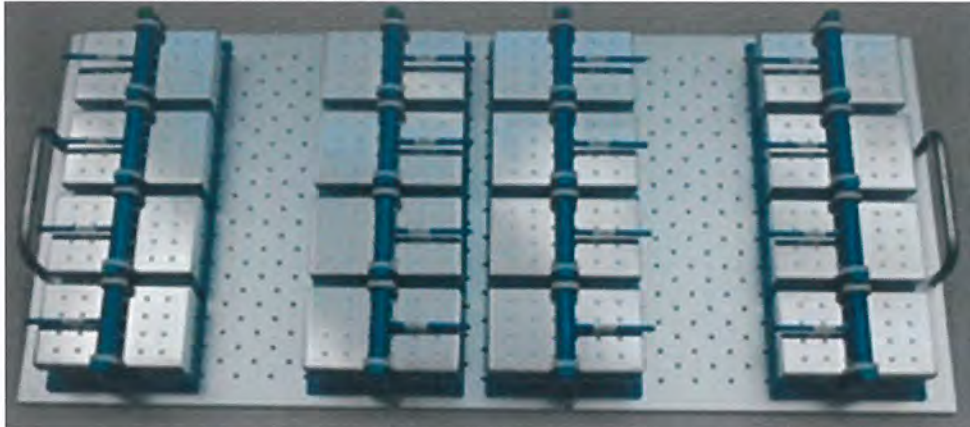


그림 51. 24-well microplate small cultivation system (www.enzyScreen.com)

small scale에서 배양시 물질 생산을 위해 필요한 적절한 산소전달능력을 갖추기 위해 각 well 당 배지 부피가 중요한 요인 중에 하나이다 적절한 배지 부피를 결정하기 위해 생산 배지 부피별 생산성을 비교하였다. 각각 24-well에 생산배지를 해당 부피로 첨가한 후 200rpm에서 10일간 배양을 진행하였다 (그림 52).

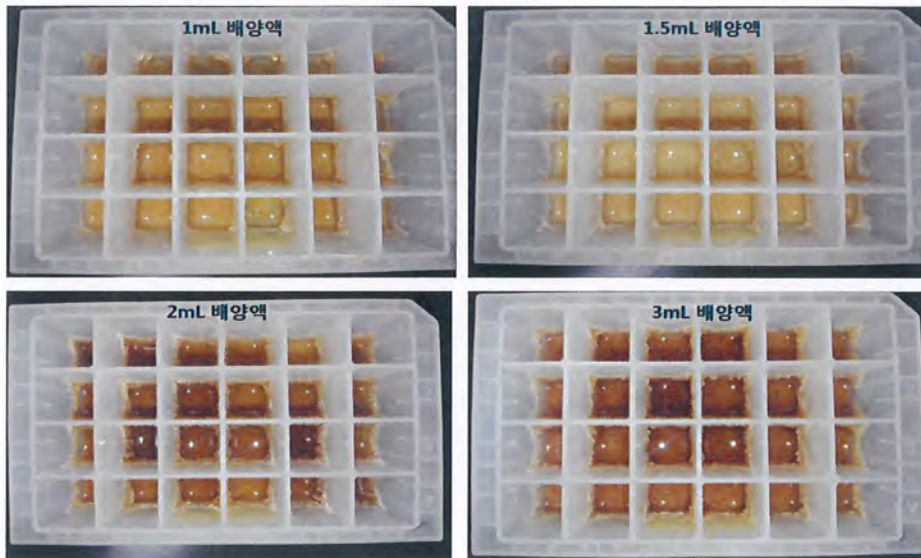


그림 52. 24 well에서 배지 부피 별 균주배양

그림 52 에서 알 수 있듯이 1mL와 1.5mL 배양액의 경우 flask 배양에서 볼 수 있는 작은 pellet 형태로 노란빛을 띄며 성장하였으나 2mL 이상에서는 pellet이 커지고 갈색으로 자라는 것을 확인할 수 있었다. 그림 53은 각 well 별 최종 pH 및 탄소원의 소모 정도 (Reflective index로 나타냄)와 각 well의 ethanol 추출액의 생산성 (흡광도로 나타냄)을 비교한 것이다. 그림에서 알 수 있듯이 1mL 배양액의 경우 생산성이 높지만 well 간의 편차가 크고 2mL ~3mL 의 경우 생산성이 낮음을 알 수 있다. 또한, 동일한 seed를 사용하였기 때문에 이상적인 경우 최종 pH와 RI도 유사할 것으로 생각되었



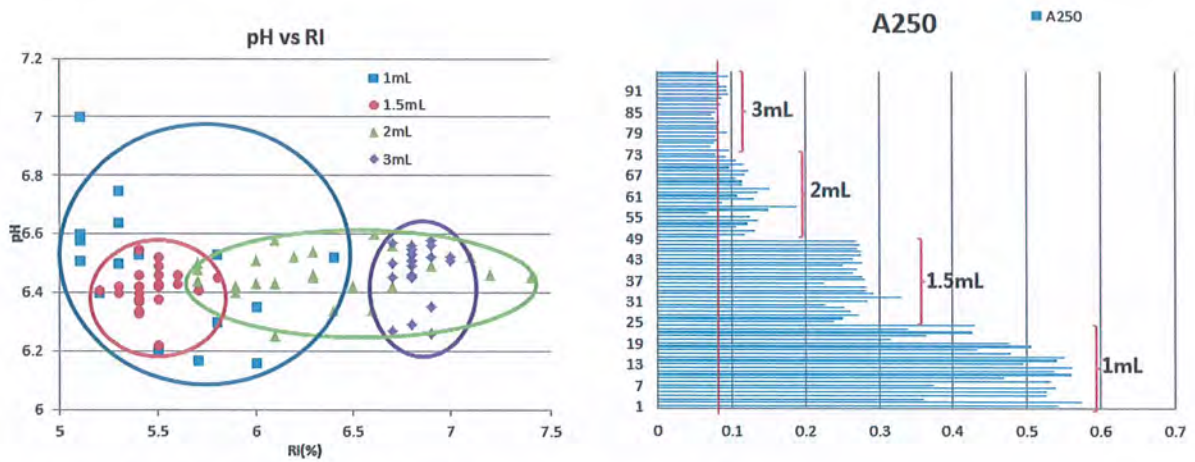


그림 53. 생산배지 부피별 배양액의 최종 pH 및 RI와 well 당 흡광도.

는데, 이는 1.5mL에서 부합되었다. 따라서, 적절한 배지 부피는 1.0~ 1.5mL로 부피를 1.3 mL로 결정하고 정규성을 검증하였다.

(3) 24-well plate 기반의 small scale fermentation 조건 검증

milbemycin 생산 균주인 DBM-04를 24-well에 배양하여 정규성을 검증하였다. 그림 54에서 볼 수 있듯이 동일한 seed로 DBM-04를 배양한 경우 well 간 생산성이 정규분포를 보임을 알 수 있다. 따라서, 이를 기준으로 우수한 돌연변이 균주를 선발할 수 있을 것으로 사료되었다.

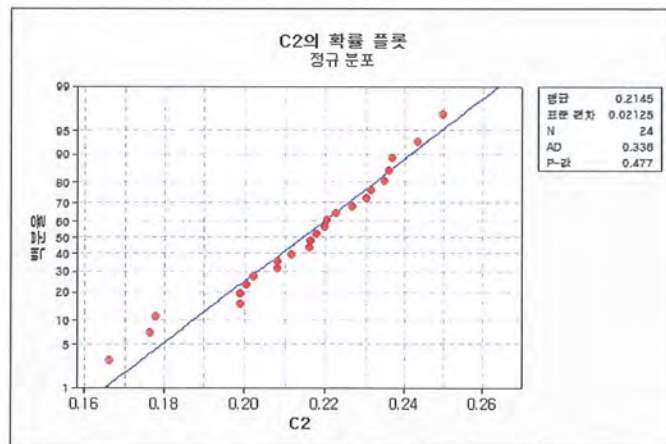


그림 54 DBM-04 균주의 24-well 배양시 생산성의 정규성 검증.

나. 돌연변이 유발조건의 확립

(1) UV 기반 돌연변이 유발조건 확립

UV 조사를 통해 돌연변이를 유발하는 조건을 얻기 위해 UV 조사시 milbemycin 생산균 주 포자의 생존율을 확인하였다. 포자 농도는 2.9×10^7 으로하고 40W UV lamp를 60cm 떨어뜨려 UV에 노출한 후 시간별 생존율을 확인하였을 때, 사멸곡선은 그림과 같이 나타났다 (그림 55).

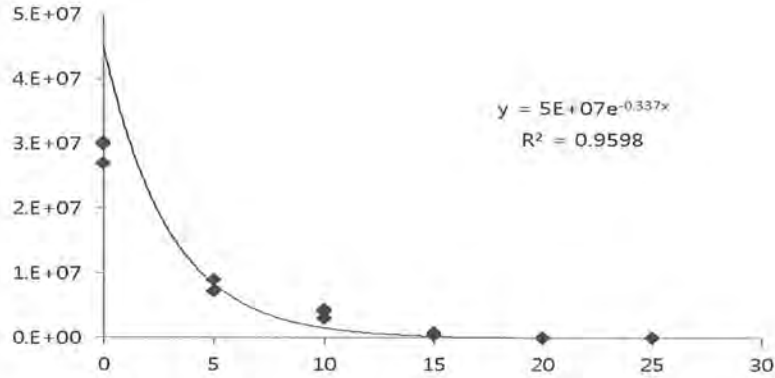


그림 55. UV 조사시간에 따른 사멸율. X 축은 조사시간 (초), y 축은 생균수

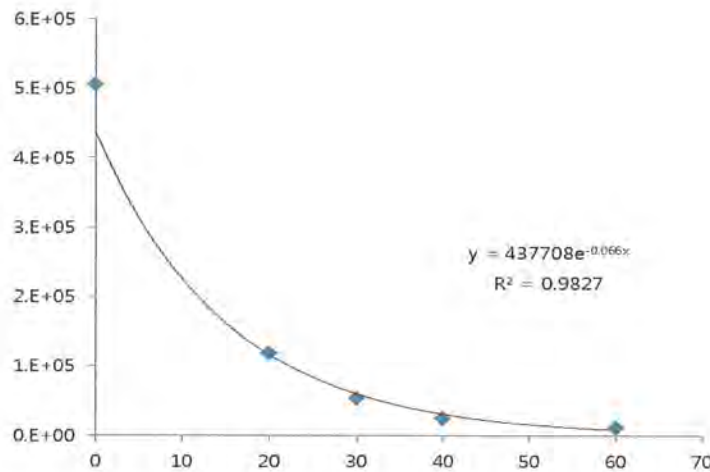


그림 56. NTG에 의한 사멸곡선

(2) Chemical mutagenesis 유발조건 확립

무작위 돌연변이를 유발하기 위한 chemical mutagen 은 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), Ethyl methanesulfonate (EMS), nitrous acid 등 다양한 것이 있다. 이들 중 대표적인 mutagene 중 하나인 NTG에 대한 돌연변이 유발조건을 얻고자 사멸을 곡선을 확보하였다. 포자 농도는 5.4×10^9 cfu/mL 로 하여 PBS buffer에 현탁 후 28도, 230rpm 에서 2시간 동안 activation 하였다. 포자 현탁액에 최종 1 mg/mL가 되도록 NTG를 첨가하고 다시 28도에서 shaking incubation을 수행하면서 10분 간격으로 sampling 한 후, washing하여 NTG를 제거하고 생균수를 측정하였다. 그 결과 얻어진 사멸곡선은 그림과 같다 (그림 56).

다. 돌연변이 균주 스크리닝

(1) 무작위 돌연변이를 통한 milbemycin 생산성 향상 균주 개발

생산성이 증가한 돌연변이 균주를 확보하기 위해 다양한 조건에서의 내성을 지닌 균주에 대한 screening을 다음과 같이 실행하였다. 사멸율 90~99% 조건으로 UV를 조사 혹은 70% 사멸율의 조건으로 NTG 처리한 후, 내성 대상물질이 함유된 ISP4 plate에서 도말한 후, 28도에서 7일간 배양하였다. colony가 형성된 후 이를 patching하고 다시 28도에서 10일간 배양하였다. colony의 spore가 충분히 형성된 후 이를 긁어 24-well에 직접 접종하였다.

(2) Streptomycin 내성균 screening

돌연변이 내성을 부여하기 위한 조건은 다양하나 우선 ribosome에 작용하는 항생제인 streptomycin에 대한 내성균을 screening 하였다. 모 균주인 DBM-04의 경우 streptomycin 0.1mg/L 도 성장이 원활하지 못하여 streptomycin에 매우 민감한 것으로 조사되어 내성 균주를 확보하는 경우 생산성 향상이 기대되었다. 무작위 돌연변이 균주는 다음과 같이 확보하였다. 사멸율 90~95% 조건으로 UV를 조사한 후, 0.1mg/L streptomycin이 함유된 ISP4 plate에서 도말한 후, 28도에서 7일간 배양하였다. colony가 형성된 후 이를 patching하고 다시 28도에서 10일간 배양하였다. colony의 spore가 충분히 형성된 후 이를 긁어 24-well에 직접 접종하였다. 9일 배양 후 배양액을 추출하고 흡광도를 비교하였다. UV mutagenesis 후 streptomycin 내성이 있는 3,600 여개의 colony에 대해 24-well 배양을 하여 흡광도를 비교하였을 때, 최종적으로 1개의 균주 3-H-9-8가 선발되었다. 돌연변이 균주의 평균 흡광도는 0.29 정도 이고, 선발균주의 흡광도는 0.4437로 약 1.5배 상승한 것을 확인할 수 있었다 (그림 57). 생산성 확인을 위해 1차 flask 배양을 진행하여 control인 DBM-04 균주의 milbemycin 생산성 대비 선발균주인 3-H-9-8의 생산성이 약 40% 증가한 생산성 향상을 보여줌을 확인하고 추가 개발을 진행하였다.

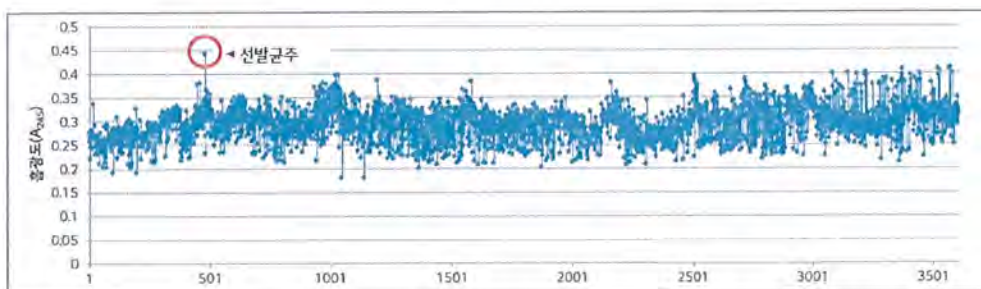


그림 57 Streptomycin 내성 균주의 스크리닝

(3) Propionate 내성균 screening

Propionate는 milbemycin의 전구물질인 propionyl-CoA와 methylmalonyl-CoA로 전환될 수 있는 화학물이다. Wang 등은 *Str. bingchenggensis*의 propionate 내성균주를 통해 milbemycin 생산량을 증가시키고 A4의 비율을 증가시켰다. 2차년도 *Str. avermitilis* DBM-01에 대한 시험에서 propionate를 0.3% 첨가시 생산성이 저하되었기 때문에



propionate에 대한 내성균주를 개발함으로써 milbemycin의 생산성 증가 및 A4 비율을 증가시킨 균주를 찾을 수 있을 것으로 기대하였다. 앞서 개발된 3-H-9-8을 500여개 균주에 대한 natural selection을 통해 3-H-9-8_7-10 균주를 확보하여 모균주로 사용하였고, 1,000여개의 propionate 내성을 갖는 균주를 스크리닝 하고 flask 평가를 진행하였다. 그 결과 7-10에 비하여 생산성이 향상된 균주를 확인할 수 없어 7-10 균주를 무작위 돌연변이에서의 선발균주로 정하였다.

본 과제 2차년도 및 3차년도에 걸쳐 구축한 small scale cultivation 시스템의 경우 월 1,000개의 mutant colony를 배양하고 생산성을 확인할 수 있을 것으로 예상된다. milbemycin 생산성 향상을 위한 무작위 돌연변이의 스크리닝 단계를 그림 58에 나타내었다.

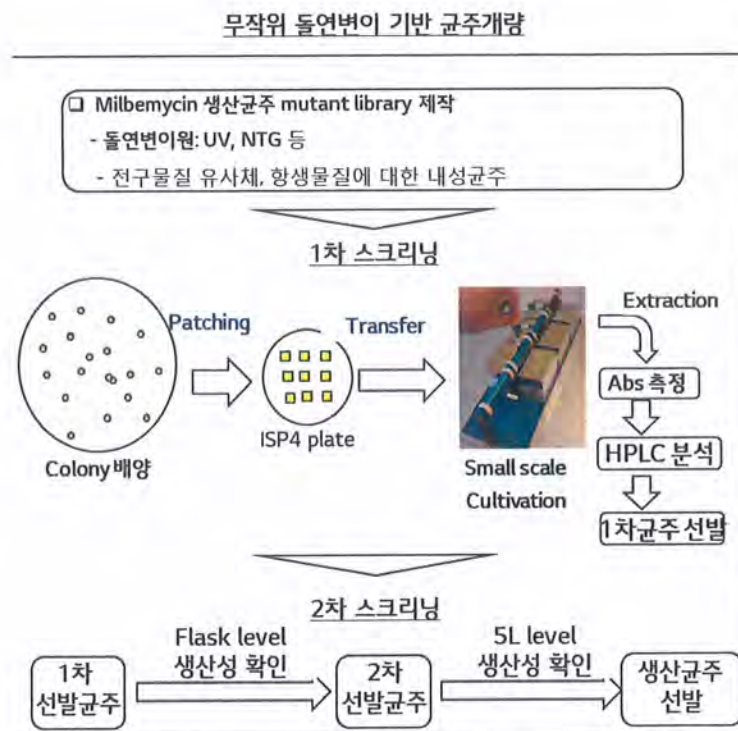


그림 58. 무작위 돌연변이 기반 균주개발의 과정

2. 대사공학 기반 milbemycin 생산 균주 개량

가. Milbemycin 생합성 전구물질 강화

Malonyl-CoA와 methylmalonyl-CoA가 Milbemycin의 생합성에 있어 전구체로 사용됨이 알려진 바, 대사공학을 통한 malonyl-CoA 및 methylmalonyl-CoA의 세포내 농도 증가를 통하여 milbemycin의 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 이들 전구체의 생합성에 관여하는 주 효소의 반응 메커니즘을 다음과 같다 (그림 55).

(1). Acetyl-CoA의 세포내 농도 증가 전략

E.coli로부터 확보된 pantothenic acid kinase 'panK' 유전자의 과발현이 세포 내

coenzymeA를 비롯 acetyl-CoA의 농도를 증가시킨다는 연구결과가 보고된 바 있고 (Lin et al., 2004), 이는 malonyl-CoA의 농도증가로 직결될 것으로 사료되었다. 따라서, 제작된 milbemycin 고생산균주에 panK 유전자를 과발현함으로써 목표물질인 milbemycin의 생산성을 보다 향상시키고자 하였다.

(2) 조효소 Coenzyme A의 세포내 농도 증가 전략

본 연구는 방선균 Streptomyces를 이중숙주로 사용하는 바, 해당 유전자의 최적발현을 위해 앞서 언급한 E. coli의 유래의 유전자와 동일한 기능의 panK 유전자를 Streptomyces peucetius로부터 확보하였다. 해당 유전자를 강력한 promoter로 입증된 바 있는 ermE*와 함께 pSET152 integration 벡터에 클로닝하였고 (그림 59), 제작된 벡터를 conjugation을 통해 milbemycin 생산균주 내로 도입하였다.

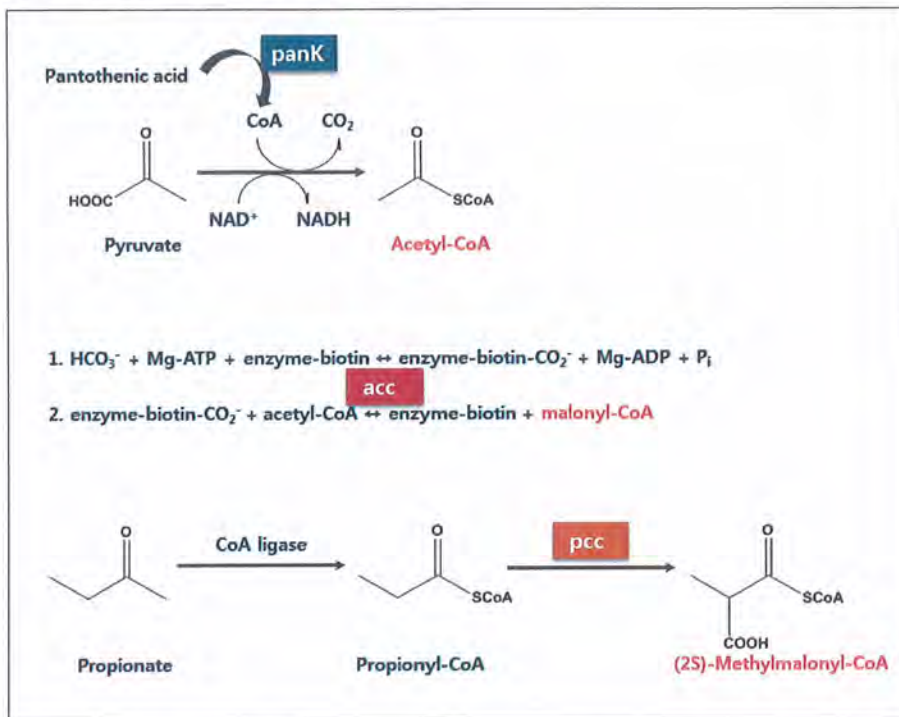


그림 59. Milbemycin 생합성 전구물질 합성에 관여하는 효소의 반응 메커니즘

(3) Malonyl-CoA의 세포내 농도 증가 전략

Malonyl-CoA는 일반적으로 E. coli에 비해 방선균 내에서 약 100-200배 이상의 농도를 지니기에 목표물질 생합성에 필요한 전구체를 풍부히 공급할 수 있을 것으로 기대되나, 이의 세포내 농도가 보다 증가될 시의 보다 큰 생산성 향상여부를 확인하고자 대사공학적인 접근을 시도하였다. 따라서 본 연구에서는 acetyl-CoA carboxylase ‘acc’의 과발현을 통해 이중숙주 내 malonyl-CoA의 농도를 높이고 이를 통한 생산성 증가를 유도하고자 하였다. Biotin-dependent enzyme 인 acc에 의한 효소 반응은 두 단계 반응으로, bicarbonate가 phosphorylation되어 형성된 중간체로부터 carboxyl group을 biotin에 전달되는 첫 번째 반

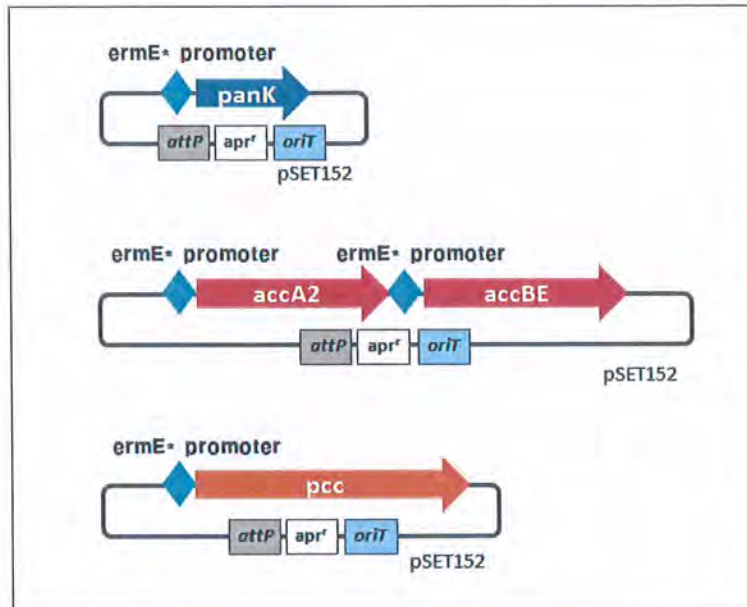


그림 60. CoA 생합성 유전자 발현벡터의 제작

응과 그 carboxyl group이 biotin으로부터 acetyl-CoA에 전달되어 malonyl-CoA가 형성되는 두 번째의 비가역적 반응으로 알려져 있다. 한편, 각 단계에 요구되는 필수 효소들 (1단계 반응: acc의 α -subunit인 accA2, 2단계 반응: β -subunit인 accB, acc의 활성화에 필수적인 ϵ -subunit인 accE)의 *Str. coelicolor*로부터의 유전자가 알려져 있고 그 염기서열분석 또한 완료되어 있다.

본 연구에서는 이들 유전자인 accA2, accB, accE를 PCR을 통해 확보하여 ligation을 통해 pSET152에 클로닝 하였음. 이 때, 각 유전자 단위의 효과적 전사를 위해 accA2의 5' 영역과 accBE의 5' 영역에 각각 ermE* promoter를 도입하여 (그림 60)의 벡터를 완성하였고 이를 milbemycin 생산균주로 형질전환하여 콜로니를 선별하였다.

(4) Methylalonyl-CoA의 세포내 농도 증가 전략

Milbemycin의 생합성에 쓰이는 주요 전구체인 methylmalonyl-CoA의 생합성경로는 3가지로, methylmalonyl-CoA mutase 'mcm', malonyl/methylmalonyl-CoA ligase 'matB', propionyl-CoA carboxylase 'pcc'가 알려져 있다. 본 연구팀에서는 MCM 생합성경로 유전자 (mutA, mutB)의 과발현을 통한 FK506의 2배 생산성 증가와 pcc 생합성경로 유전자 (pccA1, pccB, prpE)의 과발현을 통한 5배 rapamycin 생산성 향상을 확인한 바 있다 (Mo et al., 2009).

본 연구에서는 methylmalonyl-CoA 세포 내 농도 증가를 위한 전략으로 *Str. coelicolor* 유래의 pcc 유전자를 확보, pSET152_ermE* promoter로의 클로닝을 통해 벡터를 제작하였고 (그림 60), 이를 milbemycin 생산 균주에 도입하였다.

(5) 전구체 발현벡터 도입에 따른 생산성 향상여부 확인

각 전구체의 생합성 관련 유전자를 integration 기반 벡터로 제작 및 균주내로 도입하고 그 배양 결과물로부터 추출을 수행하여 대조군 milbemycin 생산 이중숙주와의 생산량 비교 시, 물질의 생산성이 대조군에 비해 크게 향상되는 것은 확인하지 못하였다. 이는 숙주로 사용한 avermectin 고생산균주 내 CoA 전구체의 공급이 이미 충분하기 때문인 것으로 판단된다.

나. pathway specific 조절 유전자인 aveR 과발현을 통한 생산균주의 개량

Milbemycin 고생산을 위한 이중숙주로 사용되는 *Str. avermitilis*의 avermectin gene cluster 내에 존재하는 aveR은 avermectin 생합성 경로에 있어 pathway-specific한 positive 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있는 반면 (그림 61), *Str. avermitilis*의 또 다른 주 생산물질로 avermectin과 생합성 전구체 malonyl-CoA 및 methylmalonyl-CoA를 공유하는 oligomycin의 생합성에 있어서는 negative 하게 작용하는 것으로 알려진 바 있다 (Guo et al. 2010).

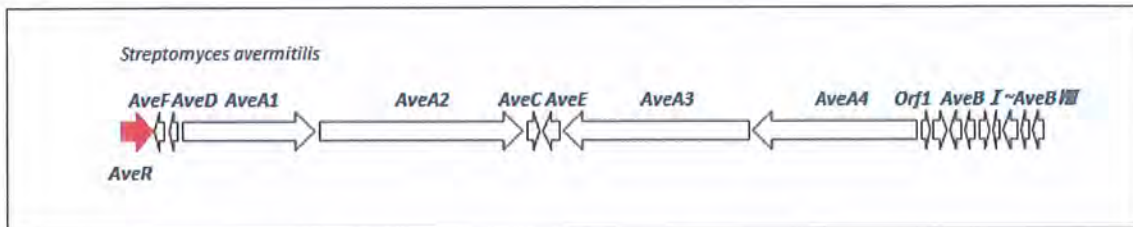


그림 61. *Str. avermitilis* 내에 존재하는 avermectin gene cluster

본 연구에서는 aveR을 포함하는 발현 벡터를 제작하여 이를 균주 내 chromosome으로 integration 하였다. 이때, aveR의 효과적 발현을 위해 해당 유전자의 native promoter 영역으로 알려져 있는 약 0.5 kb의 aveRp를 *Str. avermitilis* SA-01의 genomic DNA로부터 aveR과 함께 PCR하여 pSET152에 ligation 하는 한편 aveRp 대신 ermE*를 지닌 aveR 발현 벡터를 또한 제작하였다 (그림 62).

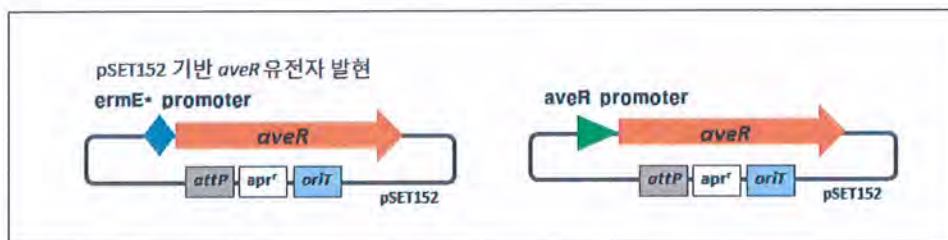


그림 62. pSET152 기반의 aveR 발현 벡터

이들 벡터는 milbemycin A3, A4, D의 생산이 확인된 DBM-04 균주내로 도입되었다. (그림 63). 해당 형질전환체의 250 mL 플라스크 수준에서의 배양 및 분석 결과, ermE* promoter 하에서 aveR promoter 하에서보다 더 큰 생산성 증가를 나타내어 milbemycin A3, A4, D를 포함하는 총량에 있어 대조군 대비 127%의 생산량 증가가 확인된다. (그림 64).



그림 63. PCR 분석을 통한 *aveR* 도입균주의 확인

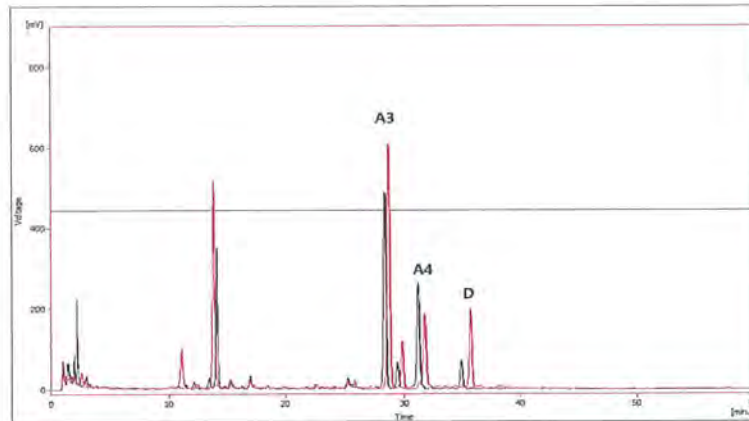


그림 64. *AveR* 과발현 균주 DBM-04_ermE*p_aveR 의 배양 추출물 (red peak) 및 대조균 *Str.* DBM-04 배양 추출물 (black peak) HPLC 분석 크로마토그램

3. Global 조절 유전자 과발현

가. *frr* 유전자 과발현 균주의 제작

*Str. coelicolor*의 global 조절 유전자로 알려진 *afsR*의 과발현 시 방선균 내 이차대사산물의 생산성 향상이 보고된 바 있다 (Floriano and Bibb, 1996). 따라서, milbemycin 생합성의 이종숙주로 사용되는 본 연구의 *Str. avermitilis*에서 효과적으로 작용 가능한 global 조절유전자를 선별하여 이를 과발현 하고자 하였다. 본 연구에서는, translational post-termination complex로부터의 ribosome 방출에 관여하는 ribosome recycling factor (RRF)를 암호화하는 *frr* 유전자를 선별하였다. *frr* 과발현 균주와 wild-type 균주의 비교실험 결과, *frr* 과발현이 세포성장 및 *ave* 유전자 발현을 촉진하여 궁극적으로 avermectin 고생산을 유도함이 보고된바 있다 (Li et al., 2010)

따라서, *Str. avermitilis* 유래의 약 560 bp의 *frr* 유전자를 확보, ermE* promoter 혹은 *frr*



의 native promoter와의 클로닝을 통해 pSET152 기반의 벡터를 제작하였고 (그림 65), 이를 milbemycin 생산균주인 DBM-04 내로 integration하여 PCR 분석을 통해 *frr*의 도입 여부를 확인하였다 (그림 66).

나. σ^{HrdB} 의 과발현 균주 제작

몇몇의 regulator 유전자는 avermectin 생합성 경로의 activator *aveR*을 통해서 작용하는 것으로 알려져 있다 (그림 67) (Chen et al. 2016), 그 중 σ^{HrdB} 는 pathway-specific 조절 유전자 *aveR*의 upstream promoter 영역을 직접적으로 인식하여 *aveR*의 transcription level을 유의미하게 증가시키는 것으로 알려져 있다. Zhuo 등은 예서는 *Str. avermitilis* 산업균주를 이용 *hrdB*의 mutant library 스크리닝을 통해 얻은 균주에서 기존 대비 50 % 생산성 향상으로 avermectin B1a의 생산을 확인한 바 있다 (Zhuo et al. PNAS 2010). 따라서, 본 연구에서는 σ^{HrdB} 를 *Str. avermitilis* 기반의 milbemycin 생산균주에 도입하여 milbemycin의

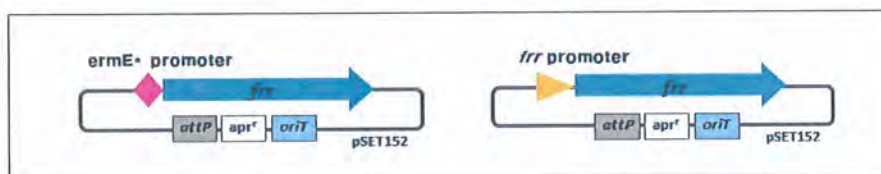


그림 65. SET152 기반 *frr* 유전자 발현 벡터

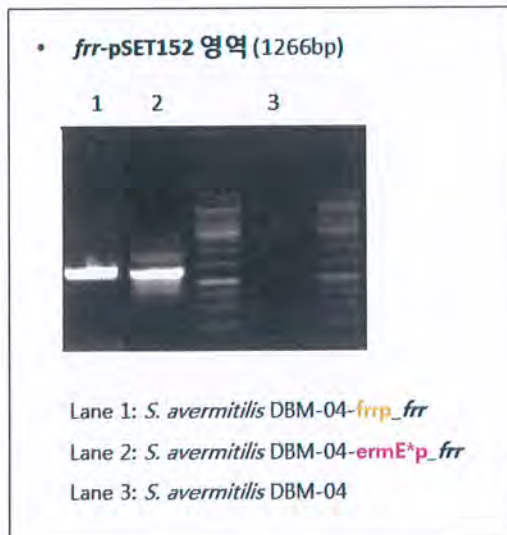


그림 66. PCR 분석을 통한 *frr* 도입 균주의 확인

생산을 증가시키고자 하였다. 논문에서 보고된 최적의 생산성 증가를 보인 균주 내 *hrdB* mutation site를 바탕으로 (그림 68), A137S, K139E, E163G, M356V, V357A, M389I의 mutation을 포함하는 1.5 kb의 *hrdB* mutation sequence DNA (*hrdB_mut1*)를 합성하고 이를 restriction enzyme 처리 및 PCR 과 일련의 클로닝 과정을 거쳐 추가적으로 D345H의 mutation을 포함하는 *hrdB_mut2* DNA 조각을 확보하였다. 각 조각들은 각각

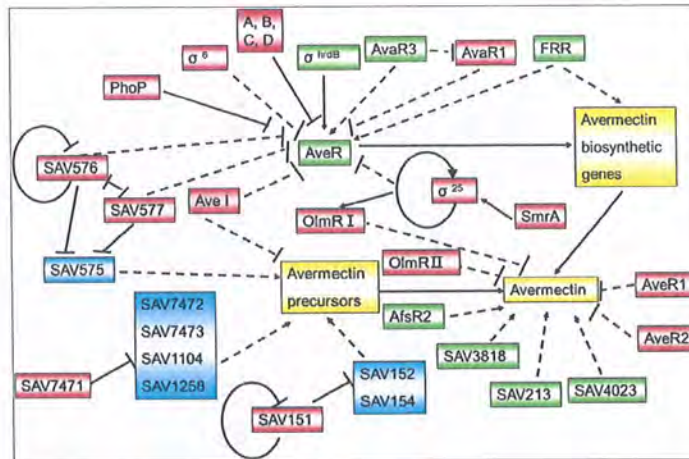


그림 67 Avermectin 생산성에 영향을 주는 조절유전자의 networking (Chen et al. 2016)

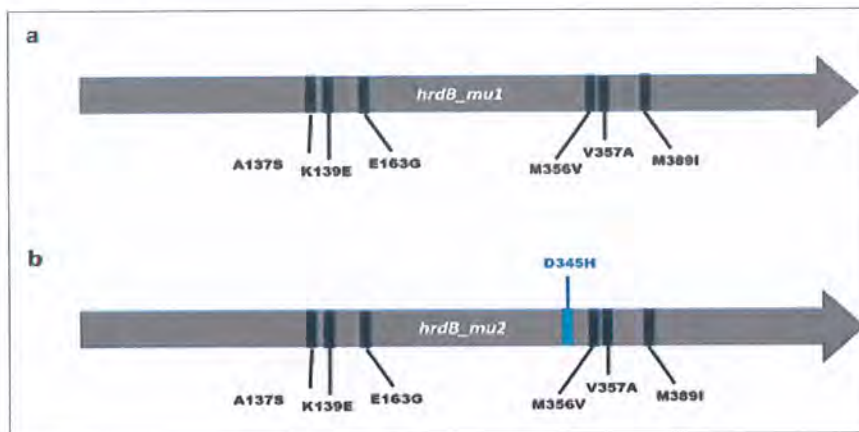


그림 68. *hrdB* mutation site

pSET152_ermE* promoter에 클로닝되어 DBM-04 균주에 도입되었고, PCR을 통해 해당 유전자의 존재여부가 확인되었다 (그림 69).

frr, σ^{hrdB} 포함 발현 벡터의 균주 내 도입을 위해, 본 과제에서 확립된 conjugation 방법을 사용하였고, 일련의 실험수행을 통해 얻은 클로니에 대해 PCR 및 PCR 결과물에 대한 sequencing을 수행하여 최종 pSET152 발현 벡터 삽입 균주를 확보하였다. *frr* 및 σ^{hrdB} 유전자의 DBM-04 내 도입 균주를 배양 및 추출·분석하여 대조균과의 생산량 비교 결과, 물질의 생산성이 향상되는 것을 확인하지 못하였다. 이는 기존 *attB* site integration을 통해서 해당 유전자가 최적으로 발현되지 않았거나, 숙주로 사용한 avermectin 고생산균주 내 해당 조절 유전자의 작용이 이미 원활하기 때문인 것으로 사료된다.

다. *sig6* 유전자의 제거

*sig6*는 extracytoplasmic sigma factor로서 야생형 *Str. avermitilis*에서 유전자 제거 시 avermectin 생산성이 2~2.6배 증가되는 것이 알려져 있으며, 발현이 강화될 때 avermectin 생산성이 감소되는 것이 알려져 있다 (Jiang et al., 2011). 이를 milbemycin 생산균주인



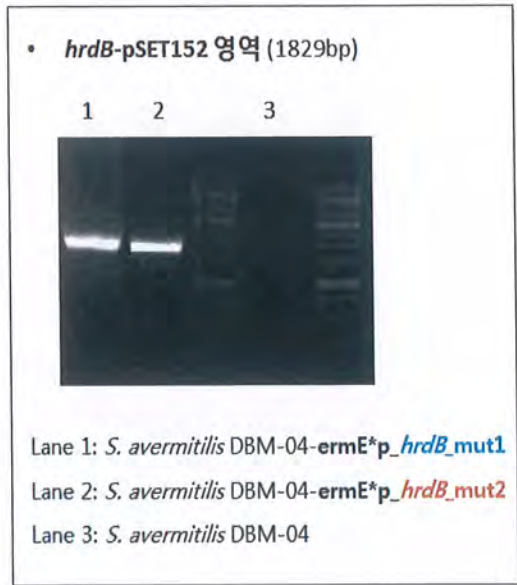


그림 69 PCR 분석을 통한 mutation_ *hrdB* 도입균주의 확인

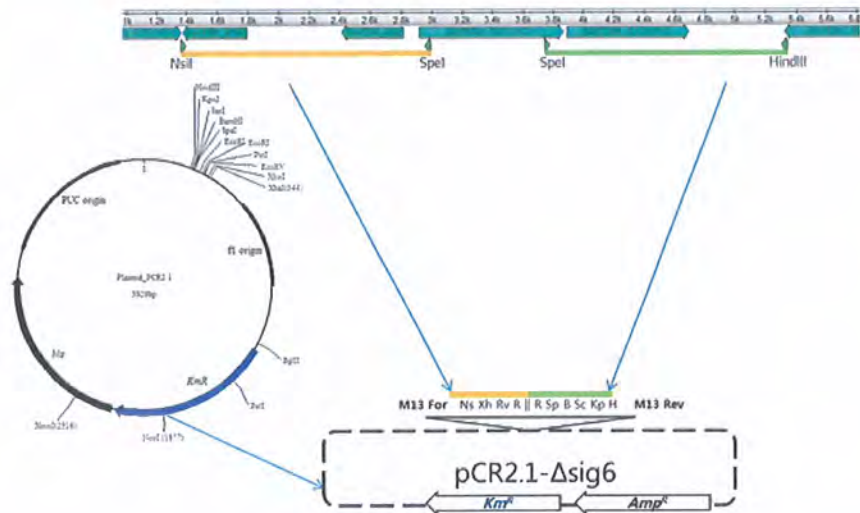


그림 70. sig6 유전자제거 vector

DBM-04에 적용하고자 sig6 유전자 제거백터를 그림과 같이 제작하였다 (그림 70). sig6 유전자 제거백터를 pKC1139 백터로 subcloning 후 DBM-04 균주에 도입하여 sig6 유전자가 제거된 균주를 확보하였다. DBM-04와 동일조건으로 flask 배양하여 생산성을 비교시 total milbemycin의 생산량이 1.8 배 증가함을 알 수 있었다.

라. 조절유전자 *avaR1* 제거

*avaR1*은 avenolide autoregulator receptor homologue로서 avermectin 고생산 균주에서 유전자 제거시 모균주 대비 avermectin B1a의 생산성이 1.75배 증가한 결과가 보고되었으며, avermectin 생합성 유전자군의 발현이 증가되지만 avermectin gene cluster specific

activator인 aveR과 다른 경로로 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Wang et al., 2014). 이를 milbemycin 생산균주인 DBM-04에 적용하고자 avaR1 유전자 제거백터를 그림과 같이 제작하였다 (그림 71).

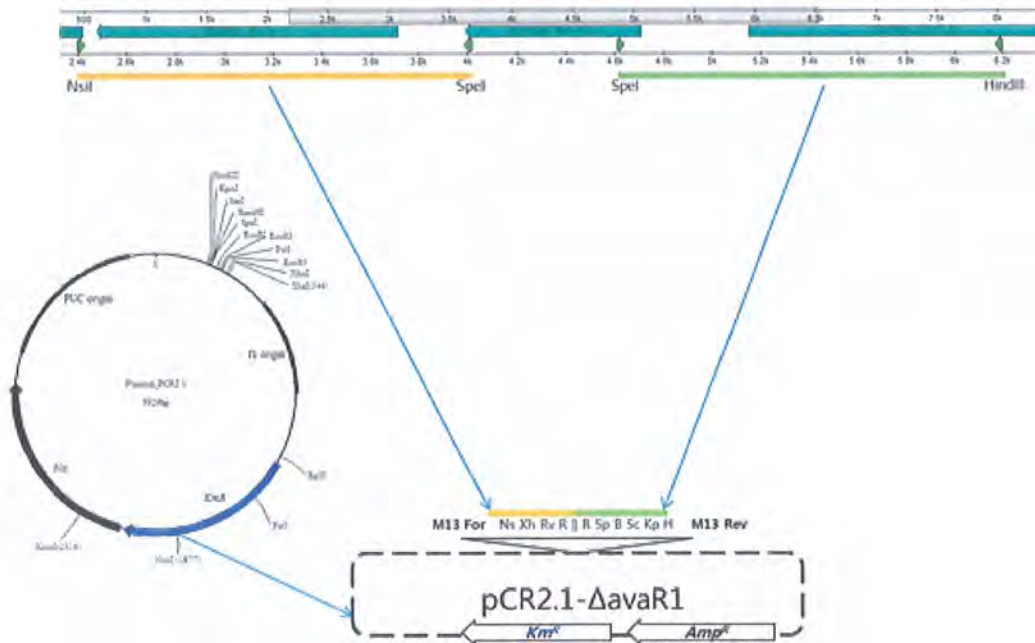


그림 71. avaR1 유전자 제거백터의 구성

avaR1 유전자 제거백터를 pKC1139 백터로 subcloning 후 DBM-04 균주에 도입하여 avaR1 유전자가 제거된 균주를 확보하였다. DBM-04와 동일조건으로 flask 배양하여 생산성을 비교시 total milbemycin의 생산량이 약 1.6배 증가함을 알 수 있었다.

마. Negative 조절 유전자 aveI의 삭제

Str. avermitilis 내에서 avermectin 생합성 유전자집단과는 약 3.8 Mb 떨어져 존재하는 0.76 kb의 TetR-family 조절유전자로 알려진 aveI 유전자는 avermectin 생합성에 있어 negative하게 작용하는 것으로 보고된 바 있다. 즉, aveI 삭제 mutant에서는 avermectin B1a의 생합성이 약 16 배 증가됨이 확인되었다 (Chen et al., 2008). 이에, 본 연구에서는, aveI 유전자의 삭제를 통한 milbemycin의 생산성 증가를 확인하고자 하였다. 상기 다른 유전자와 동일하게 aveI 유전자에 대한 제거백터를 구성한 후 DBM-04 균주에 대해 aveI 유전자를 삭제하여 milbemycin 생산성을 비교한 결과, 전체 생산량의 증가를 확인할 수 없었다.

4. 부산물 oligomycin 생합성 유전자집단 제거

Oligomycin은 milbemycin의 이중숙주로 사용되는 *Str. avermitilis* 내에서 malonyl-CoA 및 methylmalonyl-CoA를 전구체로 사용하여 생합성되는 독성의 macrocyclic lactone 물질이다. 이는 avermectin의 building block으로 사용되는 전구체와 일치하기에,

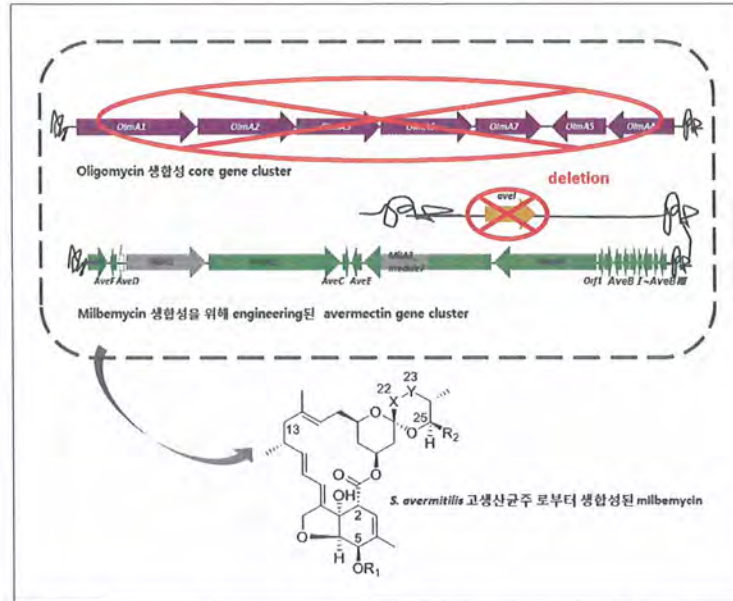


그림 72. aveI 및 oligomycin 생합성 유전자 집단 제거에 의한 milbemycin 균주 개량 모식도
Olm 104,326 bp

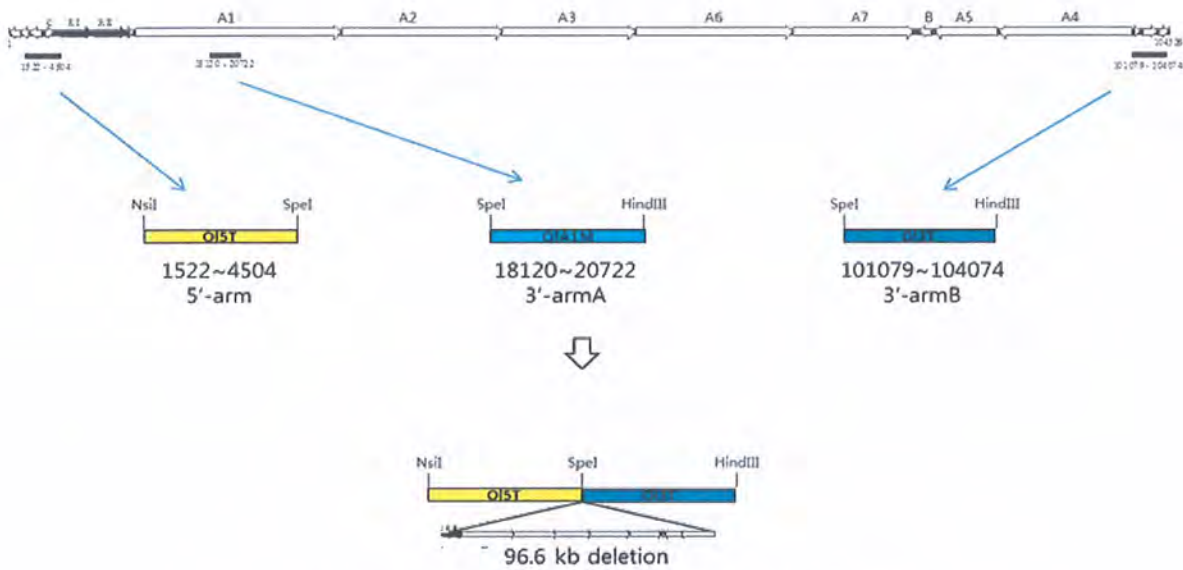


그림 73 Oligomycin 생합성 유전자 집단의 제거

oligomycin 및 avermectin 생합성 경로 간에 존재하는 경쟁으로 인하여 두 물질의 생산성은 반비례 할 것으로 판단되었다. 실제로, aveR의 deletion으로 인해 avermectin의 생합성이 저해된 경우 oligomycin의 생산성이 크게 증가되었음이 보고된 바 있다 (Wei et al. 2006). 이에, *Str. avermitilis* 내 oligomycin 생합성 유전자집단의 제거 시, avermectin 유전자 집단의 engineering을 통한 milbemycin의 생합성 경로에 충분한 전구체의 공급을 가능케 하여 milbemycin 생산성의 향상을 가져올 것으로 기대되는 할 수 있다.

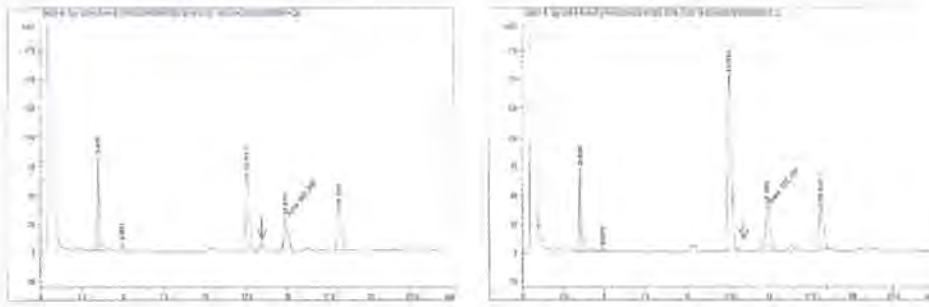


그림 74. oligomycin 생산 제거 확인

oligomycin 생합성 유전자 집단을 제거하기 위해 그림 73 과 같이 oligomycin 생합성 유전자 집단 양 말단을 증폭한 후 oligomycin 유전자집단 제거 벡터를 제작하고 pKC1139 shuttle vector로 cloning 하였다. 이를 개발한 DBM-04 milbemycin 생산균주에 도입 및 oligomycin 생성여부를 확인하였다. DBM-04 생산균주와 DBM-04에서 oligomycin 생합성 유전자 집단을 제거한 DBM-04-olm 을 주관기관에서 동일조건에서 배양하고 대사물의 HPLC pattern을 비교한 결과 oligomycin 생성시 확인되는 13분대 peak가 제거되는 것을 확인하였다 (그림 74). 따라서, 향후 추가적으로 개발되는 milbemycin 생산균주에 대해 개발벡터를 적용하여 oligomycin을 효과적으로 제거할 수 있음을 확인하였다.

5. Milbemycin 내 milbemycin A4 비율 강화

개발된 milbemycin 생산균주 DBM-04의 경우 milbemycin A3 와 A4의 비율이 7:3으로 generic 제품인 milbemectin과 차이가 있다 (A3:A4 = <30% : >70%). 따라서, 등록 및 시장 접근을 빠르게 하기 위해서는 milbemectin의 등록 기준 이상의 기준을 갖는 것이 필요하다. milbemycin A3와 A4의 차이는 macrolide lactone 합성과정의 첫 번째 시작물질이 A3는 acetyl-CoA, A4는 propionyl-CoA 임에 기인하며, 일반적으로 세포내에는 acetyl-CoA가 많기 때문에 propionyl-CoA의 세포내 농도를 증가시키거나 propionyl-CoA를 잘 이용할 수 있도록 milbemycin 합성효소를 개량하여야 한다.

가. PrpE 유전자 도입 균주의 제작

PrpE 유전자는, propionate 로부터 propionyl-CoA를 형성하는 CoA ligase/propionyl-CoA synthetase이다. Milbemycin A4의 비율이 70 % 이상인 타겟물질 milbemectin의 조성비를 감안하여 생산 milbemycin 중 A4의 비율을 높이려는 시도에 있는 바, 균주 내 propionyl-CoA의 농도를 증가시킴으로써 해당 CoA의 loading module로의 충분한 도입을 통한 milbemycin A4의 비율을 증가시킴과 동시에, 증가된 전구체 propionyl-CoA로부터의 averemctin PKS의 extender unit인 methylmalonyl-CoA의 합성을 통한 총체적 milbemycin의 고생산을 확인하고자 하였다.

PrpE의 propionyl-CoA synthetase로서의 역할이 언급된 보고를 기반으로 *Salmonella typhimurium* 유래의 1.9 kb 유전자를 확보하여 ermE* promoter 포함 pSET152로 클로닝 하였다 (Horswill et al., 1999). 완성 벡터의 DBM-04로의 도입은 PCR 분석을 통해 확인되

었다 (그림 75).

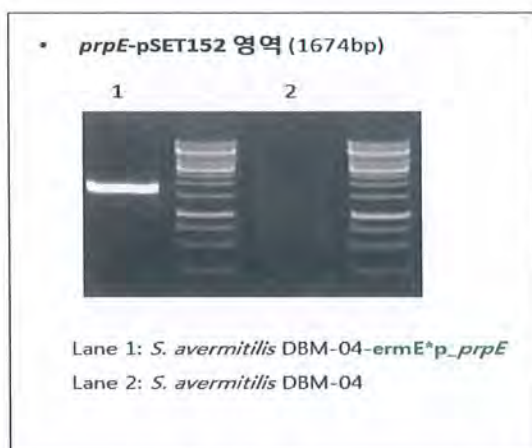


그림 75. PCR 분석을 통한 prpE 도입균주의 확인

PrpE 발현 벡터의 균주 내 도입을 위해, 본 과제에서 확립된 conjugation 방법을 사용하였고, 일련의 실험수행을 통해 얻은 콜로니에 대해 PCR 및 PCR 결과물에 대한 sequencing을 수행하여 최종 pSET152 발현 벡터 삽입 균주를 확보하였음. 상기 균주에 대해 주관기관에서 배양하여 A4 생산 비율의 증가를 확인하였을 때, milA3가 도입된 6-4-6 균주 및 DBM-04 균주 양쪽에서 A4 (ethyl type)의 milbemycin 생산비율의 증가를 관찰할 수 없었다. 이는 PrpE의 발현이 기대와 다르게 낮거나 propionyl-CoA의 축적이 A4를 증가시킬 수 있을 정도로 크지 않은 것으로 예상된다.

나. Loading module 기질 특이성 변화 균주 개발

Milbemycin A3, A4 및 D등은 PKS의 loading module이 어떤 기질을 받아들여느냐에 의해 결정된다. 즉, loading module이 받아들이는 전구물질이 acetyl-CoA이면 milbemycin A3, propyl-CoA이면 milbemycin A4, isobutyryl-CoA이면 milbemycin D가 생성된다. Loading module의 기질특이성은 즉 loading module의 acyltransferase의 기질특이성에 기반한다. 따라서, milA1의 loading module의 acyltransferase의 기질특이성을 propyl-CoA를 선호하도록 개량하여 milbemycin 생합성 유전자집단으로 재도입함으로써 milbemycin A4의 생산을 증가시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

Wang 등은 avermectin 생합성 PKS loading module의 구조를 보고한 바 있다 (Wang et al., 2015). 따라서, 단백질 아미노산 서열로 51% 정도의 상동성을 가진 milA1의 loading module의 구조를 추측할 수 있을 것으로 사료되며, avermectin PKS loading module의 active site와 추정된 milA1의 active site를 비교하여 기질특이성에 중요한 역할을 하는 아미노산을 선별하고 이를 avermectin PKS loading module에 가깝도록 변형하여 milA1의 active site가 보다 큰 기질을 받아들일 수 있도록 개량하고자 하였다.

(1). Milbemycin 생산균주의 loading module 기질 특이성 변화



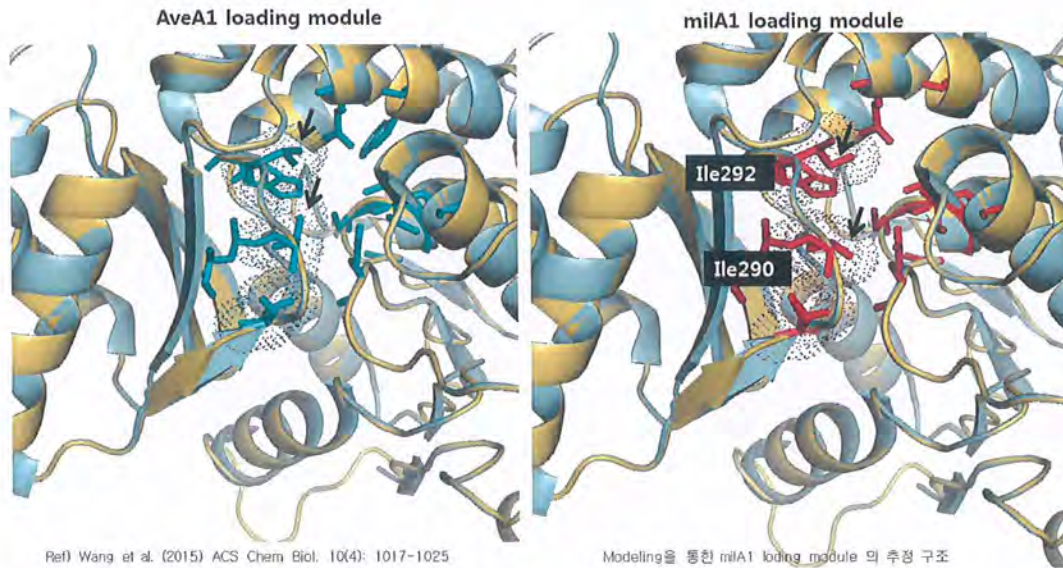


그림 76. AveA1 loading module과 milA1 loading module 구조 비교

그림 76에서 알 수 있듯이 milbemycin 생합성 PKS의 loading module의 기질결합 부위와 avermectin 생합성 loading module의 기질결합 부위 중 특징적으로 차이가 나는 곳은 milA1의 290번째 아미노산인 isoleucine 과 292번째 아미노산인 isoleucine이 avermectin 생합성 loading module에서는 valine인 것이다. 따라서, DBM-04의 loading module의 290번째 아미노산인 isoleucine을 aveA1 유전자의 loading module 형태인 valine으로 치환하고, 292번째 위치의 아미노산을 각각 valine, leucine, isoleucine, methionine이 되도록 design 하여 loading module 에 돌연변이를 도입하였다 (그림 77).

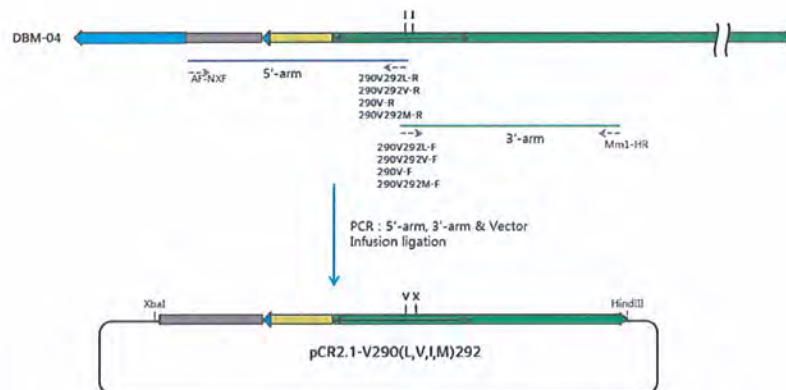


그림 77 loading module 기질변화

각 돌연변이에 대해 DBM-04와 동일한 조건으로 배양시 다음과 같이 milbemycin A4의 비율이 A3에 대해 상대적으로 증가하지만, milbemycin D의 비율이 크게 증가함을 알 수 있다. 또한, 가장 큰 아미노산으로 치환된 I290V-I292M의 경우 milbemycin 생산이 되지 않고 반면 oligomycin peak만을 확인할 수 있다 (그림 78). 따라서, 본 연구에서의 loading module의 변이 위치는 기질 특이성을 변화시키지만 milbemycin A4 특이 기질인 propionyl-CoA에 비해 milbemycin D의 특이 기질인 isopropyl-CoA를 더 선호하는 방향으

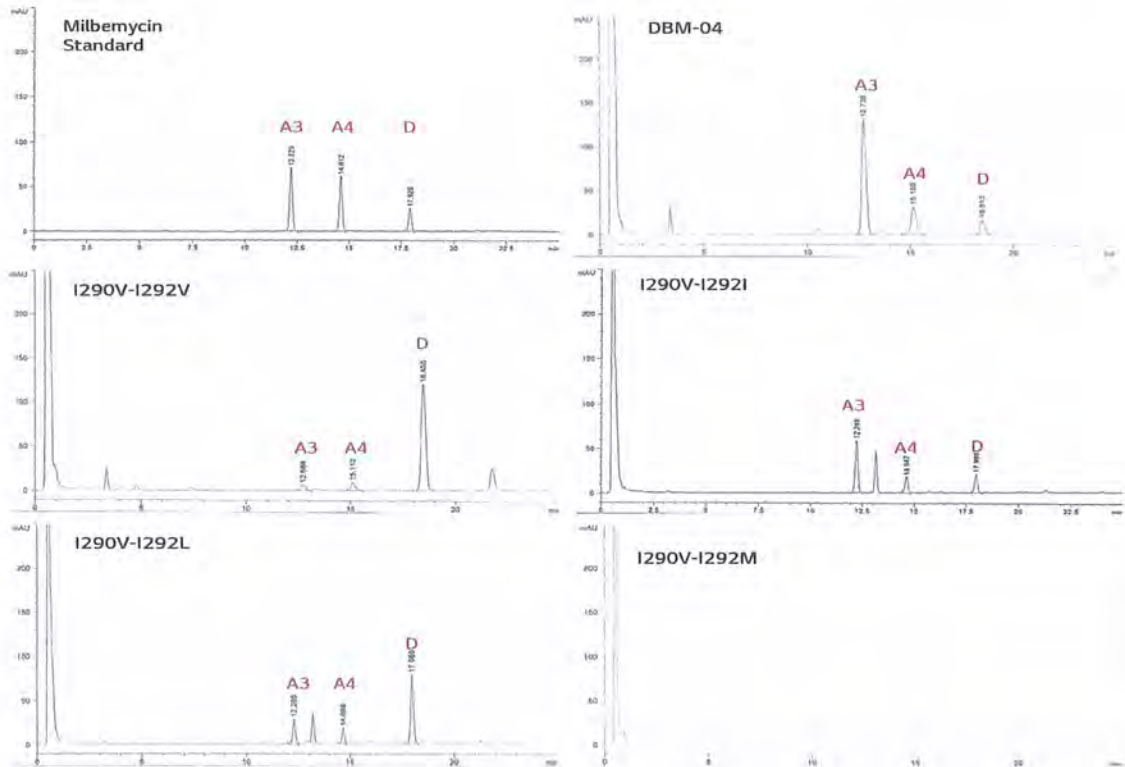


그림 78 loading module 돌연변이 도입균주의 대사물질 변화

로 변화했음을 알 수 있었다.

Loading module의 기질특이성 변화를 통해 milbemycin A3를 주로 생산하는 DBM-04 균주를 milbemycin D를 효과적으로 생산하는 균주로 전환할 수 있었다. 각각의 돌연변이 균주중 milbemycin D를 증가시키는 데 효과적인 돌연변이 균주들의 경우 milbemycin D를 생산하는 균주로서 한국생명공학원에 특허기탁균주로서 기탁하였다. 각각 DBM-04 균주는 KCTC13324BP로서 기탁하였으며 (균주명: *Str. avermitilis* LB50002, 기탁일 2017.09.01), DBM-04 I290V-I292L 돌연변이 균주는 KCTC13325BP로서 기탁하였고 (균주명: *Str. avermitilis* LB50005, 기탁일 2017.09.01), DBM-04 I290V-I290V 균주는 KCTC13326BP (균주명: *Str. avermitilis* LB50006, 기탁일 2017.09.01)로 기탁하였다. 연구성과는 “밀베마이신 D를 생산하는 재조합 미생물 및 밀베마이신 D 생산방법” 으로 특허출원하였다 (출원번호: 10-2017-0119833, 출원일 2017.09.18)

(2). Loading module 치환균주 개발

Erythromycin의 어글라이콘인 6-deoxyerythronolide B의 synthase 인 DEBS loading module AT는 타 PKS의 loading AT와는 달리 propionyl-CoA에 대해 높은 기질특이성을 지니는 것이 보고된 바 있다. 따라서, milbemycin 생산균주내의 loading module-module 1-module 2로 구성된 milA1 유전자의 loading module을 eryA1 유전자의 loading module로 치환하여 eryA1의 loading module의 기질특이성을 이용 milbemycin A4의 생산량을 증가시키고자 하였다. eryA1 유전자의 module 구성은 loading module-module1-module2로 milA1

의 것과 일치하며, 두 경우 모두에서 loading module은 AT 및 ACP의 didomain으로 이루어져 있는 것을 확인하였다 (그림 75).

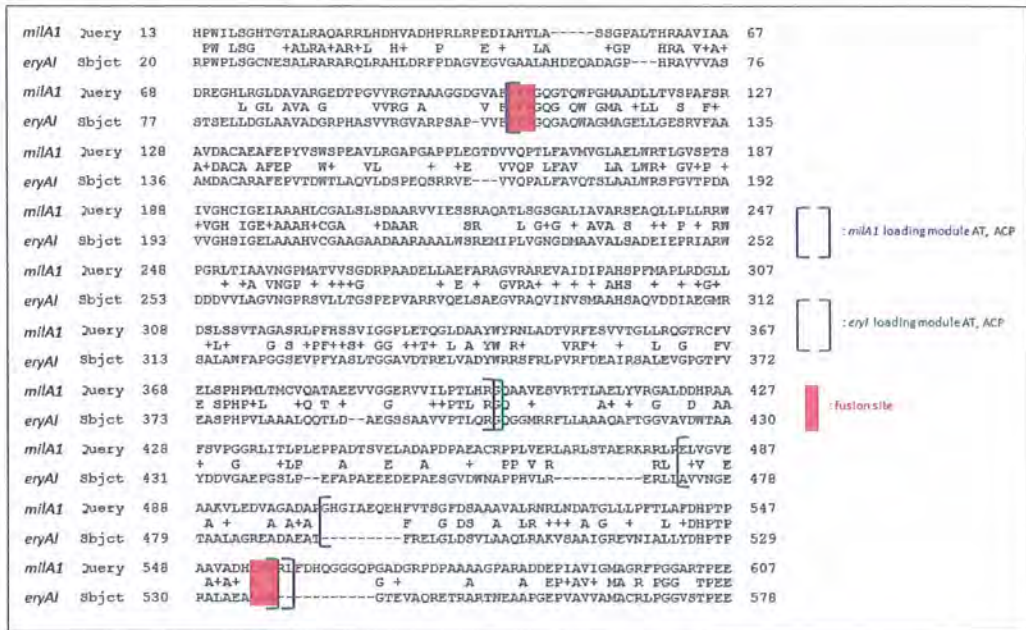


그림 79. Fusion site 결정을 위한 sequence alignment

EryAI loading module의 직접치환을 위한 벡터로 pKC1139를 선별하였고, plasmid mediated-homologous recombination을 위해 *milA1*과 *eryAI*의 amino acid 서열 alignment를 통해 결정한 fusion site를 바탕으로, *milA1*의 upstream 및 downstream 각 1.6 kb, 1.5 kb의 영역을 *Str. avermitilis* DBM-01의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR 하였다. 각 fragment는 pGEMTeasy에 클로닝되어 그 염기서열이 확인되었다.

한편, erythromycin PKS의 약 1.3 kb loading module 영역은 *Saccharopolyspora erythraea*의 genomic DNA로부터 PCR되어 벡터 클로닝 및 DNA sequencing을 통해 염기서열이 확인되었다 [*Sac. erythraea* NRRL2338 complete genome GenBank: AM420293.1]. 이 때, 해당 fragment는 *milA1*의 upstream 및 downstream과 homologous한 영역을 지니도록 PCR 되었다. 따라서, *milA1*의 upstream, downstream 영역 및 *eryAI* loading module의 seamless ligation을 위해 upstream 영역과 *eryAI* loading module 및 *eryAI* loading module과 downstream 영역을 각각 연결하기 위한 overlap extension PCR을 수행하였다. 확보된 fragments는 염기서열이 확인된 후, 각각 *EcoRI*/*AgeI* 및 *AgeI*/*HindIII*를 사용하여 restriction enzyme digestion 되었고 그 결과물은 pKC1139에 동시에 ligation 되었다. 제작된 *eryAI* loading module 치환벡터를 pEryLMAT-ACP이라 명명하였다 (그림 80).

제작된 해당 벡터는 확립한 conjugation 방법을 사용하여 mibemycin 생산균주인 *Str. avermitilis* DBM-04 로 내로 도입되어 *milA1*의 loading module을 *eryAI* loading module로 치환하였다. 해당 균주를 배양한 결과, C25-ethyl 형태의 milbemycin, 즉, milbemycin A4만이 생성되었으나 1.82 mg/L로 매우 낮은 농도를 확인하였다. 따라서, *eryAI*의 loading module을 활용해 milbemycin A4만을 생산하기 위해서는 추가의 연구개발이 필요할 것으로 사료된다.

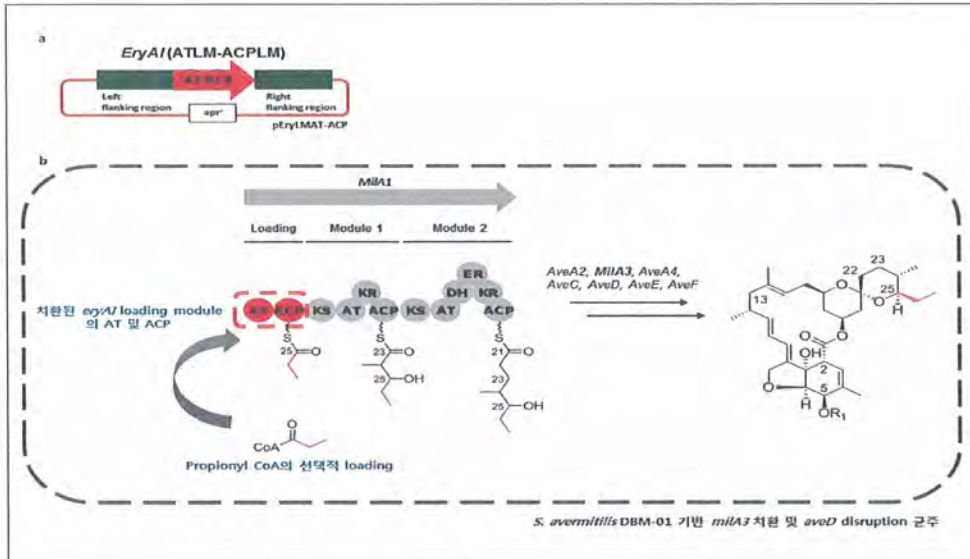


그림 80 eryAI loading module 치환 벡터 (a) 및 erythromycin loading module 치환에 따른 C25-ethyl 형태 milbemycin의 생성 모식도 (b)

다. 생합성 전구물질 강화 유전자 도입 및 발현조절 유전자 평가

기존 방선균의 이차대산물 생산성을 증가시키는 것으로 알려진 여러 전구물질 강화 유전자 및 *Str. avermitilis* 생산균주에서 avermectin 생산과 관련된 것으로 알려진 12개의 유전자를 평가하였다 (표 25)

표 25. Milbemycin 생산성 증가를 위한 유효 유전자 발굴

적용목적	유전자	역할	도입/제거	기대효과	Milbemycin 생산성 증가 ¹
5-methoxy 형태 milbemycin 제거	<i>aveD</i>	Methyltransferase	제거	부산물 제거	A3, A4 생산
생합성 전구물질 강화	<i>acc1</i> , <i>acc2</i>	Acetyl-CoA carboxylase	도입	세포내 malonyl-CoA 농도 증가	-
	<i>pcc</i>	Propionyl-CoA carboxylase	도입	세포내 methylmalonyl-CoA 농도증가	-
	<i>pan</i>	Pantothenic kinase	도입	조효소 CoA pool 증가	-
	<i>prpE</i>	Propionyl-CoA synthetase	도입	Milbemycin A4 특이적 propionyl-CoA 증가	-
Pathway specific regulator	<i>aveR</i>	Avermectin gene cluster expression	도입	<i>Str. avermitilis</i> 내 milbemycin 생합성 유전자 발현증가	1.3배
Global regulator	<i>frr</i>	Ribosome recycling factor	도입	Avermectin 생합성 유전자 과발현 및 세포성장 증가	-
	<i>hrdB</i>	<i>aveR</i> 발현조절	도입	<i>aveR</i> 발현증가	-
	<i>sig6</i>	Extracytoplasmic sigma factor	제거	avermectin 생산성 증가	1.8배
	<i>avaR1</i>	Avenolide autoregulator homologue	제거	avermectin 생산성 증가	1.6배
	<i>aveI</i>	Avermectin biosynthesis down regulator	제거	Avermectin 생산성 증가	
경쟁 대사물질 제거	<i>olm</i> gene cluster	Oligomycin 생합성	제거	Oligomycin 생성억제	oligomycin 생성억제

4. 통합균주 개발

가. 통합균주 개발

선행 연구결과에서 DBM-04 균주 생산성 향상에 기여한 타겟 유전자인 *sig6*, *avaR1* 제거를 무작위 돌연변이로부터 확보한 생산성 향상균주인 7-10에 순차적으로 적용하였다.

(1) 7-10 균주의 *sig6* 유전자 제거

DBM-04 균주에서 제거 하였을 때, total milbemycin의 생산량이 1.8배 증가한 *sig6* 유전자를 7-10 균주에서 제거하였다. PCR을 통해 *sig6* 유전자가 제거된 균주를 선발하고 이 중 총 10개의 균주에 대하여 milbemycin 생산배양을 수행하였다. 배양 결과 최대 1.6배 생산성 향상 효과가 있는 균주를 확인하고 선발하였다 (그림 81). 선발균주에 대해 반복배양을 통해 생산성을 확인하여 최종적으로 DBM-04 대비 milbemycin A3+A4가 약 2배, total milbemycin이 2.3배 증가하였으며, 모균주인 7-10 대비 milbemycin A3+A4가 1.5배 증가하였으며, total milbemycin은 1.8배 증가하였다.

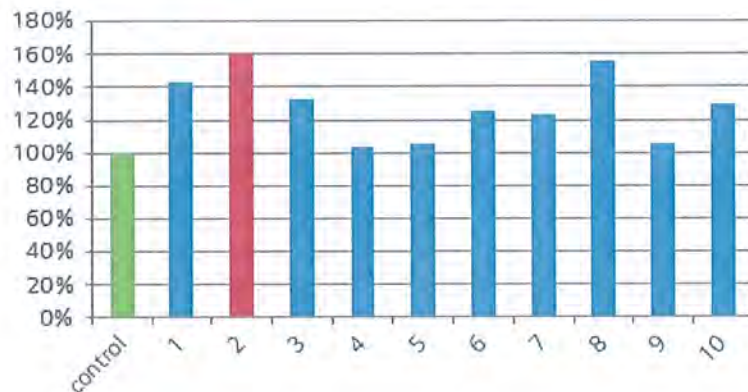


그림 81. 7-10 Δ sig6 균주 선발

(2) *sig6*, *avaR1* 제거 이중돌연변이

상기와 같이 확보한 7-10 Δ sig6 균주에 DBM-04 균주에서 1.6배 생산성 증가 효과가 있는 *avaR1* 유전자를 제거하여 7-10 균주의 이중돌연변이 균주를 제작하였다. 총 10개의 균주를 확보하여 최대 1.5배 생산성 증가 효과가 있는 균주를 확보 하였다 (그림 82). 이중돌연변이 균주의 경우 대부분 생산성이 저하 되는 경향이 있었다. 반면, 생성된 돌연변이 균주 중 활성이 높은 하나의 우수한 균주가 선별 된 것으로 판단된다. 해당 균주에 대해 해당 균주를 최종 통합 균주로 선정 하였다.

선발균주에 대해 추가의 개선배지 적용 flask 시험을 통해 DBM-04 대비 milbemycin A3+A4의 생산성이 3배 증가 total 생산성이 3.3배 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 모균주인 7-10 Δ sig6에 대비하여서는 milbemycin A3 +A4와 total milbemycin 모두 1.5배 가량 증가한 것을 알 수 있었다.



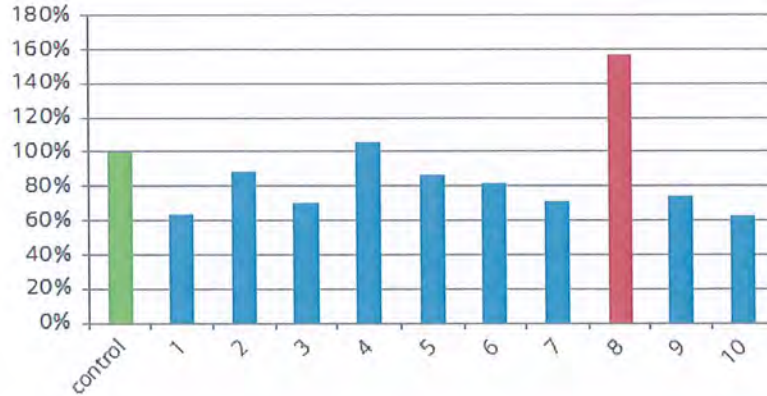


그림 82. 7-10Δsig6ΔavaR1 균주 생산성비교 및 선발

나. 개발 균주의 생산성 향상비교

각 균주 개발 단계별 생산성 향상 경향을 flask 배양 결과를 통해 비교하였다 (그림 83). 그 결과 DBM-04에서 생산성 향상에 효과가 있었던 타겟유전자를 무작위 돌연변이를 통해 개발한 개발균주에 추가적으로 도입함으로써 생산성 향상을 빠르게 진행할 수 있었다.

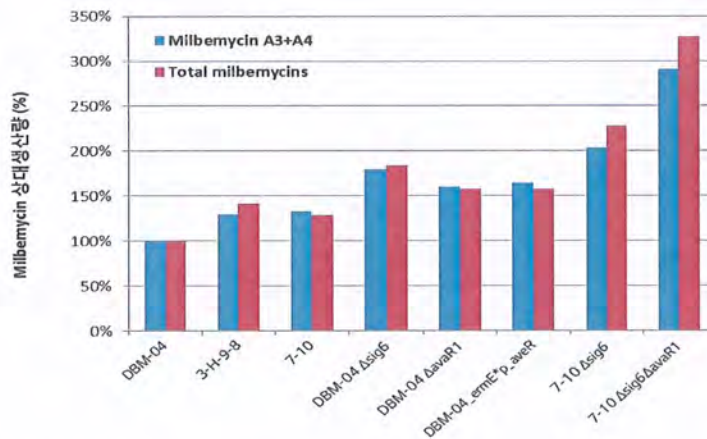


그림 83 . Milbemycin 생산균주의 개량

다. 통합 균주의 발효 성적 평가

상기와 같이 확보 된 통합균주의 성적을 5L jar 배양을 통해 평가를 진행하였다. 5L 발효 조건은 발효 조건 최적화 과정에서 확보된 조건을 통합균주에 적용하였고, 통합균주의 최종 발효 농도는 전체 균체를 회수한 후, ethanol로 2회 추출하여 확인하였다 (그림 84).

그 결과, 통합균주의 milbemycin 생산량은 5L 발효조건에서 Total milbemycin을 기준으로 1.5g/L로 측정되었다. milbemycin A3+A4의 농도는 1.4g/L이었다.

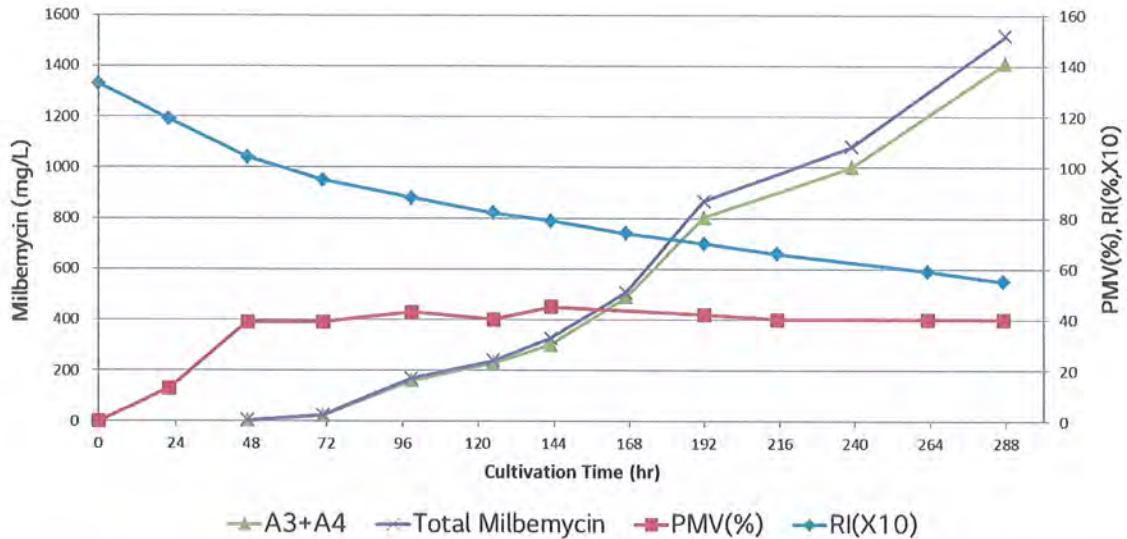


그림 84. 통합균주의 5L 배양 패턴. PMV는 packed mycelia volume (%), RI는 refractive index (%) 임

제 4 절 배지 및 배양조건의 최적화

선행 연구활동을 통해 국내 연구진으로부터 입수한 avermectin 고생산 균주를 활용해 기초배양조건을 확립하고 이를 배지 및 배양조건의 최적화에 적용하고자 하였다 기초적인 물리 이화학적 배양조건은 기존 문헌을 참조하여 설정하였다.

1. Avermectin 생산균주의 배지/배양조건 탐색

가. 기초 생산배지 선정

생산배지 및 종균배지를 문헌을 통해 선정하고 확보한 avermectin 고생산균주에 적용하였다. 생산배지의 경우 표 25와 같이 선정하여 *Str. avermitilis* 야생형 균주 및 확보한 avermitilis 고생산 균주에 적용하였다.

표 26 avermectin 생산균주의 생산배지

생산배지	생산배지 조성 (g/L)	균주	avermectin B1a+B1b (mg/L)
1	glucose 45, Yeast extract 4, Soybean meal 14, Soybean oil 5, NaCl 0.1,	고 생산균주	2
		야생형	4
2	Soluble starch 80, Pharmamedia 5, K ₂ HPO ₄ 1, CaCO ₃ 7, MgSO ₄ •7H ₂ O 1, Glutamic acid 0.6, Trace element solution 0.2,	고 생산균주	2
		야생형	9
3	Soluble starch 80, Soybean meal 10, Skim milk 15, K ₂ HPO ₄ 0.5,	고 생산균주	304
		야생형	21
4	Corn starch 140, Alpha-amylase 0.1, Soybean flour 28, Yeast Extract 10, Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O 0.022, MnSO ₄ •7H ₂ O 0.0023, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.25, CoCl ₂ 0.02, CaCO ₃ 0.8,	고 생산균주	22
		야생형	38

표 26 에서 알 수 있듯이 생산배지 3 의 경우만의 avermectin의 생산이 있어 생산배지 3을 기본 생산 배지로 사용하였다.

방선균의 경우 shear stress 및 산소전달에 따라 생산량의 차이가 크게 날 수 있으므로 배양 용기의 차이를 확인하기 위해 Elenmyer flask 와 Baffled flask간의 배양차이를 확인하였다. 3번 생산배지 와 4번 생산배지를 이용, 28도 230 rpm에서 배양을 수행하여 avermectin 의 생산량을 비교한 결과 avermectin B1a + B1b의 생산량은 AM-3 배지 조건을 이용하여 non-baffled flask에서 배양한 경우 가장 높았으며, 다른 경우에 있어서 생산량이 미미하였다 (표 27).

표 27 용기별 생산성 비교

생산배지 (25mL)	용기	avermectin B1a+B1b (mg/L)
3	Baffled	11.9
	Non-baffled	755.3
4	Baffled	14.3
	Non-baffled	1.5

상기 실험 결과에 따라, 숙주균주의 표준 배양방법을 다음과 같이 정하였다.

* 배지 (g/L)

종균배지: soluble starch 30, yeast extract 15, Corn steep powder 5, KH₂PO₄ 0.4; pH7.2

생산배지: Soluble starch 80, Soybean meal 10, Skim milk 15, KH₂PO₄ 0.5; pH 7.2

* 멸균조건: 121 도 15분간 고압멸균

* 배양조건

배지량 : 25mL broth, 250mL non-baffled flask

배양조건: 28도, 230 rpm; 10 일간 배양

나. 탄소원 및 질소원영향 평가

(1) 탄소원 평가

Solube starch의 경우 고가로 대량발효의 탄소원으로 부적합 할 수 있다. 일반적으로는 Corn starch와 같은 전분류를 효소를 이용하여 가수분해하여 사용하는 경우가 대부분이다. 따라서, 전분류 가수분해물의 탄소원 이용 가능성을 탐색하기 위해 Dextrin과 Maltodextrin, glucose를 이용하여 전분가수분해물을 모방하고 생산성의 차이를 확인하기 위해 flask 배양을 수행하였다. 각각의 탄소원의 조성비율을 표 28과 같으며 그 외 다른 성분의 조건은 표준 조건과 동일하였다.

표 28. 탄소원 조성

배지성분	탄소원 농도 (g/L)				
	1	2	3	4	5
Dextrin, type I	40	20	10	0	0
Maltodextrin	40	45	35	30	0
glucose	0	16.3	38.1	54.5	87.1

flask 배양을 통해 탄소원 조성 별 생산패턴을 확인하여 비교하였다 (그림 85). 결과에서 알 수 있듯이 Maltodextrin 과 glucose가 45~62% 정도에 오도록 전분을 가수분해 하였을 때 avermectin의 생산성이 높은 것을 알 수 있었다. 이를 통해 향후 Corn starch 가수분해물을 기본 탄소원으로 할 수 있음을 알 수 있었다. 초기 실험 조건에서는 시험 상 관리할 수 있는 soluble strach를 사용하기로 하였다.

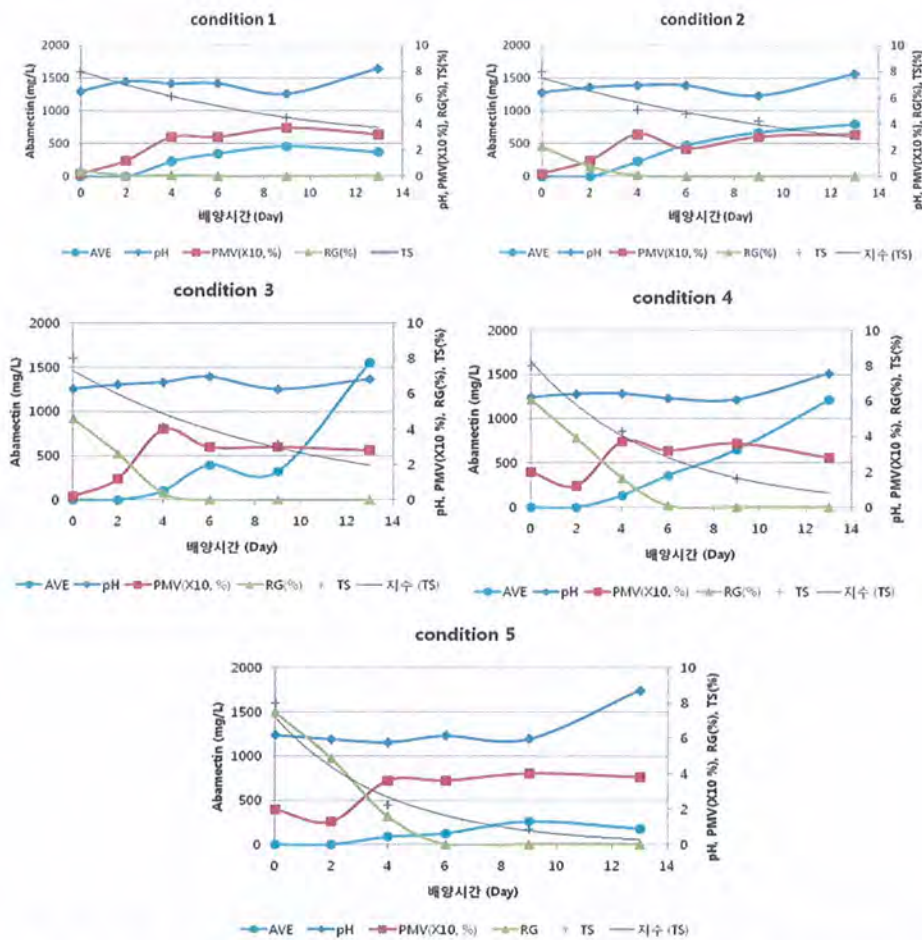


그림 85 탄소원 혼합에 따른 avermectin 생산성 변화
 avermctin: avermectin B1a+B1b (mg/L), PMV: Packed Mycelium Volume (%), RG: free glucose (%), TS: Total sugar (%)

(2) Ammonium sulfate

무기질소원인 ammonium sulfate를 첨가하여 균체 성장에서 이용할 수 있는 ammonia의 양을 늘리고자 하였다. 첨가된 ammonium sulfate의 양에 따른 생산성 변화를 확인하기 위

해 표준배지에 ammonium sulfate를 농도별로 첨가한 후 물질의 생산성을 비교하였다 (그림 86). 그 결과 ammonium sulfate 첨가시 avermectin 생산성 감소가 확인되었다.

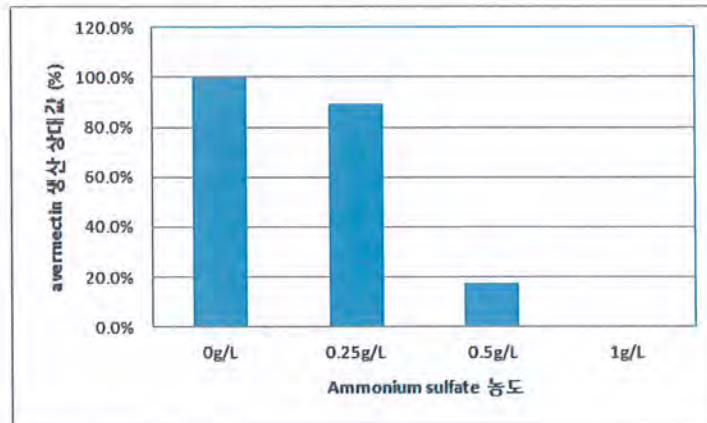


그림 86 Ammonium sulfate 영향평가

(3) 질소원 대체

기존 문헌상의 아바멕틴 생산균주인 *Str. avermitilis*의 생산배지를 분석한 결과 대부분의 생산배지에서 soybean meal을 주요 질소원으로 사용하고 있는 반면에, skim milk를 사용하고 있는 사례를 찾을 수 없었다. 따라서, skim milk를 대체할 수 있는 복합 질소원을 탐색하였다. 질소원 중 soybean meal의 농도를 고정하고 casein, pharmamedia, dry yeast, yeast extract, corn steep liquor를 기본배지의 Skim milk와 같은 농도 (15g/L)로 대체하여 첨가하였다. 그 결과 skim milk를 사용한 경우를 제외한 다른 경우 avermectin 합성을 확인할 수 없었다.

다. 첨가물 영향평가

(1) Phosphate 영향 평가

방선균의 물질 생산성을 결정하는 인자 중 하나는 phosphate다. phosphate는 균체의 생장에 필수적이지만 phosphate가 과량 첨가되는 경우 균주의 종류에 따라 2차 대사물질 생성이 저해될 수 있다. 따라서, 확보한 avermectin 고생산 균주의 phosphate 영향을 평가 하였다. 배지에 첨가되는 potassium dihydrogen phosphate의 농도에 의한 생산성의 변화를 확인하기 위해 첨가되는 농도를 달리하여 생산배양을 진행하였다. 그 결과 현 수준인 potassium dihydrogen phosphate 0.5g/L에서 생산성이 가장 좋음을 알 수 있었다 (그림 87).

(2) Yeast extract 영향

Yeast extract는 발효시 질소원 및 vitamin의 공급원으로서 널리 이용되고 있다. 15g/L 수준의 Yeast를 첨가한 경우 avermectin의 생산이 저해되었음을 관찰하였으나, 현 생산배지에 별도의 vitamine이 첨가되지 않기 때문에 이를 보완하고자 yeast extract 첨가에 따른 생산성의 영향을 결정하고자 하였다. 그 결과 배양 기간에 상관없이 yeast extract의 첨가가 생



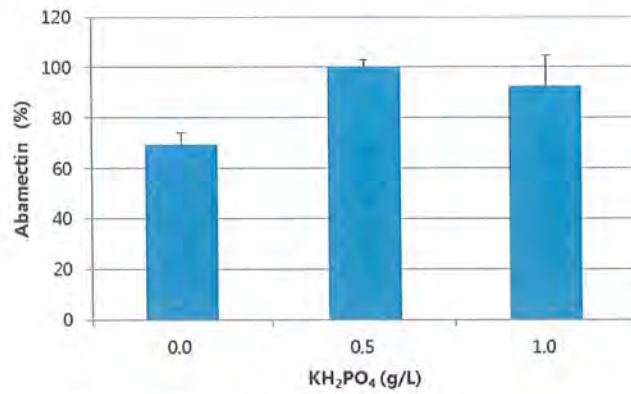


그림 88. Phosphate 영향 평가

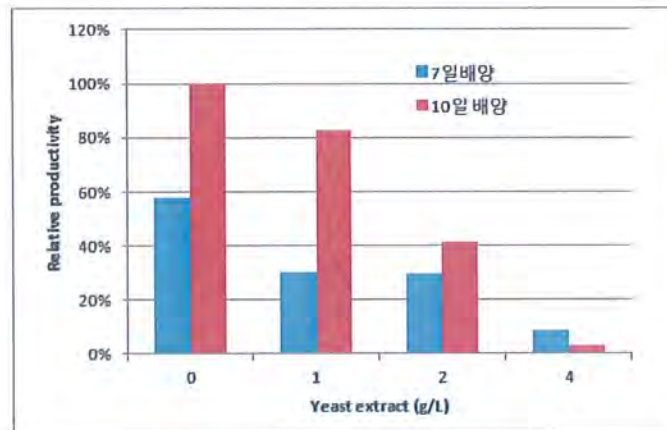


그림 87. Yeast extract 첨가 영향 평가

상성에 좋지 못한 영향을 주고 있는 것으로 판단되었다 (그림 88).

(3) Flask 생산성 결정

숙주균주의 avermectin 생산성을 결정하기 위해 상기 정하여진 표준 생산배양조건을 활용하여 Flask로 3반복하여 배양하였다 (그림 89). 배양 패턴에서 알 수 있듯이 pH의 경우 배양초기 특징적으로 pH 감소가 일어난 후, pH 6.5까지 pH가 상승하였다. 성장은 72시간 내외에 종결되며 이후 물질의 생산이 시작되는 것으로 보인다. 물질의 생산은 배양 후반까지 거의 일정한 속도로 진행이 됨을 확인하였다. pH의 경우 배양 후반에 감소하는 것으로 분석되었다.

avermectin B1a 와 avermectin B1b를 표준품으로 하여 물질의 생산성을 분석한 결과, avermectin B1a와 avermectin B1b의 농도는 최대 1,313 mg/L 였으며, 숙주균주가 생산하는 다른 유도체의 경우 avermectin A1a, A1b, A2a, A2b, B2a, B2b의 농도는 각각 210.5mg/L, 246.6mg/L, 511.2mg/L, 165.4mg/L, 481mg/L, 75mg/L로 추정되었다. 따라서, flask 발효시 숙주균주의 전체 avermectin 생산량은 3.0 g/L 로 측정되었다 (그림 89,90).

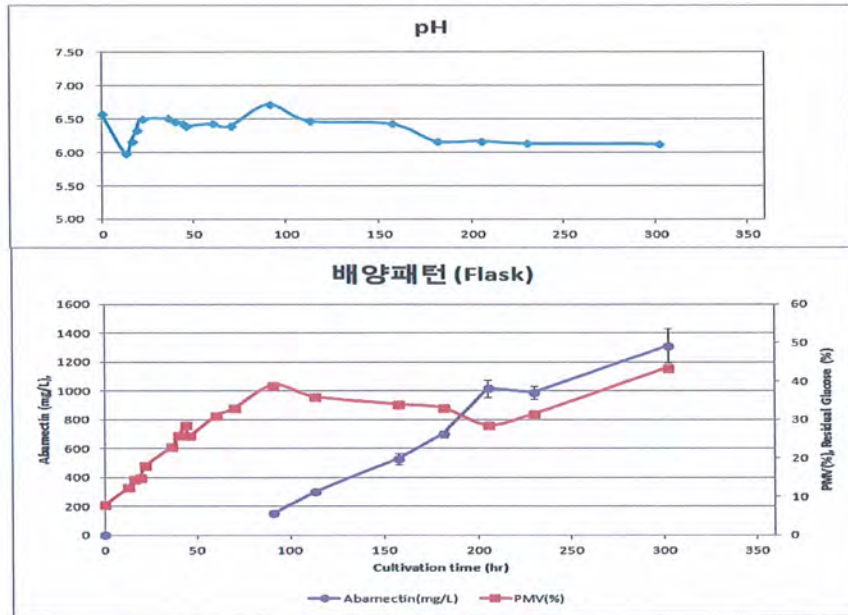


그림 89 avermectin 고생산 균주의 Flask 배양 패턴 변화; Abamectin: avermectin B1a + avermectin B1b., PMV: Packed Mycelium Volume (%)

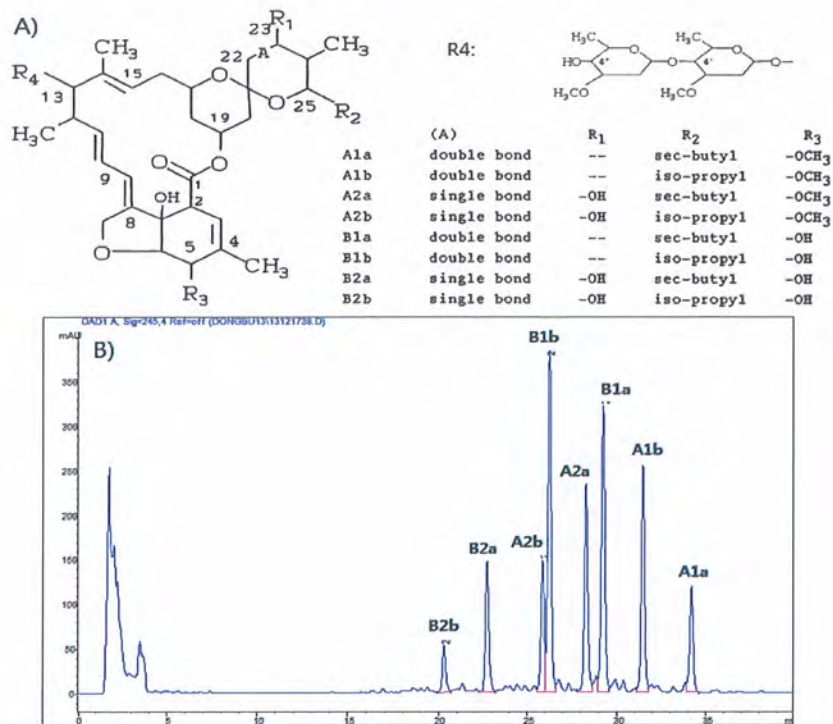


그림 90 숙주균주인 *Str. avermitilis* A-SA의 대사물질 생산. A) avermectin의 구조 B) 숙주균주 배양액의 HPLC Chromatogram

3. 개발균주의 발효조건 최적화 전략

Milbemycin 생산균주의 개발 이전까지는 *Str. avermitilis* DBM-01을 이용한 배지 최적화를 진행하였다. 또한, 중간 균주인 *Str. avermitilis* DBM-01을 이용한 1차 최적배지는 *Str. avermitilis* DBM-04에 적용하여 생산성을 확인하였으며, *Str. avermitilis* DBM-04에 대한 배지최적화를 진행하였음 (그림 91).

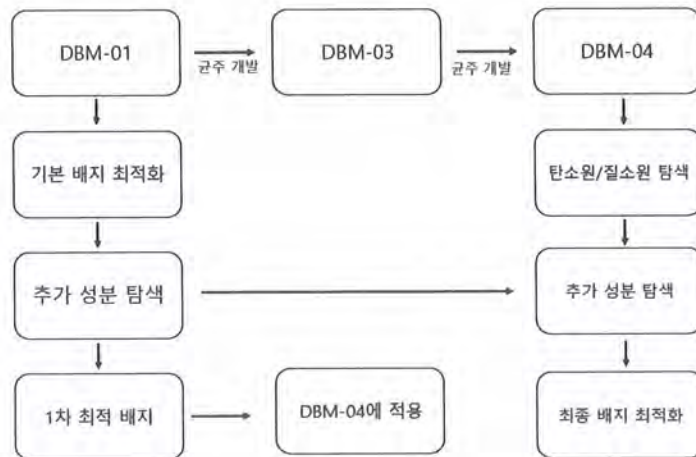


그림 91 배지 최적화 개요

4. *Str. avermitilis* DBM-01 균주발효조건 최적화

가. 종균조건 결정

제작된 균주에 적합한 종균배지를 선정하기 위해 *Str. avermitilis* 배양 논문 및 특허에 나타난 종균배지를 중심으로 비교시험을 진행하였다 (표 29).

표 29 . 종균배지 조성

	배지 조성
배지1 (control)	Soluble starch 30, Yeast Extract 15, Corn Steep Powder 5, KH ₂ PO ₄ 0.4; pH 7.2
배지2	Corn Starch 30, Soybean meal 8, Cotton seed meal 10, Yeast extract 4, CoCl ₂ ·6H ₂ O 0.03; pH 7.0
배지3	Corn starch 30, Corn steep powder 5, Yeast extract 15, KH ₂ PO ₄ 4, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2; pH 7.0 ~ 7.2
배지4	Glucose 20, soybean meal 15, Corn steep powder 5, Yeast extract 3, CaCO ₃ 0.3; pH 7.0
배지5	Soluble starch 20, Pharmamedia 15, Yeast extract 5, CaCO ₃ 1; pH 7.2
배지6	Soluble starch 30, Malt extract 2, Soytone 2, CoCl ₂ ·6H ₂ O 0.005; pH 7.2

종균배지 별로 종균배양을 수행한 후, 1차년도 확립된 생산배양조건을 활용하여 *Str. avermitilis* DBM-01의 생산성을 비교한 결과 그림 92 과 같이 종균배지 4를 이용한 경우가 상대적으로 우수한 결과를 보여 종균배지 조건으로 선정하였다.

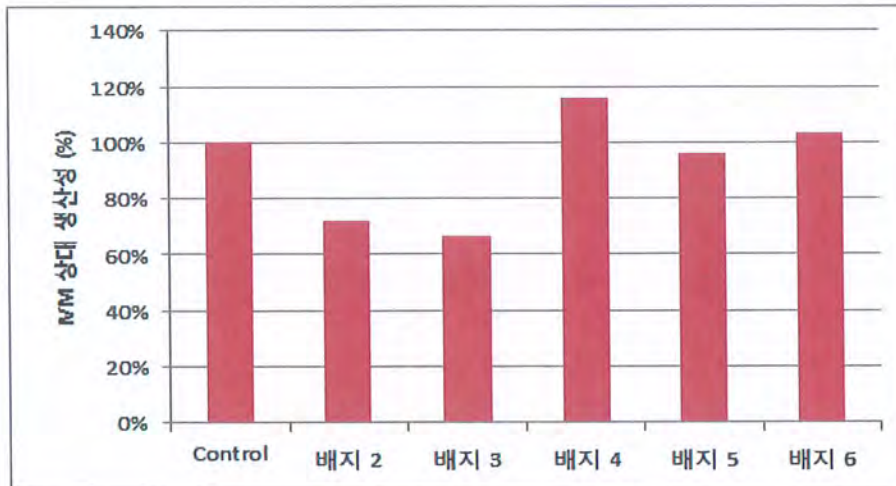


그림 92. 종균배지 별 DBM-01 대사체의 생산성 변화

종균배양 시 inoculation 되는 spore의 양에 따른 생산성을 비교하였다. 그림 93에서 볼 수 있듯이 종균배지 mL 당 2×10^6 spore 정도 seed 되었을 때 생산성이 우수하였으며, seed 되는 spore 양이 증가 될수록 생산성이 감소하는 것을 알 수 있었다.

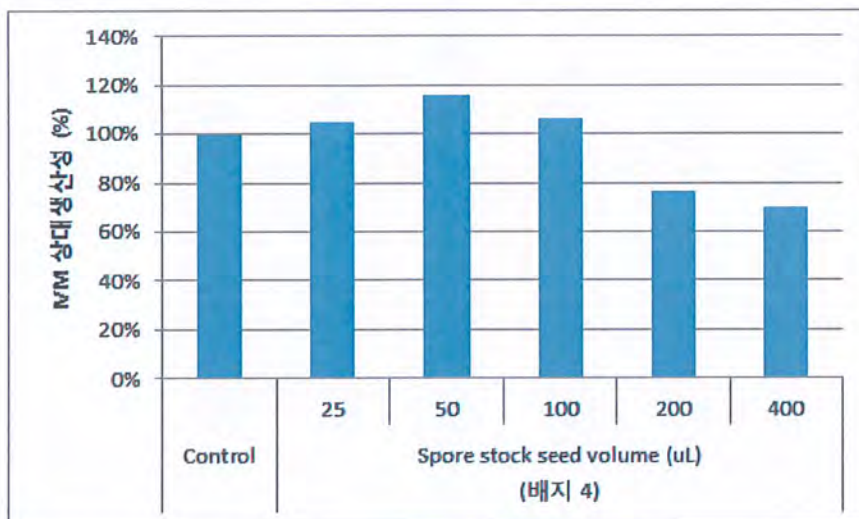


그림 93. 포자 접종량에 따른 DBM-01 대사체 생산성 변화. spore stock의 농도는 1×10^9 cfu/mL 임

나. 생산배지 및 배양조건 개선

(1) 주요 인자의 생산성 최대 농도 확인

탄소원, 질소원에 대한 평가는 1차 숙주 균주의 것을 활용하였으며, 기존에 사용하던 배지를 최적화한 후, 효과물질들에 대한 검색 및 탐색을 진행하여 추가성분들을 통해 생산성을 증대시키는 전략을 사용하였다. 이때 1차 최적 배지와 효과가 있는 추가성분들은



DBM-04에도 적용 가능할 것으로 예상하여 DBM-04에 대한 배지최적화 시에 시간을 단축시킬 것으로 예상하였다. *Str. avermitilis* DBM-01의 기본 배지 최적화에 앞서, 생산성이 최고가 되는 각 인자들의 농도 범위를 구하기 위해 각각 다른 농도에서 배양을 진행하였다.

기본배지의 주성분인 Soluble starch, Soybean meal, Skim milk가 주요 인자일 것으로 판단되어 농도에 따른 생산량을 확인하였다. 배양 조건은 아래의 표와 같다 (표 30, 표 31).

표 30 DBM-01의 이차대사산물의 생산 확인을 위한 배양 배지의 조성

Seed culture	g/L	Main culture	g/L
Soluble starch	30.0	Soluble starch	80.0
Yeast extract	15.0	Soybean meal (soybean flour)	10.0
Corn steep liquid (or steep powder)	5.0	Skim milk	15.0
KH ₂ PO ₄	0.4	KH ₂ PO ₄	0.5
pH 7.2 before sterilization			

표 31. Flask level 전배양 및 본배양 조건

Seed culture	Main culture
100ml Erlenmeyer Flask	100ml or 250mL Erlenmeyer Flask
1.05 x 10 ⁷ spores/ml	전배양액 2%
28℃	28℃
200 RPM	200 RPM
20ml	15ml or 25mL
46시간 전배양	240시간 (10일) 배양

그림 94를 보면, DBM-01의 경우 Soluble starch 는 12%에서 가장 높은 생산성을 보였으며, 0.8 ~ 14%사이에 최적 농도가 있을 것으로 예상할 수 있다. 반면, Soybean meal과 Skim milk는 농도에 따른 생산성 차이가 크지 않은 것으로 판단되었다. Soybean meal은 1~3%, Skim milk는 1.5~2.5% 사이에 최적 농도가 있을 것으로 예상하고 이에 따라 시험을 수행하였다 (그림 94). 질소원인 Soybean meal과 Skim milk에 비해 Soluble Starch농도에 따른 생산성의 차이가 큰 것으로 보아, 탄소원의 농도가 중요한 것으로 판단되었다.

다. Box-Behnken법을 이용한 배지 최적화

앞선 시험 결과를 활용하여 배지 주요 성분들의 최적농도 범위를 추정하였다. KH₂PO₄의 경우 기존 농도인 0.5g/L를 유지하였다. 각 인자별로 생산성을 최대화하는 최적 농도를 구하기 위하여 라 에서 구한 농도 범위에서 Box-Behnken법을 이용하여 실험을 수행하였다 (표 32). Box-Behnken법을 이용한 배지 최적화는 Minitab 16을 이용하여 triplet으로 디자인하였으며, 배양 조건은 표31을 따랐다.



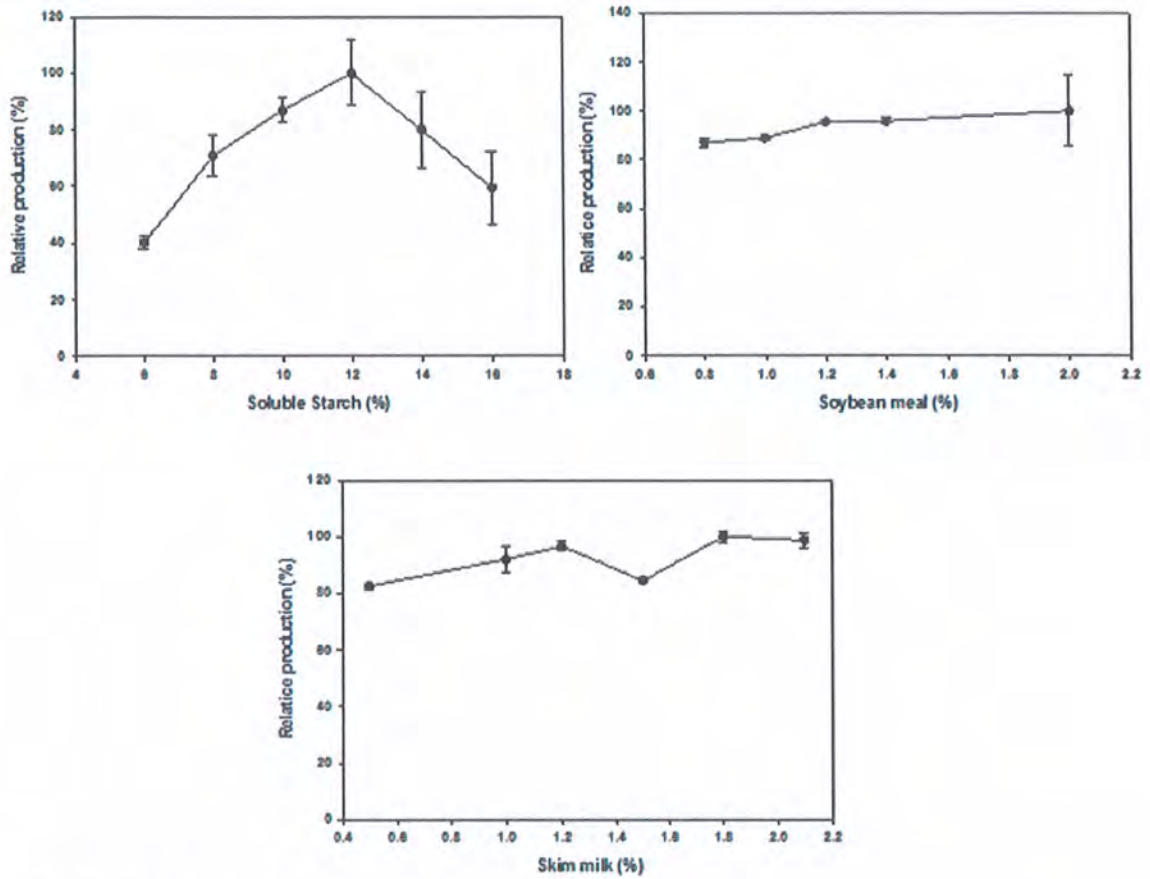


그림 94. 탄소원 및 질소원 농도 별 생산성 비교

실험 결과, 최적 농도는 Soluble Starch 10%, Soybean meal 1.1%, Skim milk 1.5% 로 기존의 배지와 매우 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 이로서 기존의 배지조성이 상당부분 최적화 되어있음을 확인하였다.

표 32 Minitab을 통한 Box-behnken 실험 design.

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Starch	Soybean flour	Skim milk
1	1	2	1	10	1	2
2	2	2	1	14	1	2
3	3	2	1	10	3	2
4	4	2	1	14	3	2
5	5	2	1	10	2	1.5
6	6	2	1	14	2	1.5
7	7	2	1	10	2	2.5
8	8	2	1	14	2	2.5
9	9	2	1	12	1	1.5
10	10	2	1	12	3	1.5
11	11	2	1	12	1	2.5
12	12	2	1	12	3	2.5
13	13	0	1	12	2	2
14	14	0	1	12	2	2
15	15	0	1	12	2	2
16	16	2	1	10	1	2
17	17	2	1	14	1	2
18	18	2	1	10	3	2
19	19	2	1	14	3	2
20	20	2	1	10	2	1.5

21	21	2	1	14	2	1.5
22	22	2	1	10	2	2.5
23	23	2	1	14	2	2.5
24	24	2	1	12	1	1.5
25	25	2	1	12	3	1.5
26	26	2	1	12	1	2.5
27	27	2	1	12	3	2.5
28	28	0	1	12	2	2
29	29	0	1	12	2	2
30	30	0	1	12	2	2
31	31	2	1	10	1	2
32	32	2	1	14	1	2
33	33	2	1	10	3	2
34	34	2	1	14	3	2
35	35	2	1	10	2	1.5
36	36	2	1	14	2	1.5
37	37	2	1	10	2	2.5
38	38	2	1	14	2	2.5
39	39	2	1	12	1	1.5
40	40	2	1	12	3	1.5
41	41	2	1	12	1	2.5
42	42	2	1	12	3	2.5
43	43	0	1	12	2	2
44	44	0	1	12	2	2
45	45	0	1	12	2	2

기본 배지의 조성이 이미 최적화 되어있으므로, 추가 성분들을 이용하여 생산성 증가를 모색하였다.

라. 기타 첨가물 효과

(1) 추가 당 feeding 효과

발효 시 추가되는 feeding 당 종류에 의한 생산성 변화를 확인하기 위해 flask 발효 6일차에 당 농도가 20g/L 증가하도록 각각의 당을 feeding 한 후 생산성 변화를 확인하였다. 그 결과, glucose에서 다당류로 첨가하는 추가당이 변화할수록 약간의 생산성 증가가 보이지만 큰 변화가 있지 않았다 (그림 95).

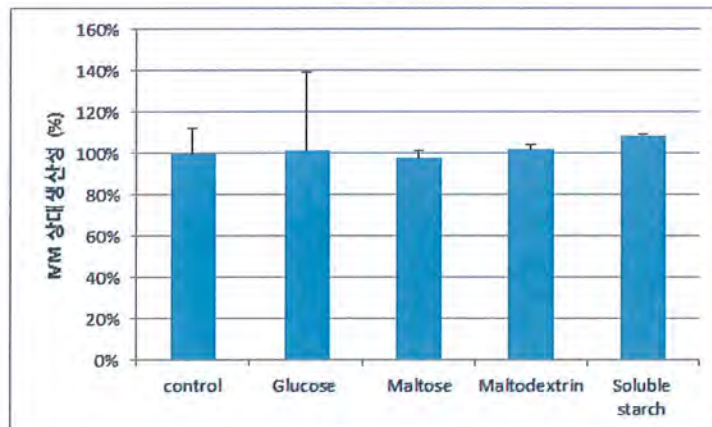


그림 95. 당 feeding에 의한 DBM-01 생산성의 변화

(2) Metal ion 첨가 효과

Metal ion에 의한 생산성 영향을 평가하기 위하여 각각 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01g/L, Trace element 1X (최종 농도 Ferrous sulfate 1 mg/L, Zinc sulfate 1mg/L, Manganous chloride 1mg/L), Trace element 와 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 생산배지에 첨가하여 배양을 진행함. 그 결과 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가한 경우 생산성의 변화는 없었으며, 기타 다른 조건에서는 생산성이 감소하는 결과를 얻어 현 조건에서 별도의 metal ion 첨가 효과는 없을 것으로 판단하였다. (그림 96).

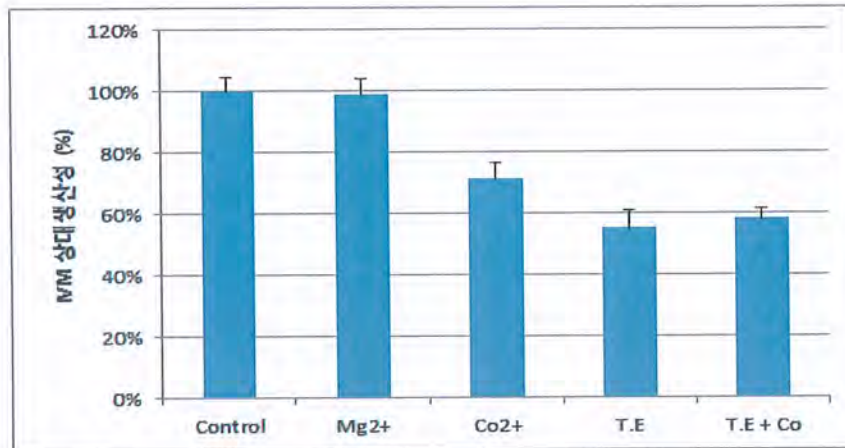


그림 96. metal ion 첨가에 의한 DBM-01 생산성변화

(3) 아미노산 첨가 효과

Str. avermitilis DBM-01 균주를 이용하여, 각 아미노산의 종류에 따른 생산성의 변화를 확인하기 위하여 20개의 아미노산을 기본 배지에 첨가하여 각각의 효과를 검색하였다. 기본 배지는 표 29. 의 조성을 따랐으며, 각 아미노산들은 100mM stock으로 제조한 후, 최종 농도를 2mM로 맞추어 첨가하는 방식으로 효과를 확인하였다. 그 결과, control 배지와 비교하여 전반적으로 대부분의 아미노산이 생산량 증가를 보였다. 그 결과 control 배지에 비교하여 전반적으로 생산량 증가를 보이는 것으로 보였다. 특히 alanine, phenylalanine, threonine 등의 생산성 증가를 확인할 수 있었다 (표 33).

표 33. 아미노산 첨가에 의한 생산성 증가

Control (%)	gln	Leu	Val	Lys	Ile	Arg
100	121.39	140.54	127.36	117.40	114.94	128.22
	Asn	His	Phe	Pro	Thr	Ala
	134.76	119.23	162.41	141.31	158.38	176.72

Aspartate, Glutamate, Tyrosine, Tryptophan 의 경우 solubility가 매우 낮아서 100mM stock 제조 시 pH를 매우 높게 제조하였다. 그 결과 배지에 첨가 시 pH 변화를 유도하여 전혀 생산성을 보이지 않았다. 결과적으로, 대부분의 아미노산이 생산성 증가에 긍정적 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 그 중 특히, Alanine, Phenylalanine, Threonine 등의 아미노산들은 그 효과가 상당할 것으로 예상되며 aglycone 형성에 주요한 영향을 미치는 것으



로 사료되었다.

(4) 효과물질 탐색

DBM-01 균주를 이용하여, 배지 첨가에 불필요한 인자들에 대한 탐색을 수행하였다. 문헌들을 통해 알려진 생산량 증가물질들을 첨가하여, 각 물질들이 생산성에 미치는 영향을 확인하였다. 5mM Acetonitrile(ACN), Amylase 30unit, Biotin 1ng/ml, 1% Chitin, 3mM DMSO, 1% Ethanol, 1mM Furfural, 5mM Isobutanol, Trace element (MgSO₄(0.01%), FeSO₄, ZnSO₄, MnSO₄(0.005%))을 후보물질로 하여 첨가 후 생산성을 확인하였다. 각 물질들의 농도는 문헌의 농도를 따랐으며, 배양 조건은 표 31를 따랐다.

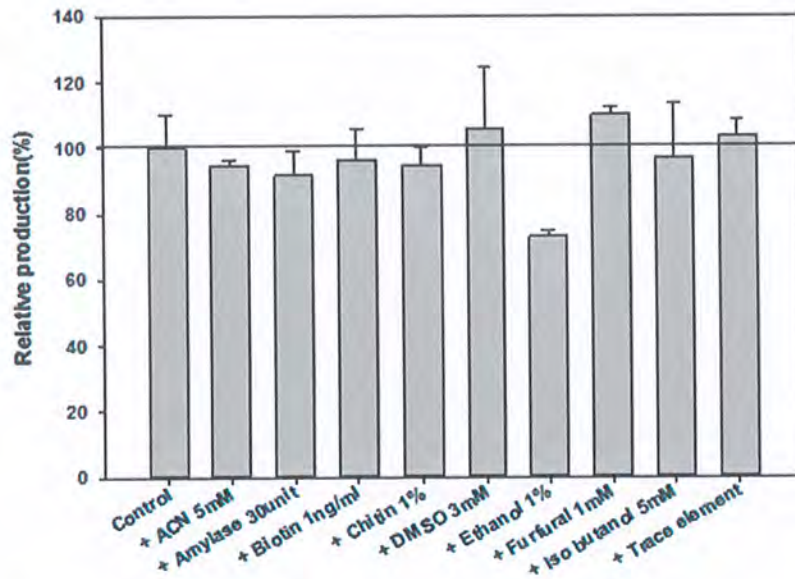


그림 97 발효 배지 첨가물의 Milbemycin 생산성 영향

Amylase의 경우, 기본배지의 탄소원인 Soluble starch를 분해하여 Biomass를 증가시켜 생산성이 증가할 것으로 예상되었으나, 실험 결과 생산성에 거의 영향을 미치지 못하고, 오히려 생산성이 떨어지는 것이 관찰되었다. ACN, Biotin, Chitin, Ethanol, Isobutanol 또한 세포 stress를 높여 생산량을 증가시키는 것으로 알려져 있으나, 실험결과 오히려 생산성이 감

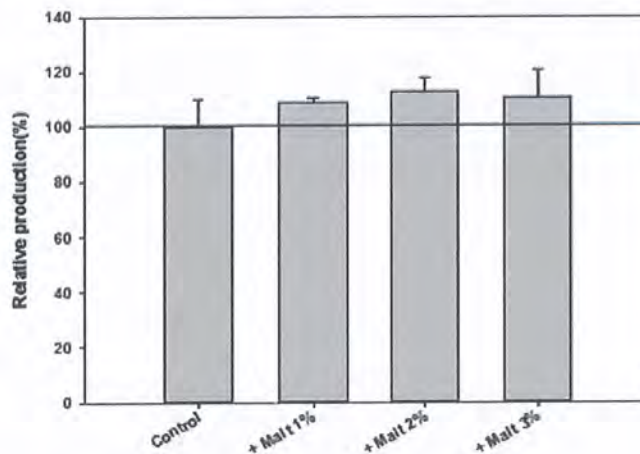


그림 98 Malt extract 첨가물의 영향평가

소하였다. 이에 Amylase, ACN, Biotin, Chitin, Ethanol, Isobutanol은 배지에 불필요한 인자로 판단되어 배지성분에서 제외되었다. 반면, DMSO, Furfural, Trace element는 각각 11.61%, 10.57%, 10.82%의 생산성 증가가 관찰되어 배지 성분 후보에 추가하였다. 다른 물질들과 더불어 Malt extract를 첨가하는 경우에도 생산량이 증가 되는 것이 관찰되었고, 각 농도별로 생산성이 얼마나 증가하는지를 확인하였다 (그림 98). Malt extract 2%를 첨가했을 때, 생산성이 Control 대비 약 12% 증가하는 것을 확인하였다.

(5) 전구물질 첨가 효과

Avermectin 및 Milbemycin의 aglycone 구조는 5개의 Propionate 형태와 7개의 Acetate 형태로 구성되어있다. 이러한 사실을 바탕으로 Aglycone의 전구체로 역할을 할 수 있는 propionate와 acetate의 첨가효과를 확인하였다. 그 결과, acetate의 경우 0.1% 첨가시 저해 효과가 강하여 생산성을 보이지 않았으며, propionate의 경우 0.1% 첨가시 생산성이 control과 큰 차이를 보이지 않아 0.3%로 증가시켰으나 생산성이 저해되었다 (그림 99).

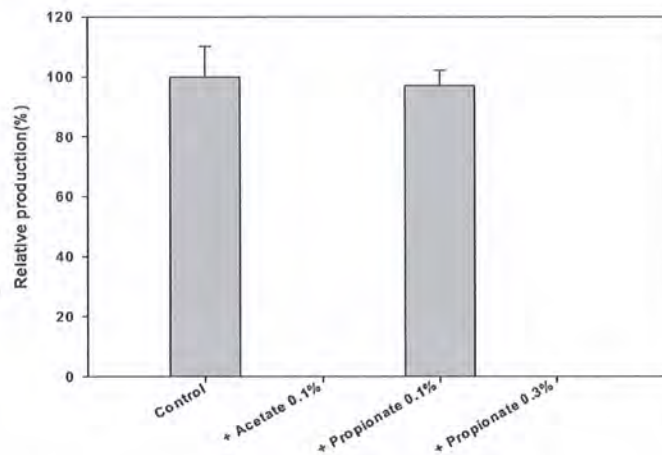


그림 99. Acetate 및 propionate 첨가 효과

(6) 염도 변화에 따른 효과

배지 내 염도에 따른 생산성 변화를 확인하기 위해 NaCl 과 KCl의 첨가 농도를 달리하여 생산성 변화를 확인하였다. 그 결과 KCl의 농도가 7g/L 이상에서 생산성 증가가 관찰되었으며, 추가로 KCl의 농도를 증가하여 생산성 변화를 확인한 결과, KCl 10~11 g/L에서 가장 높은 생산성을 보이는 것으로 관찰되어 KCl를 추가하여 생산배양을 진행하였다. (그림 100, 그림 101)

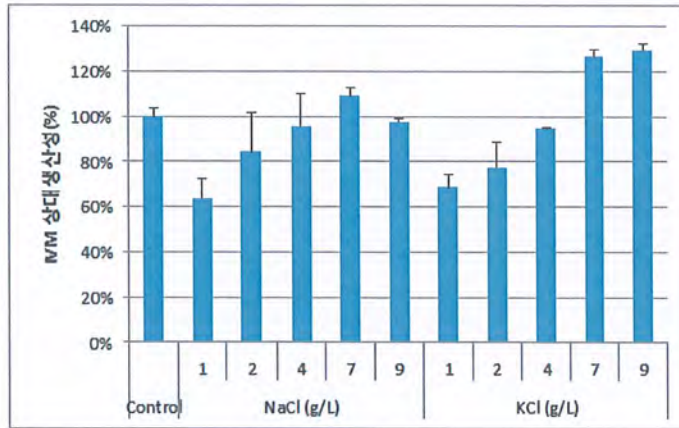


그림 100. 염도 변화에 따른 DBM-01 대사체 생산성 비교

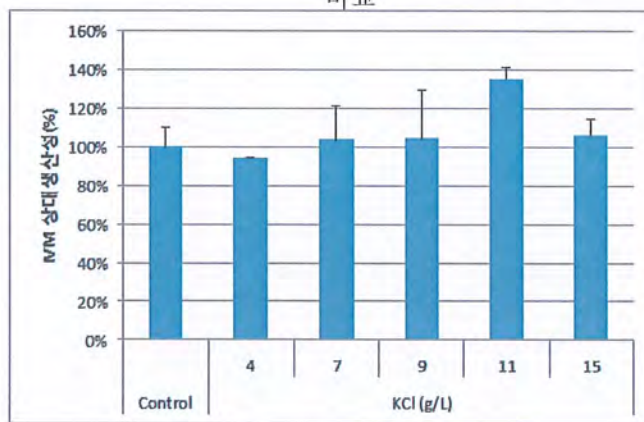


그림 101. KCl 농도에 따른 DBM-01 대사물질 생산성 변화

(7) 소포제 영향 평가

발효 시 생성되는 거품을 제거하기 위한 antifoamer의 경우 과다 투여시 균체의 성장 및 물질 생산에 큰 영향을 미칠 수 있다. 사용 중인 antifoamer의 생산 영향을 확인하기 위해 DBM-01 생산배지에 농도별로 첨가한 후 Ivermectin analogue의 생산성을 비교하였다.

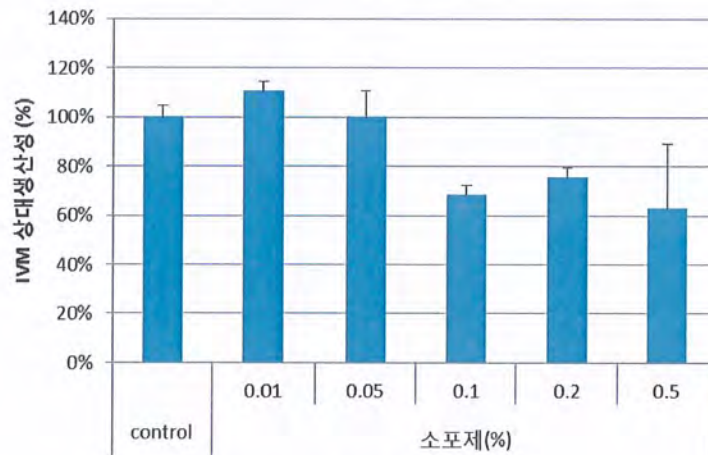


그림 102. 소포제 영향 평가

그 결과 0.05% (v/v) 까지 생산성에 영향을 주지 않으며, 0.1% 이상에서 생산성 감소가 관찰되었다. 따라서, 사용범위에서 생산에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다 (그림 102).

마. *Str. avermitilis* DBM-01 균주 5L 배양

시험 결과 얻어진 생산배지 조건을 활용하여 milA1 삽입균주인 DBM-01의 5L 배양을 수행하였다. 시험에 이용한 배지 조성 및 배양조건은 표 31와 같다. 효과물질로 선정된 amino acid와 malt extract는 milbemycin 생산균주인 DBM-04 균주 배지 최적화에서 적용하기로 하였다.

표 34 . DBM-01 5L 배양조건

종균 배지	Glucose 20g/L, Soybean flour (Sigma) 15g/L, Yeast extract 5g/L, Corn steep powder 3g/L, pH 7.0
생산 배지	Soluble starch 100g/L, Soybean meal 10g/L, Skim milk 15g/L, KH ₂ PO ₄ 0.5g/L, KCl 10g/L, pH 7.0, 121도 20분 멸균
배양 조건	초기 agitation speed: 330 rpm, Aeration: 1vvm; DO level: >20%, 13일 배양

배양결과를 분석하기 위해 각 시간마다 sampling 하여 ethanol 3 부피를 가하고 10분간 sonication 한 뒤 물질의 농도를 HPLC로 결정하였다. 최종 대사체의 농도를 결정하기 위해서 균체를 전량 회수 한 후, 상등액을 제거하고 ethanol 3배를 가하여 물질을 추출한 뒤 농도를 결정하였다. 물질의 생산은 48시간 이후 시작되며, 최종적으로 DBM-01 대사체인 ivermectin analogue의 생산성은 1.0g/L 에 이르렀다 (그림 103).

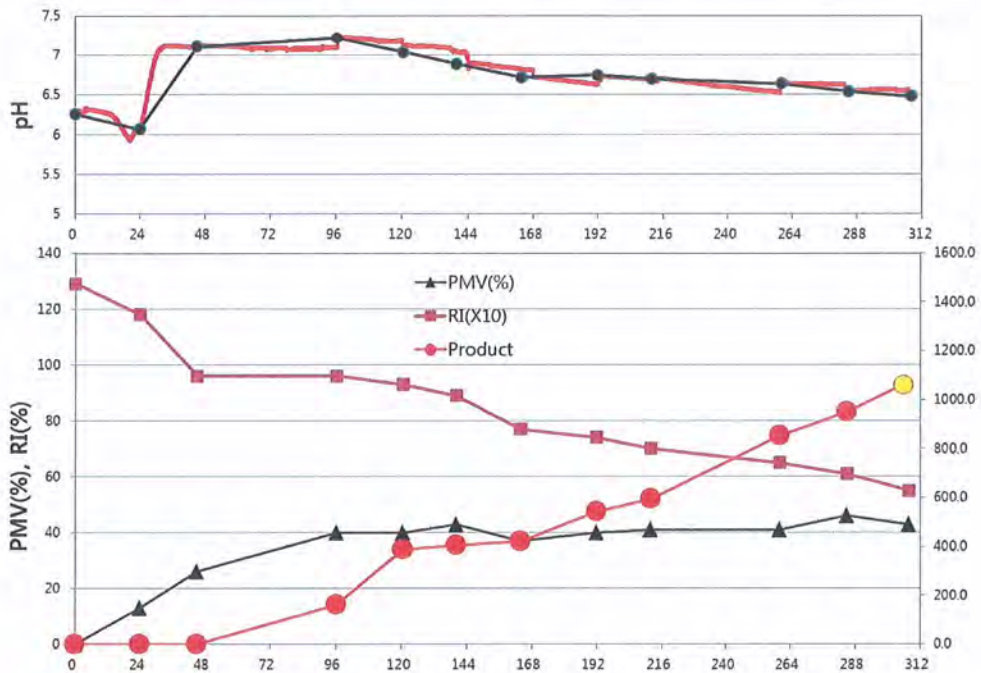


그림 103. milA1 삽입균주인 DBM-01 의 5L 발효 그래프. PMV는 packed mycelia volume (%), RI는 refractive index (%), product는 DBM-01의 대사체인 Ivermectin analogue를 가리킴



동일한 조건으로 milA3를 도입한 DBM-01-D7K9milA3 (DBM-03-C)의 5L 배양결과 total milbemycin이 0.42g/L 수준임을 확인할 수 있었다 (그림 104).

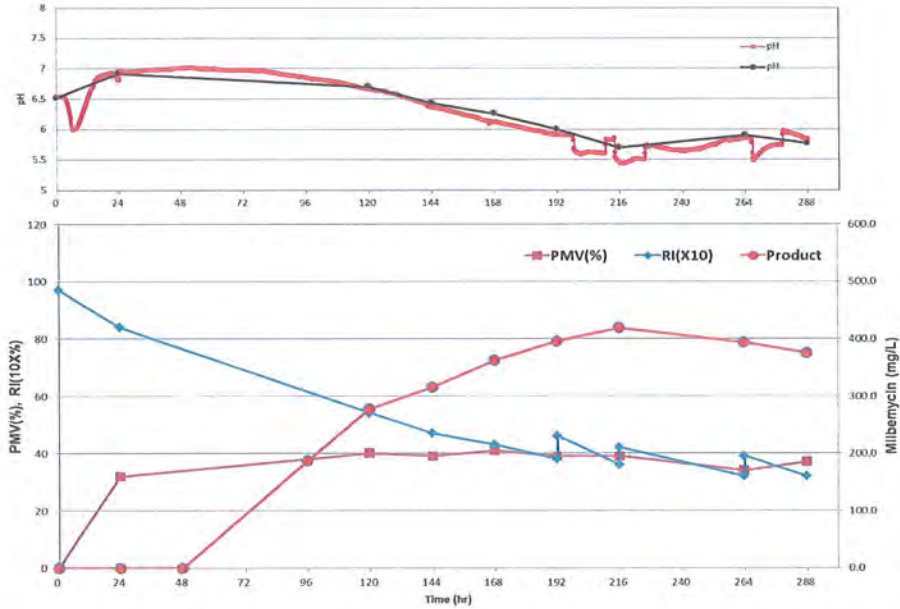


그림 104. *Str. avermitilis* DBM-01-D7K9milA3 (DBM-03-C)의 5L 발효 그래프. PMV는 packed mycelia volume (%), RI는 refractive index (%), product는 대사물질인 milbemycin의 농도를 가리킴.

5. Milbemycin 생산균주 발효 최적화

2차년도 확보한 DBM-01의 생산배양 조건을 적용하여 milbemycin 생산균주인 DBM-04의 발효 최적화를 진행하였다.

가. Milbemycin 생산균주 배양 부산물 생성 조건 분석

Milbemycin 생산균주인 DBM-04의 배양 flask 배양 시 부산물로 추정되는 물질의 생성을 관찰할 수 있었다 (그림 105).

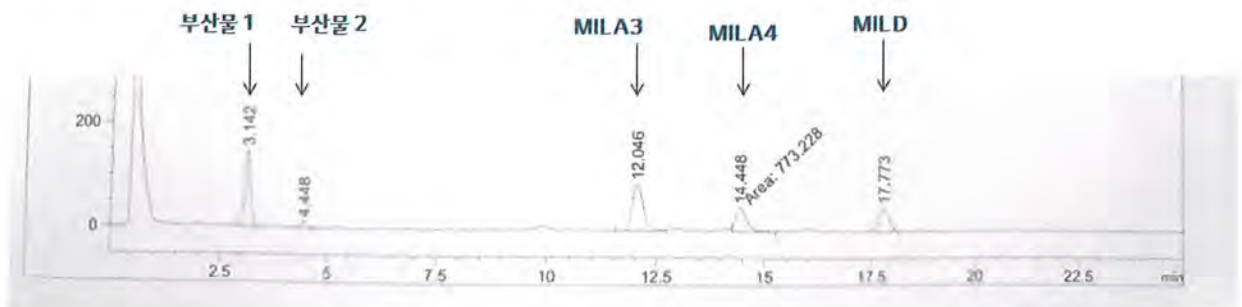


그림 105. Flask 배양시 생성되는 milbemycin 및 부산물

이들 부산물 중 RT 3분 및 4.4분의 부산물은 milbemycin과 동일한 흡광 스펙트럼을 갖고 있고, milbemycin A3 및 A4의 peak area와 연동되어 있는 것으로 추정되었다. 따라서, 부산물 생성을 억제하는 배양조건 확보가 시급하였다.

(1) pH 영향 평가

부산물이 milbemycin 유래 혹은 전구 물질일 것으로 예상되어 화학물에 대한 물리적 영향 중 배양 pH에 의한 milbemycin 및 부산물의 생성의 관계를 확인하고자 하였다. 배양의 전체 기간중에 다양한 조건의 pH를 유지하기 위해 buffering chemical인 MES와 MOPS를 각각 10g/L을 생산배지에 첨가하여 milbemycin과 부산물의 생성을 비교하였다 (그림 106).

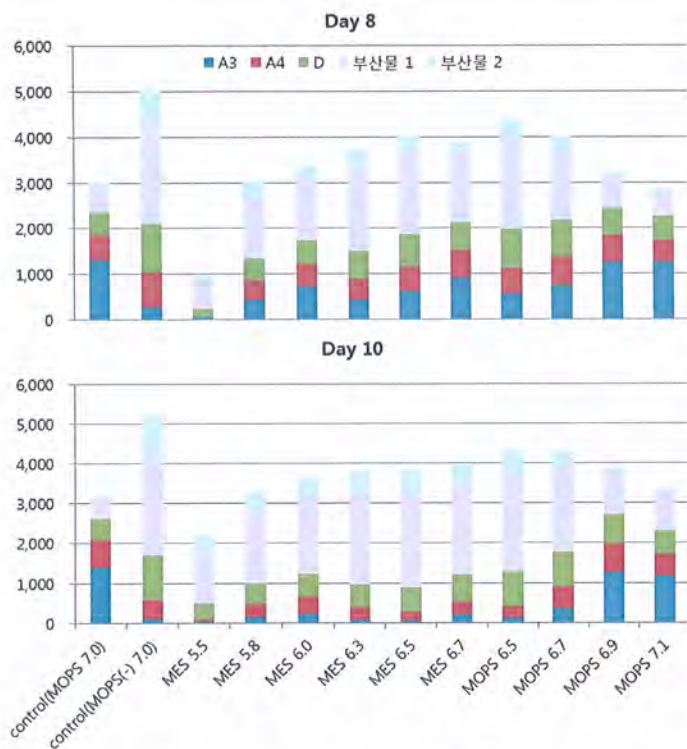


그림 106. DBM-04 flask 배양 pH 별 부산물의 생성

그림에서 알 수 있듯이 milbemycin A3와 A4의 농도는 initial가 pH 6.9~7.0 인 조건에서 가장 높았고 pH가 낮아질수록 감소하였으며, 배양기간이 길수록 A3의 감소폭이 컸다. 반면, total area는 pH 6.5에서 가장 높았고, 부산물 생성은 pH 6.3~6.5에서 높았으며 중성으로 갈수록 생성이 감소하였다. MOPS를 첨가한 경우와 MOPS가 없는 경우의 total area의 차이가 나기 때문에 MOPS를 첨가한 경우 생산성에 영향을 줄 수 있으나 부산물 함량을 감소시키기 위해 첨가하였다.

(2) KCl 영향 평가

DBM-01에서 KCl의 첨가에 의해 ivermectin analogue의 생산량이 증가함을 알 수 있었다. 이와 같은 효과가 milbemycin 생산과 부산물 생성에 어떤 영향을 미치는지에 대해 평가하

고자 하였다. KCl 10g/L와 MOPS 10g/L를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우로 initial pH를 달리하여 DBM-04를 배양하였을 때, 부산물 생성비율이 달라짐을 알 수 있었다). pH를 control하지 않고 initial pH 만 달리한 경우 KCl을 첨가함으로써 부산물 비율이 크게 증가함을 알 수 있었으며, MOPS에 의해 pH가 control 되는 경우에도 KCl의 첨가에 의해 milbemycin 생산량이 다소 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 107).

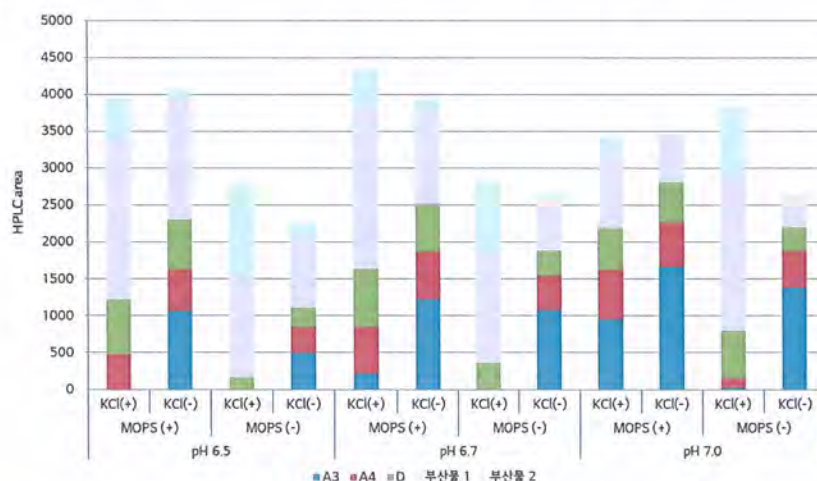


그림 107. pH 와 KCl 첨가 관계

앞서 배양액의 pH 변화에 의해 부산물 생성이 크게 영향을 받는 것을 확인 하였으므로 배양액의 멸균후 pH와 배양 후 pH를 비교하였다 (표 35). 그 결과 MOPS를 첨가하고 KCl을 첨가하지 않은 상태에서 initial pH를 7.0으로 하였을 때, milbemycin의 생산성이 가장 높아 Flask 배양에서의 조건으로 활용하였다. 또한, DBM-01의 경우 KCl의 첨가에 의해 5L 배양 시 생산을 안정화하여 부산물 생성을 최소화 하는 조건을 찾아 5L 배지 최적화에 적용하기로 하였다.

표 35 . MOPS 와 KCl 첨가에 따른 배양액 pH 변화

MOPS (10g/L)	KCl (10g/L)	배양액의 멸균전 pH					
		pH 6.5		pH 6.7		pH 7.0	
		멸균 후	배양 종료	멸균 후	배양 종료	멸균 후	배양 종료
+	+	6.3	6.3	6.5	6.5	6.8	6.7
	-	6.4	6.3	6.6	6.5	6.9	6.8
-	+	6.0	5.5	6.1	6.2	6.3	6.5
	-	6.2	5.6	6.3	5.7	6.4	5.8

(3) KCl 첨가 효과 재확인

pH를 control 하는 경우에 있어 KCl의 영향을 평가하였다. KCl을 농도별로 첨가 시 첨가하지 않은 경우에 비하여 4g/L 까지 side product 생산이 최소화 되지만 그 이상에서는 side product가 생성됨이 확인되어 향후 KCl을 첨가물로 고려시 4g/L 이하에서 사용하고자 하였다 (그림 108).

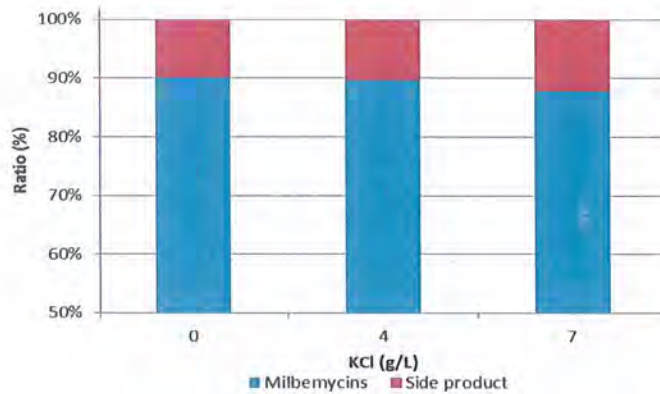


그림 108. KCl 농도별 영향 평가

나. 5L Jar 발효 적용

5L Jar 배양시 flask 조건을 적용하여 부산물의 생성을 검토하였다. 일반적으로 DBM-04 배양조건에서 5L Jar에서의 pH는 milbemycin 생산기간 동안 6.8~ 7.0 수준으로 유지되지만 pH control이 없는 경우 경우에 따라 배양 중반 pH가 감소하는 경우도 관찰되어 발효 안정성을 위해 배양 48 시간에 pH를 6.8로 조정하여 발효를 수행하였다. 그 결과 flask 배양에서 상대순도로 10% 이상 관찰되었던 RT 3분대의 부산물이 3~4% 정도로 감소하여 매우 낮은 부산물 생성량을 확인할 수 있었고 이후 시험에서 배양 48시간 후 Jar pH를 6.8로 control 하여 발효를 진행하였다.

KCl이 첨가되지 않은 경우 발효 도중 배양액 및 발효조 표면에 점성이 있는 물질이 발생하는 경우가 생겼다. 배양액 상에 생성되는 흰색의 점액성 물질을 회수하여 milbemycin의 함량을 분석하고자 하였다. 이를 위해 점액성 물질을 ethanol을 첨가해 용해한 후, ethanol 1/10으로 희석하여 분석하였다. 그 결과 점액성 물질내 6.6 ~ 7.3% (w/w)의 milbemycin이 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 생성되는 milbemycin의 일부가 배양액 상으로 배출되고 소수성의 점액성 물질에 붙어 있는 것으로 생각되었다.

2. 탄소원 변경 적용

가. Fructose 적용

2년차 결과에서 Flask 수준에서 milbemycin 생산성을 증진시킨 것으로 보고한 fructose를 탄소원으로 적용하여 5L 배양을 수행하였다. 탄소원으로 기존의 soluble starch를 적용한 경우는 pellet 이 형성되고 이후 발효 말기 pellet의 색이 더욱 진해지는 것을 확인할 수 있었지만, fructose를 탄소원으로 사용한 경우는 pellet을 형성하지 못하고 clump 형성이 관찰되었다 (그림 109). avermectin이나 milbemycin의 경우 clump 혹은 균사형태로 배양시 물질이 생성되지 않는 것이 이전 배양결과에서 확인된 바 있다. 따라서, 5L 배양시 초당으로 fructose를 사용하는 것이 어려움을 알 수 있었다. 또한, flask 배양에서 milbemycin peak와



유사한 위치에 있는 oligomycin이 과량 생성됨을 알 수 있어 분석오류를 유발할 수 있었다.

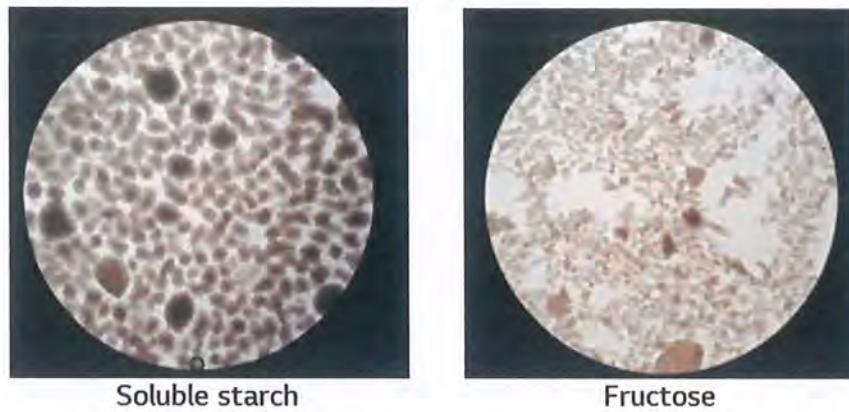


그림 109. DBM-04 5L 배양액 내 균체 비교 (5일차 배양)

나. 산업용 탄소원 적용

5L 발효 중 활용한 soluble starch를 산업적으로 저가로 이용가능한 탄소원으로 대체하여 수행하기 위해 alpha amylase로 가수분해한 corn starch 와 glucose, maltose로 milbemycin 생산량을 확인하였다. 그 결과 control에 비해 alpha amylase로 가수분해한 corn starch (이하 hCS)를 탄소원으로 이용한 경우가 보다 우수하였다. 또한, DBM-01의 탄소원 농도 시험에서 탄소원의 농도를 증가시켰을 때 생산성 증가가 관찰되어 hCS의 농도를 120g/L로 증가시켰을 때, control에 비해 milbemycin A3+A4의 농도가 40% 정도 증가하는 것을 알 수 있었으며, hCS를 80g/L으로 증가하였을 때에 비해 10% 정도의 농도 증가를 관찰할 수 있었다 (그림 110). glucose를 탄소원으로 이용한 경우에 있어서도 control에 비해 생산성 증가가 확인 되고 A4의 비율이 다소 증가하는 것이 보였으나, Maltose를 탄소원으로 이용한 경우 milbemycin을 거의 생산하지 못하고 side product가 증가하는 양상을 보였다. 따라서, 이를 기반으로 hCS 120g/L를 기본 탄소원농도로 하여 5L 발효에 적용하였다.

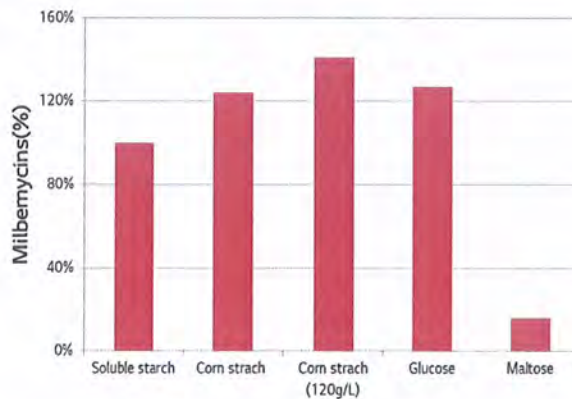


그림 110. 산업용 탄소원의 적용

다. 5L 배양을 위한 탄소원 조성 결정

생산성이 상대적으로 우수한 hCS를 기반으로 하여 복합 탄소원에 의한 생산성 증가 가능성을 탐색하였다. Soluble starch 80g/L를 기준으로 hCS 120g/L를 단독으로 사용한 경우와 함께 glucose와 fructose를 hCS와 혼합하여 최종 농도가 120g/L 가 되도록 하였다 (그림 111). 그 결과 hCS를 단독으로 사용한 경우의 milbemycin 생산량이 가장 높았으며, 앞선 결과와 마찬가지로 soluble starch를 80g/L 사용한 경우에 비해 40% 증가함을 알 수 있었다. fructose를 hCS와 혼합하여 사용한 경우 control에 비해 milbemycin 생산성이 증가하였으나 hCS를 단독으로 사용한 경우에 비해서는 낮은 생산성을 보였다. 또한, fructose의 양이 증가할수록 milbemycin 양이 다소 감소하는 결과를 보였다. 반면, glucose를 단독으로 사용한 경우는 80g/L를 사용한 경우와 달리 milbemycin을 생산하지 못하고 oligomycin 만을 생산하였다. hCS와 glucose를 혼합하여 사용한 경우 milbemycin 생산성은 control의 80% 수준이었다. 탄소원으로서 hCS가 혼합 사용된 경우와 달리 glucose, fructose를 혼합하여 사용한 경우는 milbemycin 생산이 거의 이뤄지지 않아 탄소원의 type이 milbemycin의 생산성에 매우 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 또한, fructose 혼합사용 결과가 glucose에 비해 우수하기 때문에 향후 fructose를 기반으로 하는 polysaccharide에 대한 탄소원 검토도 필요할 것으로 사료된다.

생산성이 증가한 hCS 120g/L를 5L 발효 시 탄소원 조건으로 사용하였다.

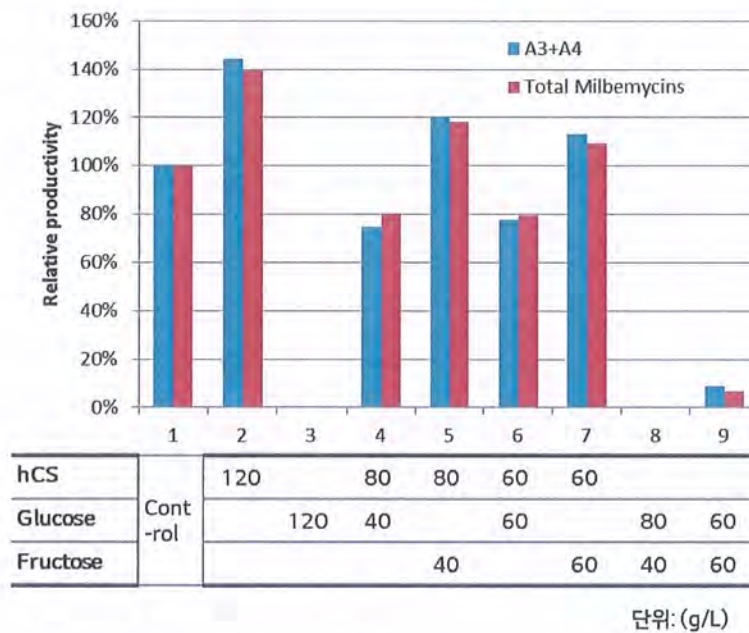


그림 111. 복합 탄소원의 milbemycin 생산성 영향

3. 첨가물 시험

가. DBM-01의 생산성에 효과적인 물질의 milbemycin 생산균주 적용

DBM-01을 이용하여 생산성 증가를 보인 여러 효과물질들, Malt extract, Alanine,

Phenylalanine, Threonine, DMSO, Furfural, Trace element 중 생산성 증가효과가 비교적 우수했던 Malt extract, Alanine, Phenylalanine, Threonine을 DBM-04 배양에 적용시켜보고자 하였다. Malt extract의 경우 가장 효과가 있었던 2%와 3%, 아미노산들의 경우 3mM 농도로 배지에 첨가하였으며, 모든 유효물질들은 멸살하여 최종농도를 맞춰 접종 직전에 첨가하였다. DBM-01을 이용해 검색한 대부분의 효과물질들의 경우 DBM-04의 생산성을 떨어뜨렸으며, Phenylalanine의 경우만 생산성을 비슷하게 유지하여 효과가 없는 것으로 판단되었다 (그림 112).

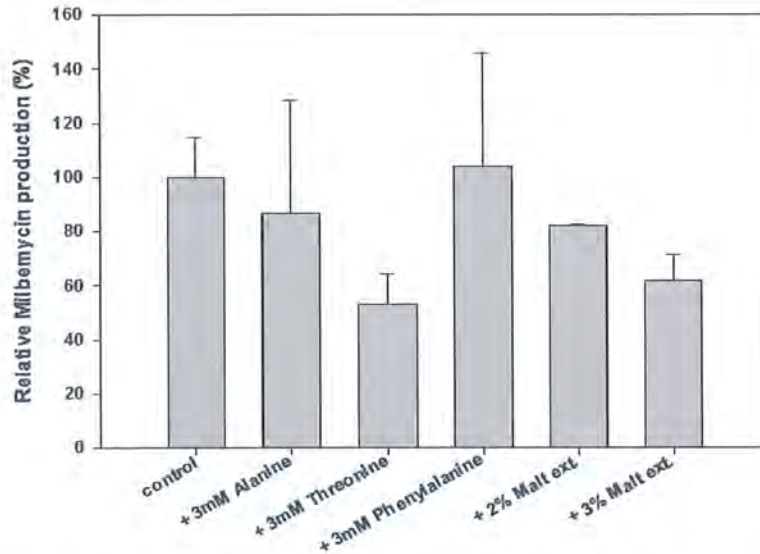


그림 112. DBM-01 생산성 증가에 효과를 보인 첨가물의 DBM-04 생산성 영향 평가

나. Milbemycin 전구물질 첨가

(1) S-adenosyl methionine의 첨가

S-adenosyl methionine (SAM)은 *Str. coelicolor*에서 Methylation의 전구체로 작용하여 Undecylprodigiosin의 생산량을 늘리고, Methylation과 관련없는 Actinorhodin 생산량도 함께 증가시킨다고 알려져 있으며, *Str. avermitilis*에서 1mM의 SAM을 처리한 경우, Avermectin 생산량이 5배 증가한 보고가 있다. DBM-04에도 같은 조건으로 실험을 진행하여, 본배양 접종 후 24시간에 여러 농도의 SAM을 처리한 결과, SAM의 농도가 증가할수록 Milbemycin 생산량은 감소하는 것이 관찰되어 milbemycin 생산에 부정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다 (그림 113).

(2) Pantothenic acid 첨가

Pantothenic acid는 CoA-pool을 증가시켜 전구체인 Malonyl-coA의 양을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 전구체인 Malonyl-CoA의 양을 증가시키면 최종 산물인 Milbemycin의



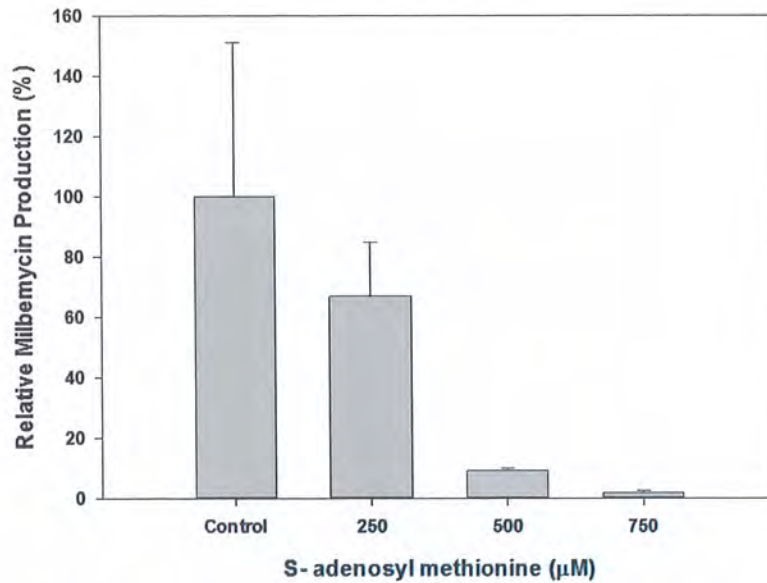


그림 113. SAM 농도에 따른 상대적 Milbemycin 생산성 비교

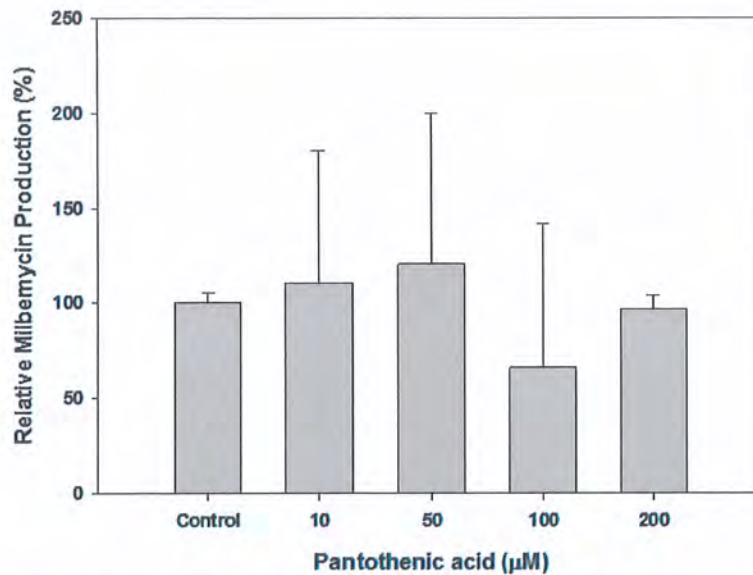


그림 114. Pantothenic acid 첨가에 따른 상대적 milbemycin 생산성 비교

생산량도 증가할 것으로 예측하였다. 다른 유효물질과 마찬가지로 배양 시작 후 24시간에 각 농도별로 살균된 Pantothenic acid를 첨가하였다 (그림 114).

최종산물인 Milbemycin의 양을 측정한 결과, 50μM까지는 생산량이 소량 증가하였으나 전반적으로 큰 차이가 없었다. 이는 Pcc 유전자를 도입하여 효과가 없었던 것과 동일한 결과로 생각된다.

(3) Vitreoscilla haemoglobin(VHb) 효과 검색

V. haemoglobin(VHb)은 세균 유래의 헤모글로빈으로 균의 생장에 산소에 대한 민감성을 낮춰주는 것으로 알려져 있다 (Khosla and Bailey, 1988). 방선균은 Filamentous growth를



하여 생장에 산소농도가 중요하고 민감성이 비교적 큰 균주이기 때문에, VHb유전자를 발현 하면 안정적인 생장이 가능하고, 2차대사산물의 생산도 안정적일 것으로 예상되었다. 또한, 사전 연구에서 모균주인 *Str. avermtilis* 의 avermectin 생산 및 DBM-01의 Ivermectin analogue 생산에 있어서도 용존산소 수준을 일정이상 유지하는 것이 매우 중요하다. 또한, milbemycin의 원 생산균주인 *Str. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*의 scale-up에 있어서도 용존산소 수준을 유지하는 것이 milbemycin 생산성에 큰 영향을 주는 것이 보고되어 있다 (Okada and Iwamatsu, 1997). 이에 DBM-04에 VHb를 발현하여 배양간의 산소에 대한 민감성을 낮추어 milbemycin 생산성을 증진하고자 하였다. 방선균의 경우 발현되는 유전자의 Copy Number에 따라 발현량에 차이가 나는 것으로 알려져 있음. 이러한 사실을 고려하여 과발현 벡터인 pIBR25와 Integration 벡터인 pSET152에 모두 클로닝하여 형질전환 하였다.

형질전환한 각 균주를 같은 조건에서 배양하여 VHb유전자가 발현되지 않는 DBM-04와 Milbemycin 생산성을 비교하였을 때, 같은 조건에서 10일간 배양 후, Milbemycin 생산성을 비교한 결과, VHb 과발현 한 경우 오히려 생산성이 감소하는 것이 확인되었다 (그림 115). 이는 VHb의 과발현으로 인해 물질의 생산이 제한되는 것으로 여겨지며 VHb의 효과를 확인하기 위해서는 보다 적합한 프로모터를 갖고 있는 발현시스템을 구축하여야 할 것으로 예상된다.

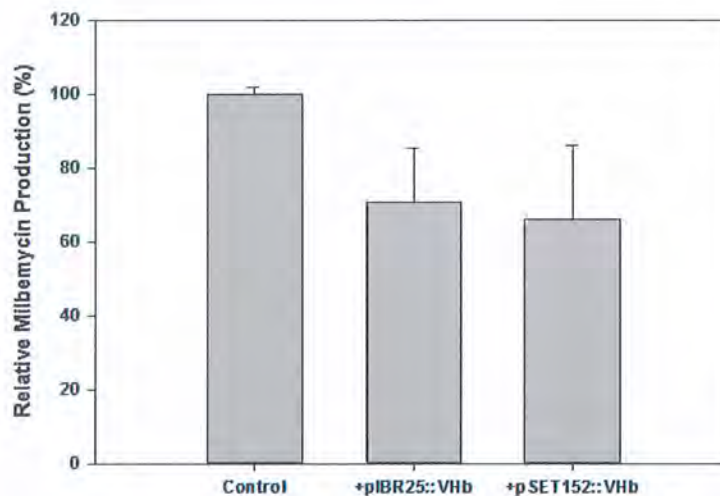


그림 115 VHb 유전자 발현 후 상대적 생산성 비교

(4) Rotenone & 2,4-dinitrophenol

Rotenone과 2,4-dinitrophenol은 ATPase inhibitor로 작용하여 Respiratory chain의 flow를 저해시켜 Glycolysis 말단에서 Pyruvate를 축적시키는 것으로 알려져 있으며, Pyruvate-pool을 증가시켜 여러 대사물질 생산량을 증가시키는 것으로 보고되어 있다. 마찬가지로, DBM-04의 2차대사 전구체인 Pyruvate pool을 늘려 Milbemycin 생산량을 늘릴 수 있을것으로 기대하여 배양 시작 후 24시간에 각 농도별로 처리하였다. 그러나, Rotenone 과 2,4-dinitrophenol 첨가시, Milbemycin 생산량은 감소하였으며, Rotenone의 경우 농도가 증



가할수록 Milbemycin 생산량은 감소하였다 (그림 116). 따라서, *Str. avermitilis* DBM-04의 2차대사를 전체적으로 저해하는 것으로 사료되었다. 이는 pyruvate 대사가 milbemycin *Str. avermitilis* DBM-04의 이차 대사산물 생산에 중요하다는 것을 반증하며, 향후 rotenone 및 2,4-dinitrophenol에 대한 내성 균주를 개발함으로써 세포내 pyruvate-pool이 증진시켜 milbemycin의 생산성을 증가시킨 돌연변이를 개발할 수 있음을 예상할 수 있다.

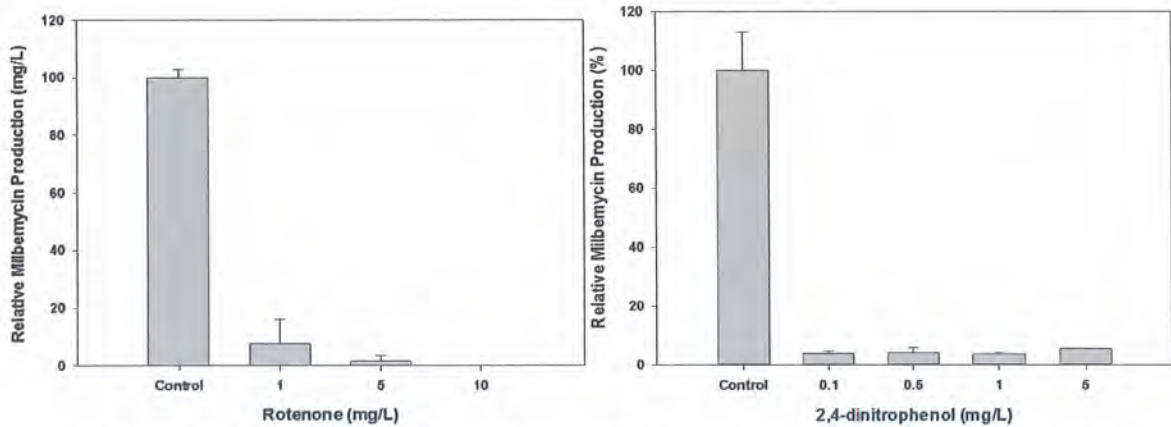


그림 116. Rotenone 및 2,4-dinitrophenol 첨가에 따른 상대적 Milbemycin 생산 비교

(5) Methyl oleate 첨가시험

Methyl oleate는 잠재적 acyl-CoA원으로써, corn oil, soybean oil, methyl oleate를 포함하는 다양한 oil의 효과를 비교 분석한 결과, methyl oleate를 *Str. clavuligerus* 배양 배지에 공급한 경우 methylmalonyl-CoA의 세포 내 농도가 12.5 배 상승하며 세포성장과 해당 균주에 의한 polyketide의 생산을 증가시키며 보고된 바 있다 (Mo et al., 2009).

본 연구에서는 methyl oleate를 비롯하여, sodium acetate, sodium malonate, 및 sodium propionate를 DBM-04 배양액에 공급함으로써 milbemycin의 생산성 향상 여부를 분석하고자 하였다. 이에 종균배양에 이은 생산배양에 들어간 뒤 5일, 7일, 및 9일에 각 전구체 solution을 배양액에 공급하여 feeding 시기에 따른 그 효과를 확인하고자 하였으며, feeding 되는 전구체의 농도에도 변화를 주어 실험을 수행다 (표 36).

표 36 공급된 CoA원 및 feeding 농도

CoA원	Feeding concentration (%)		
	Sodium acetate	0.0375	0.05
Sodium malonate dibasic monohydrate	0.15	0.2	0.25
Sodium propionate	0.15	0.2	0.25
Methyl oleate	0.148	0.3	0.443

각 전구체의 공급을 통한 균주배양 및 추출, HPLC 분석 결과 methyl oleate를 생산배양 7일 차에 0.443 % (약 15 mM)로 feeding한 경우에서 milbemycin A3, A4, D를 포함하여 총

434 mg/L의 생산량을 확인하였다. 이는 methyl oleate를 배양액에 feeding 하지 않은 대조군 대비 약 2.4 배의 생산성 증가를 나타내는 것이다 (그림 117).

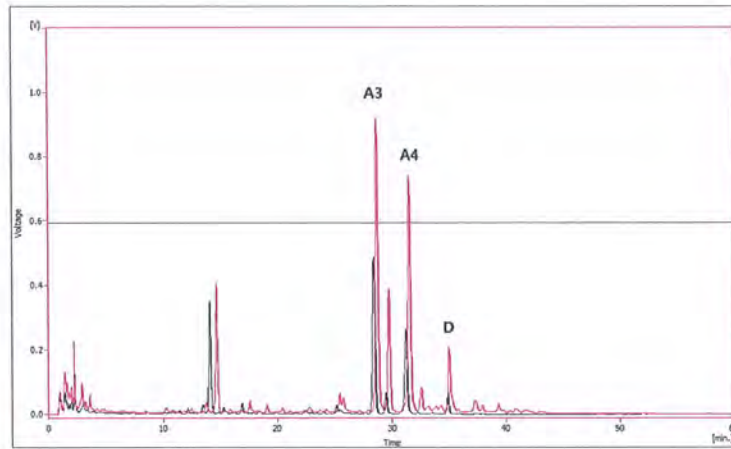


그림 117 Methyl oleate feeding 시 DBM-04 배양 추출물 (pink peak) 및 대조군 DBM-04 배양 추출물 (black peak) HPLC 분석 크로마토그램

4. Scale-up을 위한 배양조건 탐색

가. 용존 산소 영향

일반적으로 발효과정에서의 용존산소량의 유지는 대사물질의 생산성과 직결된다. 방선균의 이차대사산물 생산성 역시 용존산소량과 많은 관련이 있는 것은 알려진 사실이다. 앞서 숙주균주 및 DBM-01 균주역시 용존 산소가 20이하로 유지되는 경우 물질 생산이 극히 불량하였다. 따라서, milbemycin 생산균주를 발효함에 있어서도 교반속도를 조정하여 용존산소량을 40 이상 유지하는 경우와 균체 성장기 용존산소량이 10이하가 되는 경우를 비교하였다 (그림 118).

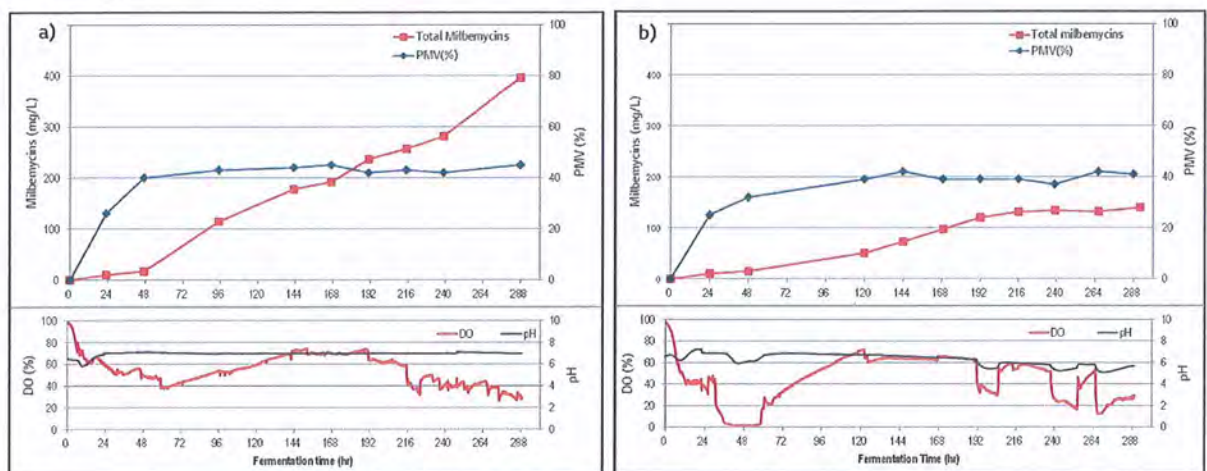


그림 118. DO 영향에 따른 DBM-04 균주의 milbemycin 생산성 영향. a) 균주 성장시 DO를 유지한 경우, b) 균주 성장시 DO 유지가 되지 않은 경우



그 결과, 용존산소량을 40이상으로 유지하는 경우에 비해 균체 성장기 용존산소량이 낮은 수준으로 유지되는 경우 milbemycin 생산성이 40% 이하로 감소함을 알 수 있었다. 따라서, 개발한 milbemycin 생산균주의 경우 2차 대사산물 생성기로 전환된 이후 산소요구도가 낮아지기 때문에 성장기까지의 용존산소 수준을 40이상으로 유지하기 위해 시작 교반속도를 280rpm으로 하고 용존산소가 50이하가 되면 교반속도를 증가시켰다. 이 경우 최대 340rpm 까지 교반속도가 증가되는 것이 관찰되었다. 48 시간 이후 더 이상의 용존산소 감소가 관찰되지 않았으며, 이후 용존산소 수준에 따라 교반속도를 감소시켰다.

나. 종균배양

방선균 발효 scale-up을 위해서는 실제 물질을 생산하는 생산단계에 이르기까지 종균배양을 통해 균체량을 늘려야 한다. 이때, Lab-scale에서 확인하였던 종균의 형태를 유지하면서 생산배양에 이르는 것이 중요하다. 따라서, 종균배양을 연속적으로 수행하여 2단계에 이르러서도 종균의 형태를 유지하면서 배양이 가능한지 확인하였다.

Milbemycin 생산성을 증가시킨 통합균주를 기준으로 사용한 종균배지 조건을 이용하여 1차 종균을 수행한 경우 1단 종균배양에서도 mild하게 clump가 형성되는 것이 관찰되었다. 이러한 경우 배양된 종균을 5L 발효를 수행하여도 flask 이상의 생산성을 보여주었다. 그러나, 이를 동일한 조성의 종균배지에 5% (v/v)으로 접종한 결과, clump가 형성된 경우 clump가 균사형태로 풀리지 않고 그대로 크기만 커지는 것을 알 수 있었다 (그림 119). 이러한 현상은 ammonium sulfate를 첨가한 경우 다소 완화 되었으나 추가의 조건 탐색을 통



그림 119 종균배양에 따른 변화 a) 1단 종균배양, b) 2단 종균배양
c) Ammonium sulfate를 첨가한 경우
해 mycelia가 유지되는 조건을 확인하였다.

우선적으로 기존 탐색하였던 종균배지를 기반으로 하여 clump 형성 여부를 확인하였다. 상기 실험에서 pellet 형성을 완화하였던 ammonium sulfate를 첨가하여 배양하였다. 그 결과 개선된 종균배지에서 기존배지와 달리 clump 형성이 억제되는 것이 관찰되었다. 이를 이용하여 동일 배지 성분으로 2단 배양을 진행한 결과 clump 형성이 억제되어 자라는 것을 확인할 수 있었다 (그림 120).

다. pH

initial pH를 7.0으로 하여 5L 배양을 실시하였다. 앞서 flask 시험에서 pH가 낮아지는 경우 부산물 생성이 심한 것을 확인하였기 때문에 flask 조건을 적용하여 부산물의 생성을 검



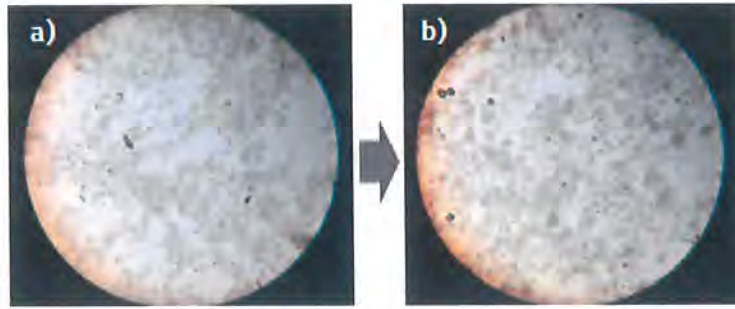


그림 120 scale-up을 위한 종균배양 A. 1단계 종균배양. B. 2단계 종균배양

도하였다. 일반적으로 DBM-04 배양조건에서 5L Jar에서의 pH는 milbemycin 생산기간 동안 6.8~ 7.0 수준으로 유지되는 것이 관찰되었으나, hCS를 탄소원으로 하여 pH control이 없는 경우 배양 pH가 감소하는 경우를 관찰할 수 있었다. 이는 hCS를 사용함으로써 탄소원의 이용도가 개선되고 이로 인해 유기산 생성이 증가되기 때문으로 사료된다. 따라서, 발효 안정성을 위해 배양 48 시간에 pH를 6.8로 조정하여 발효를 수행하였다 (그림 121).

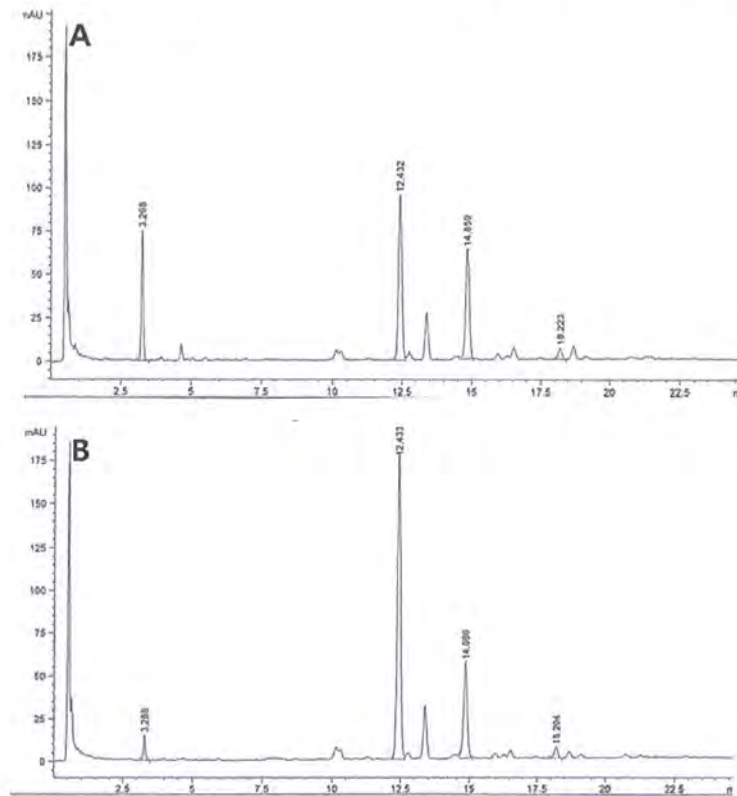


그림 121. 5L 배양시 pH 영향. A. pH control이 없는 경우, B. pH를 6.8로 control 한 경우

라. 배지 최적화 확인

개발된 통합균주를 대상으로 생산배지의 추가 개선 가능성을 확인하였다. hCS 120g/L, Soybean meal 10g/L, Skim milk 15g/L, KCl 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L, KH_2PO_4 0.5g/L 를 기준으로 Plackett-Burman 설계를 적용하여 각 요소에서 최적화 요인이 있는지 확인하



였다. KH_2PO_4 의 농도는 고정하여 적용하였다. 각 요인별 PB 설계는 다음과 같다 (표 36). 각 조건을 3반복하여 milbemycin의 생산량을 비교하였다. 그 결과, 각 요인의 농도변화에 의한 생산성 감소는 skim milk의 농도를 감소시키는 경우에서만 확인할 수 있었으며, 이때 적합한 농도인 skim milk 15g/L는 2차년도 DBM-01에 대해 확인한 바와 동일하다 (그림 122). 이하의 조건을 활용하여 통합균주를 5L 배양한 결과 total milbemycin을 1.5g/L 생산하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 84).

표 37. 요인별 최적화 개선사항 확인을 위한 PB 시험설계

	hCS	Soybean meal	Skim milk	MgSO4	KCl
1	150	7	15	0.1	2
1	150	10	10	0.2	2
1	120	10	15	0.1	4
1	150	7	15	0.2	2
1	150	10	10	0.2	4
1	150	10	15	0.1	4
1	120	10	15	0.2	2
1	120	7	15	0.2	4
1	120	7	10	0.2	4
1	150	7	10	0.1	4
1	120	10	10	0.1	2
1	120	7	10	0.1	2

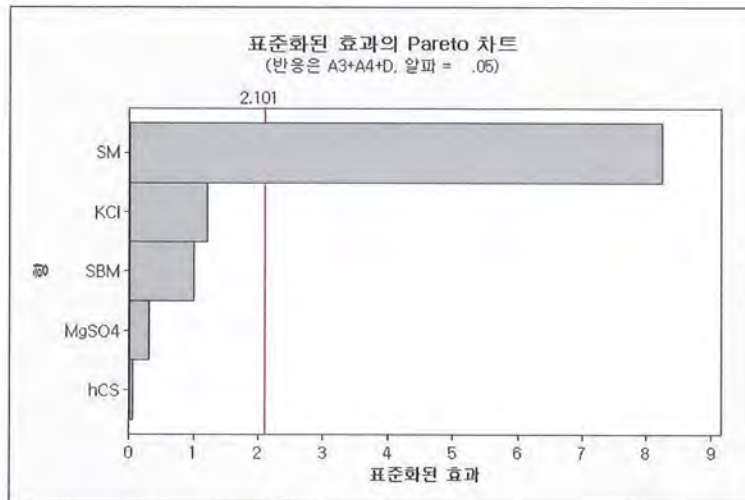


그림 122. 생산배지 요인 비교

5. 개발 균주의 5L 배양 비교

개발 균주의 생산성을 비교하기 위해 원 균주인 avermectin을 생산하는 *S. avermitilis*와 DBM-01, 최종 milbemycin 개발균주의 5L 배양 profile을 비교하였다 (그림 123). 그림에서 알 수 있듯이 avermectin 원균주의 5L의 배양의 경우 total avermectin 생산량이 2g/L으로 최근 보고되고 있는 avermectin 생산균주들에 비해 낮은 생산성을 확인할 수 있었다. milA1 유전자를 치환한 DBM-01의 경우 1.0 g/L 정도로 균주의 물질 생산성이 추가 감소한 것을 알 수 있다. 이는 milbemycin 생산균주인 DBM-04의 경우에도 관찰이 되어 0.4~0.5 g/L의

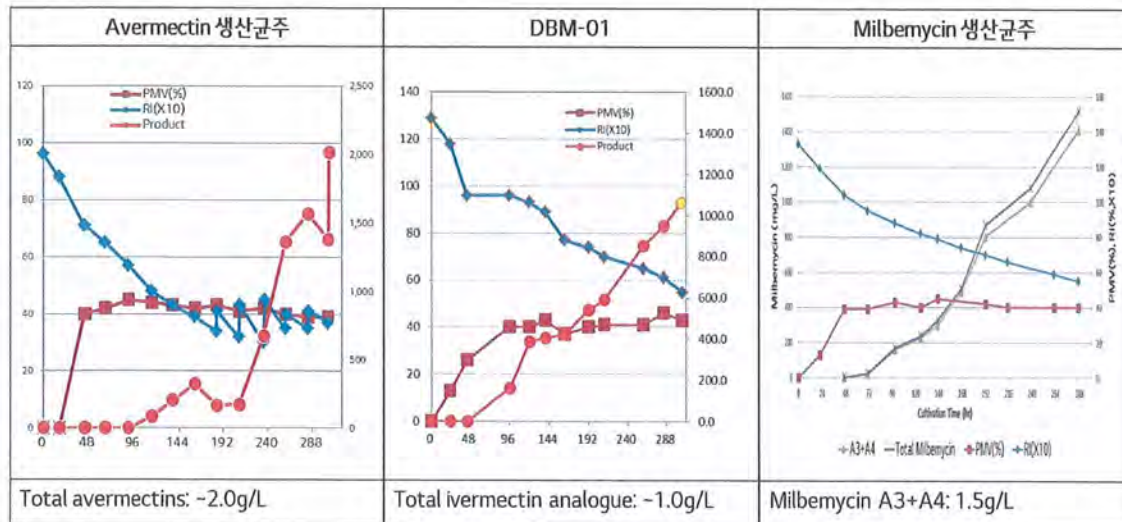


그림 123. 원균주의 avermectin 생산 profile 및 개발균주의 생산 profile 비교

milbemycin 생산성을 확인할 수 있었다. 이는 avermectin과 milbemycin의 분자량 차이를 감안하더라도 다소 낮은 수치로 생각된다. 방선균의 경우 많은 경우에 있어 유전자 재조합 과정 중 생산성이 감소하는 경향이 있으며 이를 방지하기 위해 natural selection을 통해 활성이 유지되거나 향상된 균주를 확보하는 것이 중요하다. 추가 연구개발 과정에서 natural selection을 통해 7-10 균주를 확보하였고 이후 유전자조작을 통해 milbemycin 생산균주의 생산성을 향상시킬 수 있었다.

6. 500L 발효조 배양

Scale-up 시 고려되어야 할 사항 중 하나는 교반속도이다. 특히 milbemycin 생산균주의 생산성이 용존산소에 민감하기 때문에 실험실 수준의 산소 전달속도를 유지하는 것이 중요하다. 이를 위해 5L 실험실 조건을 모사하여 scale-up에 적용하기 위해, LG 화학 중앙연구소의 도움을 받아 발효시 교반조건에 대한 simulation을 수행하여 5L jar에서의 물질전달 속도를 모사할 수 있는, scale-up 시 기준이 되는 교반속도를 확보하였다. 이를 기반으로 용존산소를 유지하고자 하였다. 대량 배양을 위해 한국생명공학연구원 정읍분원에서 50L 배양 및 500L 배양을 수행하였다.

500L 배양의 경우 working volume을 250L 로 하여 수행하였다. 이를 위해 flask에서 배양한 1단 종균배양액을 5% (v/v)으로 하여 50L 발효조에서 2단 종균배양을 수행하였다. 2단 종균배양 조건은 28도 120 rpm, 1vvm 조건으로 24시간 배양하였다. 배양 결과 최종 PMV는 11%(v/v), final pH는 5.73 이었다. 500L 발효는 전배양 단계 배양액을 5% (v/v) 접종하였다. 배양온도는 28도로 유지하였으며 aeration rate는 0.5 vvm, 내압은 0.6 kg/cm² 수준을 유지하였다. 교반속도는 160 rpm으로 시작하였으며 용존산소 level에 따라 조정하였다. 배양은 12일간 수행하였다. 그 결과, 500L 발효시 total milbemycin의 최종 농도는 1.3g/L 였다 (그림 124).

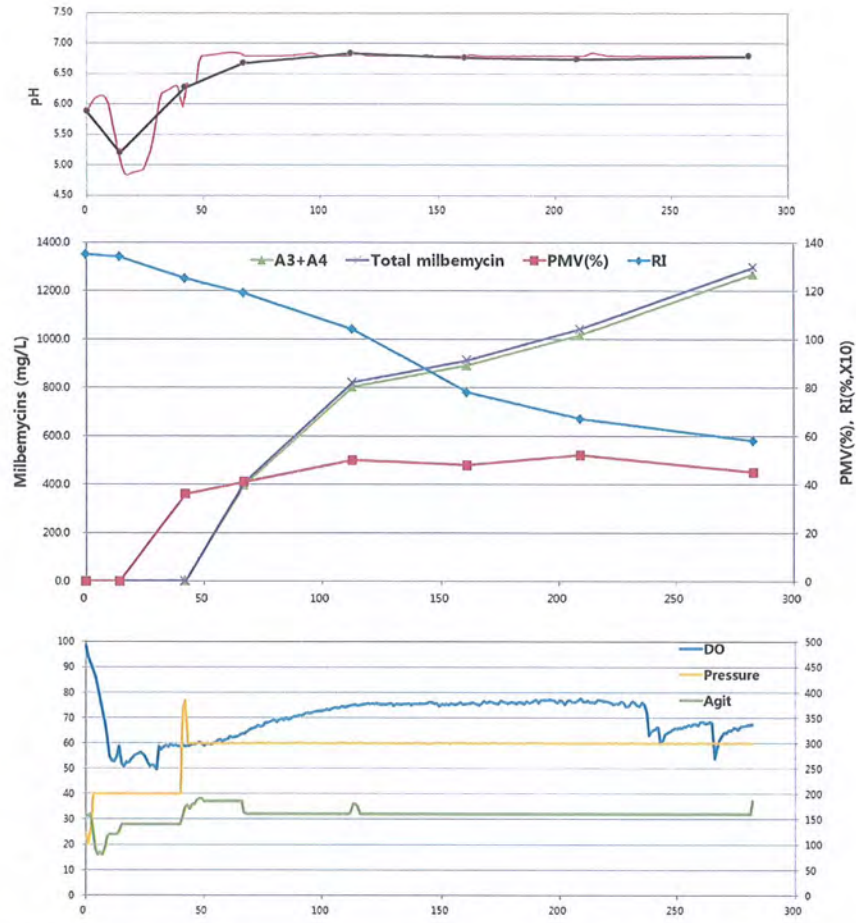


그림 124. 500L 배양 profile

회수한 milbemycin 추출액은 농축한 후 분리 정제를 수행하였다 (그림 124).

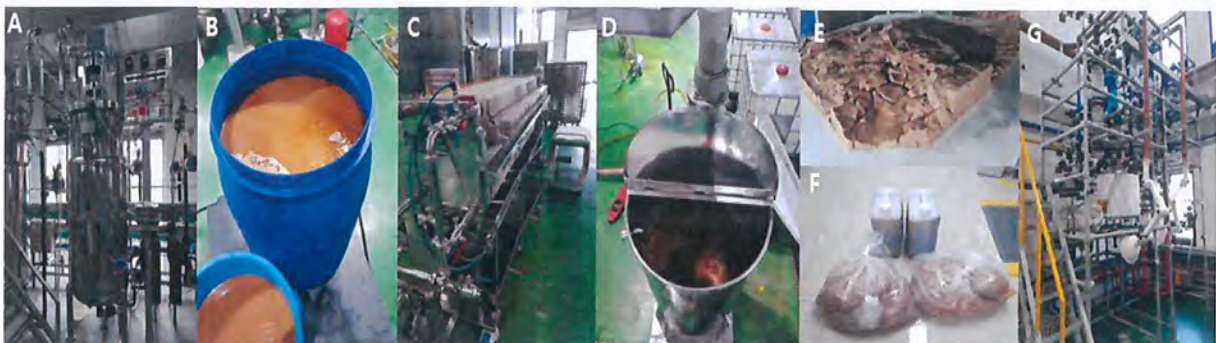


그림 125. 개발한 Milbemycin 통합균주의 500L 발효 및 추출. A. 500L 발효, B. 균체 회수, C. Filter press를 이용한 균체 회수, D. 균체 wet cake 회수 후 ethanol 추출, E. ethanol 추출 후 균체 cake, F. 추출액 및 회수 균체, G. 추출물 농축 설비



제 5 절 Milbemycin 분리 정제 최적화

1. milbemycin 의 추출

가. 추출용매의 선정

milbemycin 생산균주로부터 효과적으로 물질을 추출하기 위한 용매를 선정하기 위해 대표적인 유기용매를 선정하여 추출효율을 비교하였다. 이를 위해 milbemycin의 용해도가 높은 유기용매인 Acetone (milbemycin 용해도: 203g/L), Ethyl acetate (milbemycin 용해도: 250 g/L)과 ethanol를 선정하였음. 원심분리기를 이용하여 균체를 회수하고 상등액을 제거한 후, 균체 50g을 이용하여 균체 1g 당 3mL의 유기용매를 가하고 교반기를 이용하여 상온에서 30분 간 교반하고 추출액의 농도를 확인하였음. 추출전 균체 1g당 milbemycin 농도는 2.5 mg 정도로 100% 추출된다면 830mg/L 정도로 추정되었다. 상온에서 교반하는 동안 유기용매가 휘발되기 때문에 이를 보정하였다.

시험 결과 3개의 추출 용매 중 ethyl acetate의 추출 효율이 상대적으로 높은 것을 알 수 있었으나, 30분 추출에서 차이가 크지 않았음 (그림 126).

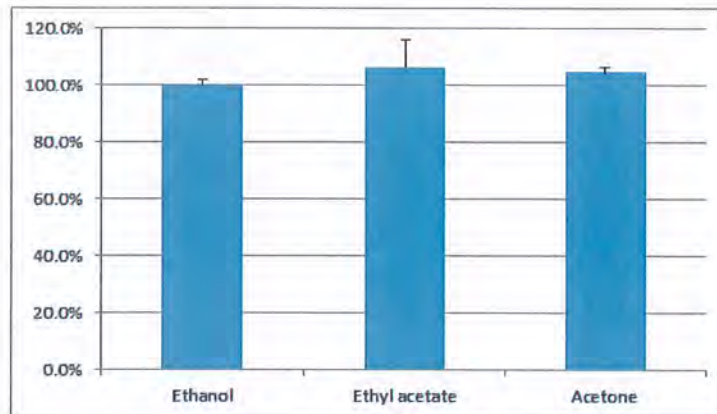


그림 126. Ethanol을 기준으로 한 용매별 추출 효율

나. 추출 시간별 milbemycin 추출

추출 시간을 결정하기 위하여 3개 용매에 대해 추출 시간별 milbemycin 추출량을 비교하였음. 상기 조건과 마찬가지로 원심분리기를 이용하여 균체를 회수하고 상등액을 제거한 후, 균체 50g을 이용하여 균체 1g 당 3mL의 유기용매를 가하고 교반기를 이용하여 상온에서 교반하고 시간별로 sampling 하여 추출액의 농도를 확인하였다. 상온에서 교반하는 동안 유기용매가 휘발되기 때문에 이를 보정하였다 (그림 127).

그림에서 알 수 있듯이, Acetone의 경우 초기 15분에 추출 농도 최고치를 보인 후 조금씩 감소하는 것을 보였으며, Ethanol의 경우는 거의 유지되지만 2시간 이후는 감소할 것으로 예상되었다. 반면 ethyl acetate의 경우 2시간까지 지속적으로 추출농도가 증가하고 있으며 최종 농도는 770mg/L 였다. 따라서, 추출 용매를 ethyl acetate로 하고 추출 시간은 2시간 이상으로 하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다. 추출 효율은 92% 로 측정되었다.



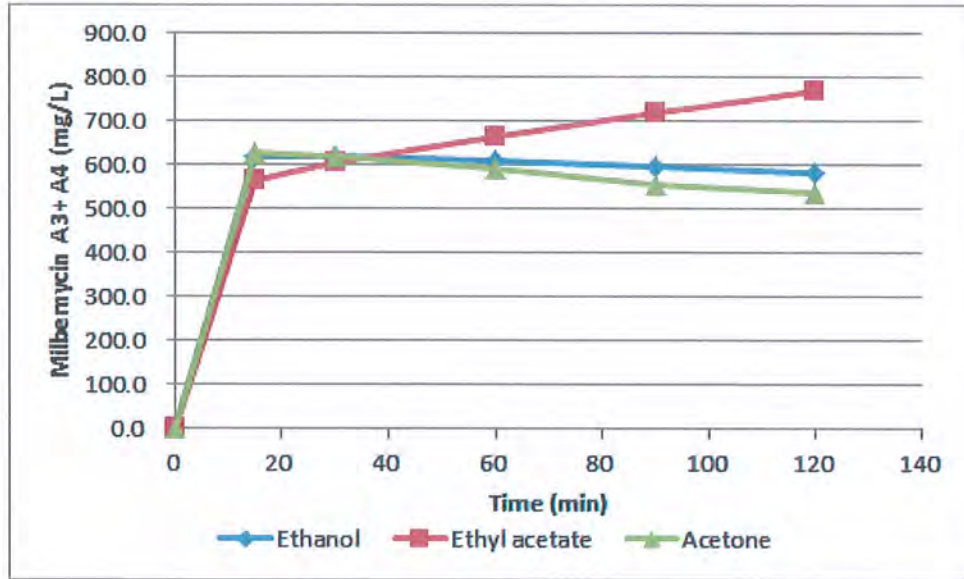


그림 127. 추출 용매별 시간 별 milbemycin 추출 효율

2. silica 충전제를 이용한 컬럼 크로마토그래피 조건

가. DBM-01 균주 대사체의 분리 조건 확립

DBM-01이 생산하는 ivermectin analogue를 분리하기 위해 SEP-PAK silica column을 활용하여 조건을 설정하였다. 30mL silica SEP-PAK column을 2 volume의 Hexane으로 activation 한 후, 대사체 2g 을 loading 한 후, hexane으로 washing 하고 Hexane: ethyl acetate를 10:1에서 1:3 까지 비율을 변화 시켜 elution 하였다. 각 fraction 별로 TLC를 이용하여 물질을 확인하였다. 그 결과 DBM-01이 생산하는 ivermectin analogue는 Hexane: ethyl acetate 1:1 일 때부터 elution 되었으며, 5-hydroxy 형태의 ivermectin analogue와 5-methoxy form의 ivermectin analogue가 분리되었다 (그림 128).



그림 128. Ivermectin analogue의 분리. IVM: Ivermectin standard, Ext: DBM-01 extract, 5-ME: 5-methoxyivermectin analogue fraction, 5-OH: 5-hydroxyivermectin anaogue fraction

Ivermectin analogue의 대량 분리를 위해 DBM-01 발효 후, 균체를 회수하였다. 회수한 균체에 ethylacetate 와 증류수를 첨가하여 대사물질을 추출한 후, 정치하여 ethylacetate 층만 회수하였다. 0.73 g/L ivermectin analogue를 함유한 ethylacetate 2.5L을 농축한 후, silica

column을 통해 물질을 분리하였다. TLC를 통해 분리되는 물질을 fraction 별로 관찰한 후, 5-methoxy 형태의 ivermectin analogue 만이 포함된 fraction과 5-hydroxy 형태의 ivermectin analogue 만이 포함된 fraction을 별도로 모아 감압 농축 후 건조하였다. 이때 전체 건조물의 중량은 1.15g 이었다. 그 결과 5-hydroxyalted 형태의 ivermectin analogue와 5-methylate 형태의 ivermectin analogue가 각각 81.3%와 92.3%의 상대순도로 분리됨을 확인하였다 (그림 129, 그림 130).

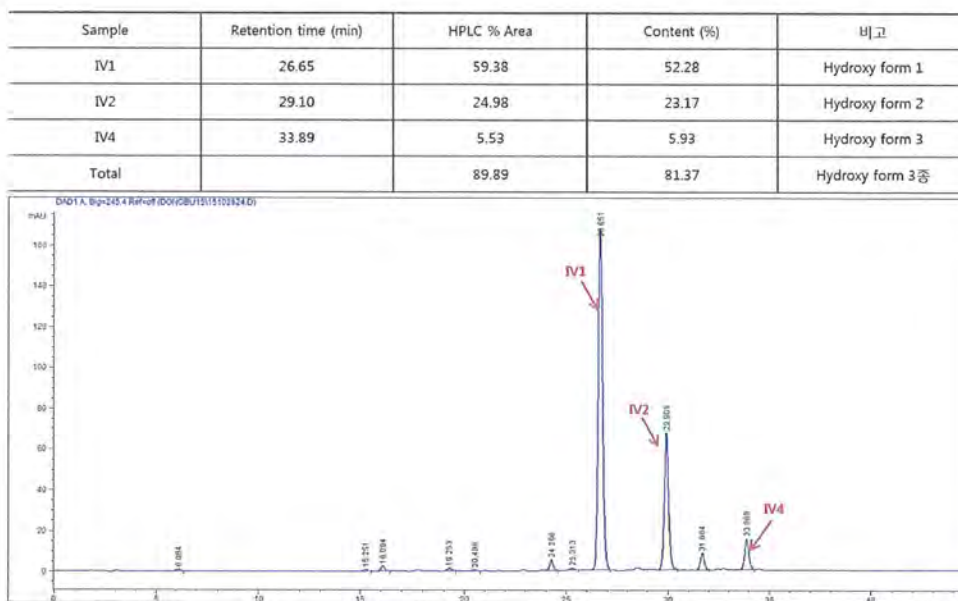


그림 129. 5-hydroxy Ivermectin analogue 혼합물 분리

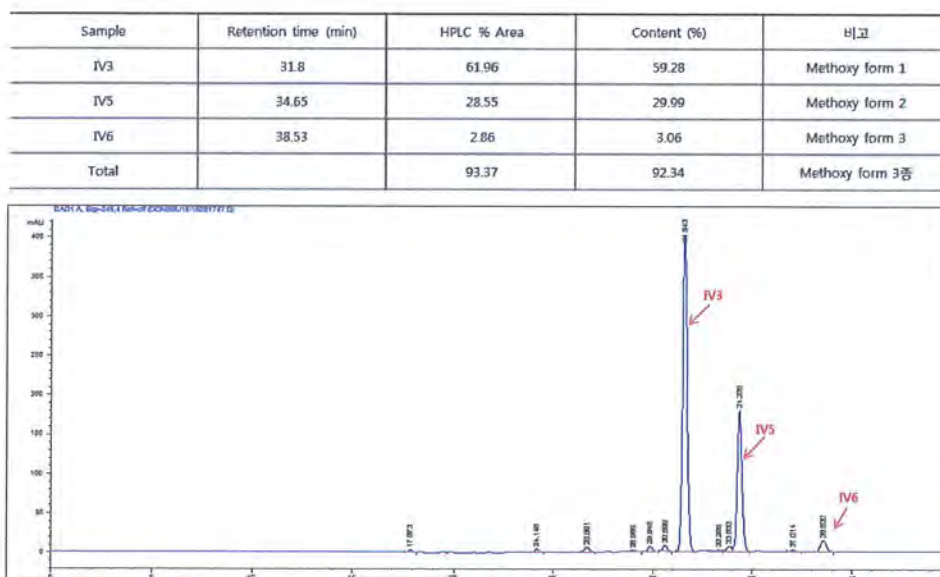


그림 130. 5-methylated 형태의 ivermectin analogue 혼합물의 분리결과

나. milbemycin 을 생산하는 DBM-04 균주 대사체의 column 분리조건 확립

30mL silica SEP-PAK column을 2 volume의 Hexane으로 activation 한 후, 대사체 2g을 loading 한 후, hexane으로 washing 하고 Hexane: ethyl acetate를 10:1에서 1:1 까지 비율을 변화 시켜 elution 하였다. 각 fraction 별로 TLC를 이용하여 물질을 확인하였다 그 결과 milbemycin은 Hexane: ethyl acetate가 5:1 인 조건에서부터 elution 되는 것이 확인 되었다. 또한, TLC 분석에서 side product 확인이 가능함을 확인하였다 (그림 131).

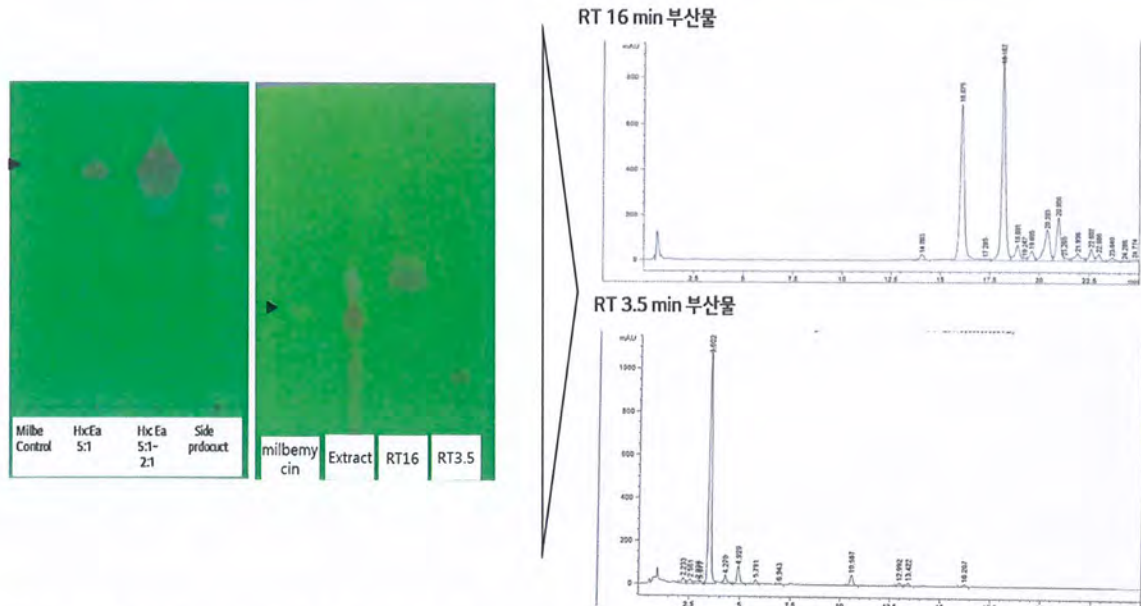


그림 131. Milbemycin 균체 추출물의 Column chromatography.

다. 2차 추출용매의 선정

DBM-01의 경우와 달리 DBM-04의 균체를 ethyl acetate 추출하는 경우 추출 효율이 우수 하였으나, 많은 양의 균체 유래 물질과 발효 부산물이 부가적으로 추출되는 것이 관찰되었다 (그림 132).

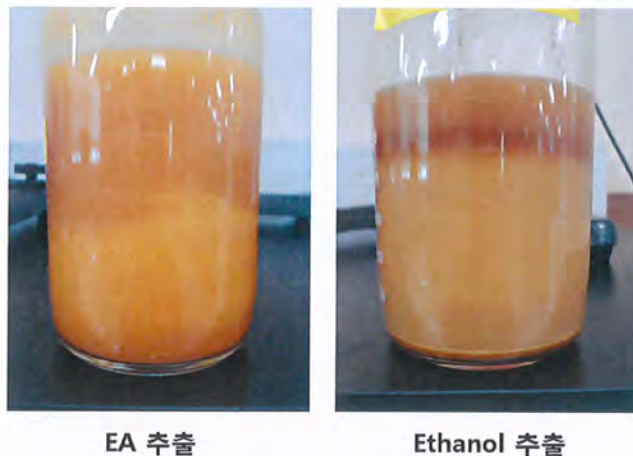


그림 132 배양액의 균체 추출물

이 경우 추출액을 농축한 후 정제 과정을 수행함에 있어 수율 및 순도를 낮추는 원인이 된다. 따라서, 농축액에서 효율적으로 균체 유래 물질을 제거하면서 milbemycin을 효율적으로 회수할 수 있는 2차 추출용매를 선정하고자 하였다. 추출 농축액에 2차 추출용매를 5 vol. 첨가한 후, vortexing을 수행한 후, 10분간 원심 분리를 통해 층분리를 진행하였다. 이후 상층액을 회수하고 상층액 내의 milbemycin 의 농도를 측정하여 회수율을 확인하였다 (그림 133, 표 38).

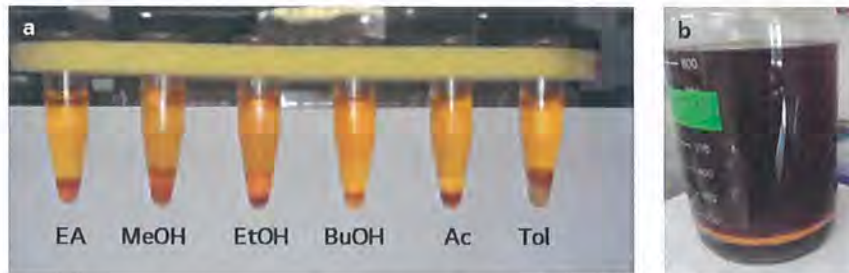


그림 133. 2차 추출 용매의 결정. a. 2차 용매별 분리능, b. toluene에 의한 2차 추출

표 38. 2차 용매별 회수율

2nd Solvent	Milbemycin 회수율(%)
Ethyl acetate	102%
Methanol	84%
Ethanol	82%
Butanol	112%
Acetone	108%
Toluene	103%

그림 및 표에서 알 수 있듯이 원심 분리를 통해 butanol을 제외한 층분리가 일어나는 것을 알 수 있으며, 특히 methanol 과 ethanol의 경우 yellow oil 이 잘 분리되는 것을 알 수 있다. Toluene의 경우 층 분리와 더불어 경계면에 세포 유래의 것으로 추정되는 침전이 형성되고 있는 것이 확인되었다. 따라서, ethanol을 1차 추출용매로 하여 yellow oil 성분을 감소시키고 toluene을 이용하여 세포 유래의 여러 불순물을 제거할 수 있을 것으로 사료되었다.

라. Silica column chromatography를 이용한 Milbemycin 의 분리 정제

5L 발효액으로부터 균체를 회수하여 ethanol을 이용하여 추출한 후 감압농축하였다. 동일 부피의 toluene을 가하여 충분히 mixing 한 후 정치하여 층분리를 유도하였다. 분리된 toluene 추출액을 농축한 후, silica column chromatography를 이용하여 물질 분리를 수행하였다. TLC를 통해 milbemycin 및 불순물을 분석한 후, milbemycin이 있는 fraction을 회수하였다. 이후 얻어진 fraction을 감압 농축하여 얻어진 건조물을 회수하여 filtration 한 후, 재 회수하여 분석한 결과 milbemycin 상대순도 94%, milbemycin A3+A4의 함량은 92% (w/w)임을 확인할 수 있었다 (그림 134).



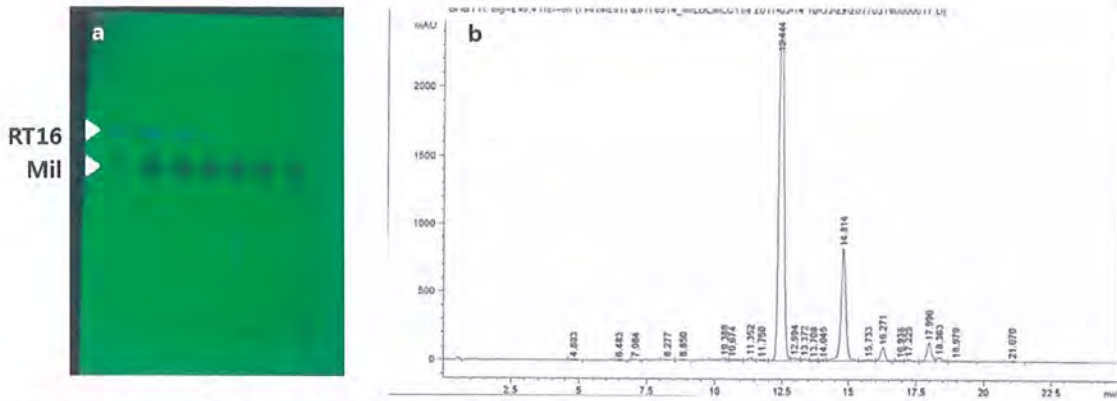


그림 134. 생산균주 배양추출액의 Silica Column Chromatography a. Fraction 별 TLC분석, b. HPLC chromatogram

3. 다단계 유기용매 추출 정제법 개발

보다 경제적인 milbemycin 정제방법을 개발하기 위해 LG 화학 중앙연구소와 공동으로 다 단계 유기용매 추출법에 기반하여 milbemycin을 분리 정제법을 개발하였다.

Milbemycin 발효액을 1차 ethanol로 추출하여 감압 농축한 후, non-polar hydrocarbon solvent를 이용하여 2차 추출용매의 screening을 수행하여 추출 효율이 높은 유기용매를 선정하였다. 선정된 non-polar hydrocarbon solvent을 이용 2차 추출을 수행한 crude extract에 silica gel을 가하고 유기용매상에서 1시간 교반 한 후, silica gel을 가하고 여과 농축하였다. alumina를 이용하여 추가의 탈색과정을 수행하였다. 수득한 milbemycin을 분석한 결과 상대순도 95%, milbemycin A3+A4의 함량은 65% (w/w)임을 확인하여 LC 분석 상 확인되지 않는 지질 등의 세포 유래 불순물이 상당수 존재함을 알 수 있었다. 지질 등을 제거하기 위하여 short silica gel column을 활용하여 추가 정제과정을 거쳐 농축된 milbemycin fraction을 iso-octane에 용해시키고 냉각하여 생성된 결정물을 회수 분석하였다. 그 결과 상대순도는 96%, milbemycin A3+A4의 함량은 74%로 다소 향상되었다 (그림 135).

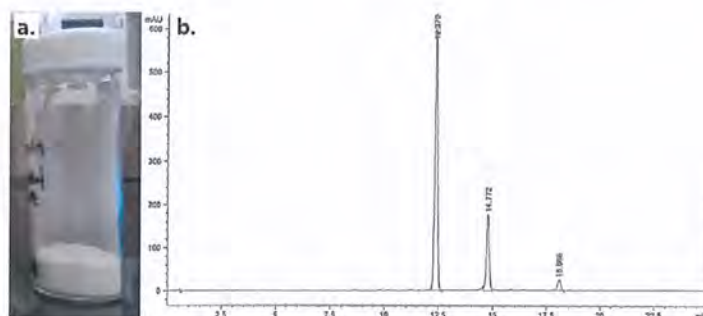


그림 135. short silica column을 이용하여 추가 정제된 milbemycin (a) 및 HPLC chromatogram (b. RT12분 milbemycin A3, RT 14.7분 milbemycin A4, RT18분 milbemycin D).

상기 조건에서 분석한 결과 함량이 크게 개선되었으나 여전히 지질 등 세포내 물질이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 앞선 시험에서 세포내 물질을 효과적으로 제거하는 것으로 확인된 toluene을 1차 추출용매로 하여 분리 정제를 수행하였다. 1.2 g/L의 milbemycin을 포함하는 Toluene 1차 추출액 1.2L를 감압 농축한 후, non-polar hydrocarbon과 alcohol을 이용하여 불순물들을 제거하고 재차 농축하였다. 이를 non-polar hydrocarbon을 활용하여 추가 추출하고 농축하고 재결정을 진행하였다 (그림 136).

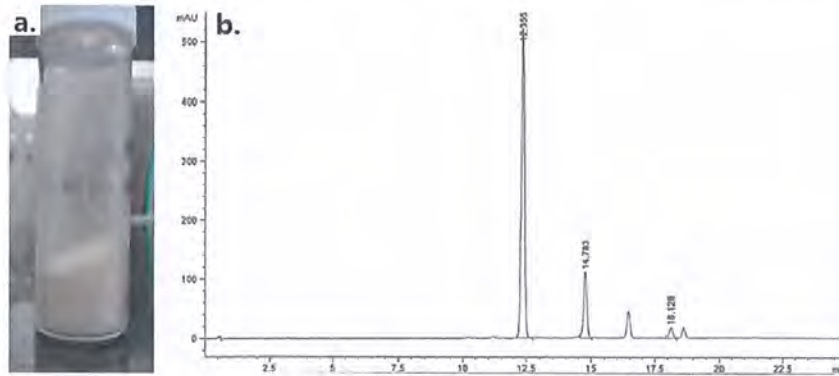


그림 136. Toluene 1차 추출물로부터 다단계 용매추출을 통한 milbemycin 의 분리정제. a. milbemycin 정제물 b. HPLC chromatogram

획득한 물질을 분석하여 상대순도 88%, 함량 70% (w/w) 임을 확인하였다. 획득한 물질은 1.2 g으로 정제 수율은 58% 였다. 재결정 후 남아있는 여액을 농축한 4g에서 7 % 함량의 milbemycin을 확인할 수 있어 재결정 조건을 개선함으로써 함량과 정제 수율을 개선할 수 있을 것으로 사료되었다. 또한, yellow oil 형태의 부산물인 RT 16분 이상의 물질이 주요한 불순물임을 알 수 있어서 이를 제거하는 효과적인 여과 과정이 필요하였다.

이를 추가로 개선하기 위해 ethanol 추출 농축액으로부터 toluene으로 2차 추출을 거쳐 milbemycin을 분리 정제하는 것으로 고려하였다. 그림에서 알 수 있듯이 toluene으로부터 얻어진 2차 추출물과 non-polar hydrocarbon이 층분리가 되었으며, milbemycin이 효과적으로 nonpolar hydrocarbon 층으로 이동함을 알 수 있었다. 이후 회수한 non-polar hydrocarbon층을 감압 농축시 이전과 동일하게 milbemycin은 powder 형태의 결정을 이루고 yellow oil이 존재하여 이를 여과하여야 함을 알 수 있었다 (그림 137). TLC 분석결과 yellow oil은 RT 16분대의 부산물로 확인되었다.



그림 137. 추출과정 개요



실험 결과를 바탕으로 0.7g/L milbemycin을 포함하는 ethanol 추출액 16L를 감압 농축한 후, 1:1 vol의 toluene을 가하여 2차 추출을 수행하고 농축하였다. 이를 non-polar hydrocarbon으로 수차례 추출하여 회수하고 이를 감압 농축하였다. 감압 농축과정에서 powder 형태의 결정물과 함께 yellow oil 이 형성됨을 알 수 있었다. 부산물인 yellow oil을 제거하기 위해 non-polar hydrocarbon으로 washing 하면서 filtration하여 8.5g 의 powder 형태의 결정물을 얻었다. 얻어진 고형물의 상대 순도 및 함량을 분석하여 상대순도 96%, milbemycin A3+A4의 함량은 95% (w/w)임을 확인하였다 (그림 138). 전체 정제 수율은 73% 였다.

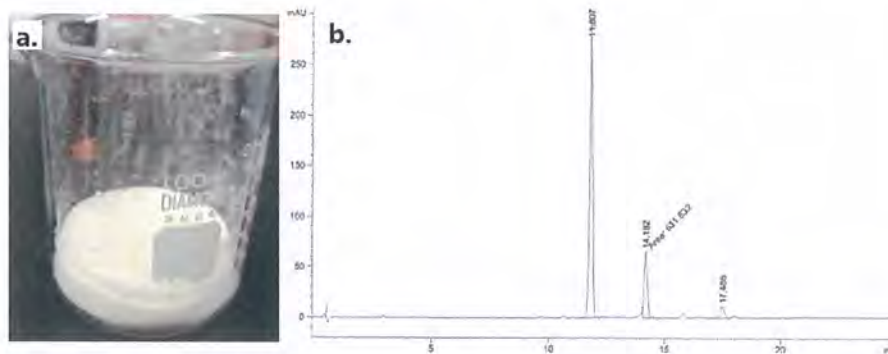


그림 138 다단계 유기용매 추출법에 의한 milbemycin 분리정제
a. 분리정제한 milbemycin, b. HPLC chromatography

또한, non-polar hydrocarbon과 alcohol로 불순물을 제거한 후, non-polar hydrocarbon 으로 추출 농축하여 생성된 powder 결정물을 추가 재결정함으로써 milbemycin 의 함량 및 상대 순도를 증가시킬 수 있었다. non-polar hydrocarbon과 polar solvent mixture를 이용하여 용해 후, 끓는점까지 가열한 후, 서서히 냉각함으로써 crystal형태의 결정물을 얻을 수 있었다. 이를 여과하여 회수한 결과 상대순도 97%, 함량 99%의 결정물임을 확인할 수 있었다 (그림 139).

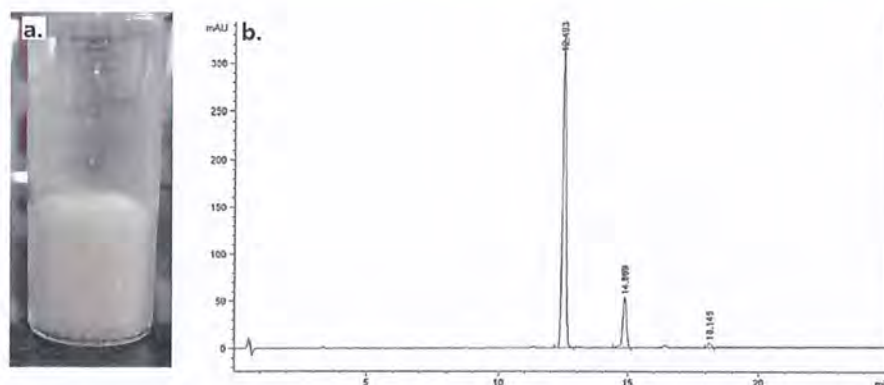


그림 139. 재결정화를 통한 milbemycin 순도 증가. a. 재결정화한 milbemycin b. 재결정화한 milbemycin의 HPLC chromatography

따라서, 다음과 같은 다단계 유기용매 추출에 의한 milbemycin 정제법을 확립할 수 있었다 (그림 140).

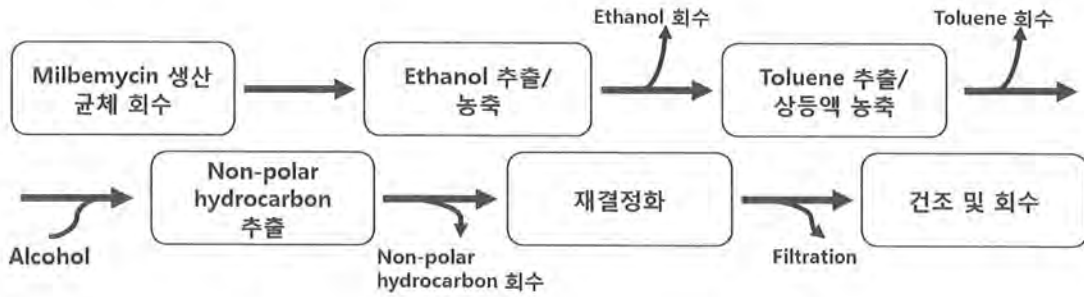


그림 140. Milbemycin 추출/정제 process의 개요

상기 정제공정은 다단계 유기용매 추출 및 재결정화를 통해 높은 정제수율 및 고순도의 milbemycin을 획득할 수 있었으며, 각 단계의 유기용매는 효과적으로 회수되어 재사용이 가능하므로 앞서 개발한 silica column chromatography 법에 비해 경제적이고 환경 친화적인 공정이다.

제 6 절 분리 정제한 milbemycin 분석

1. 분리 정제한 milbemycin 물질동질성 확인

분리 정제하여 얻어진 milbemycin에 포함되는 milbemycin A3, A4 에 대해 Bioaustralis사에서 구매한 milbemycin A3와 milbemycin A4 표준품과 비교하였다.

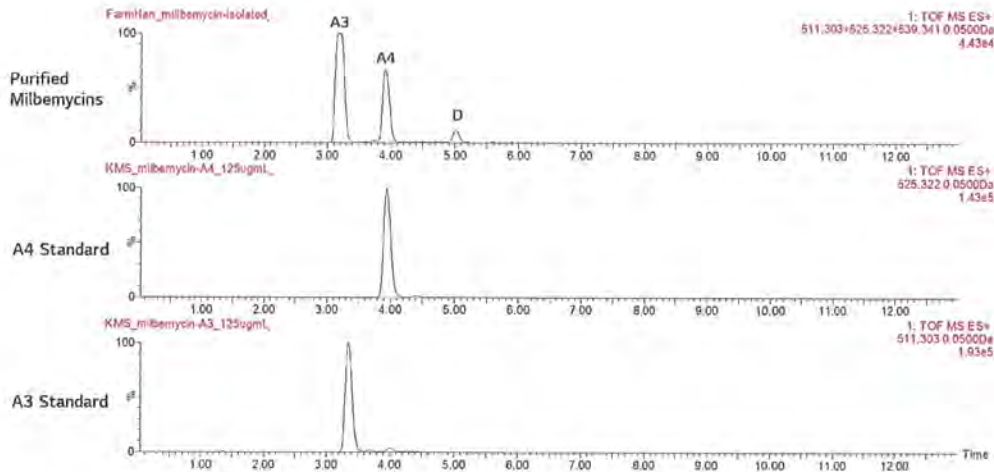


그림 141. UPLC-Q-TOF-HS-MS Chromatogram

분리 정제한 milbemycin을 UPLC-qTOF-HR-MS/MS를 이용하여 분석하였을 때 Chromatogram 상의 Retention time의 동일하고 exact 값 역시 표준품과 동일함을 알 수 있었다 (그림 141). 분리 정제한 milbemycin과 표준품의 MS/MS spectrum을 비교 하였을 때 역시 일치하는 것으로 보아 동일한 물질임을 알 수 있었다 (그림 142). 따라서, 본 연구개발



과제를 통해 확보한 milbemycin이 각각의 표준품과 동일한 것을 알 수 있었다.

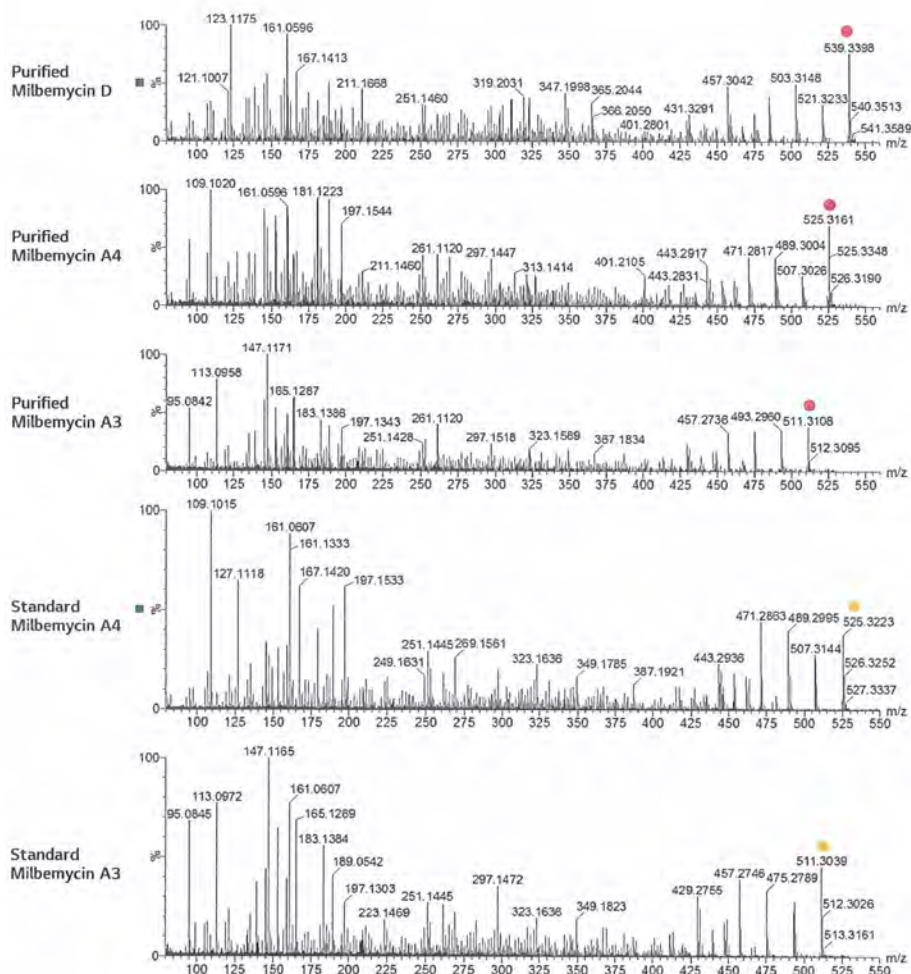


그림 142. 분리정제한 milbemycin과 표준품의 MS/MS spectrum

2. 기초 안전성 평가

분리 정제한 milbemycin 원제의 기초안전성 평가를 위해 GLP시설 인증을 받은 (주)팜한농 작물보호연구센터 안전성분석팀에 의뢰하여 분석을 진행하였다. 각각의 독성시험은 농약의 등록기준을 참고하여 실시하였다.

가. 급성경구독성

Rat를 기준으로 300mg/L 수준으로 경구투여하여 일반중독 증상 및 체중변화를 조사하였을 때 시험기간 중 전 개체 치사가 발생하여 분리 정제하여 투여한 milbemycin의 LD50는 300 mg/kg.bw 이하로 사료된다. 이는 milbemectin 원제 (485 mg/kg bw)에 비해 높은 독성을 보인 것으로 milbemycin의 조성에 기인한 것으로 보인다 (그림 143).



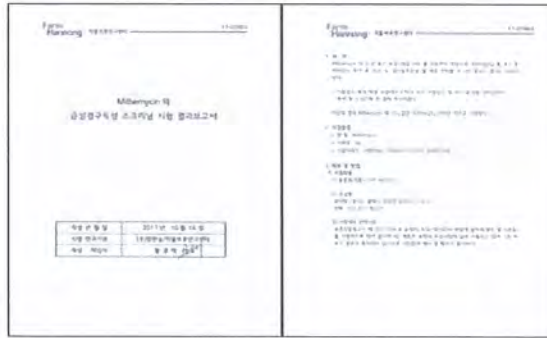


그림 143 급성경구독성 시험결과

나. 급성어류독성

송사리에 대한 급성어류독성을 확인한 결과 48시간 및 96시간 반수치사농도는 각각 0.182mg/L와 0.158 mg/L 예상되었다. 송사리에 대한 milbemectin TC의 급성독성보고는 확인할 수 없었으나, 그 외 시험어류에 대한 독성은 0.05 mg/L 이하로 보고되고 있어 어류독성이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다 (그림 144).

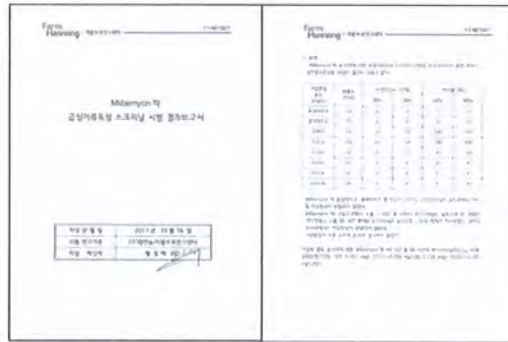


그림 144 급성어류독성 시험결과보고서

다. 급성물벼룩독성 보고서

물벼룩(Daphnia magna)에 대한 급성물벼룩독성을 확인한 결과 분리 정제한 milbemycin의 48시간 반수 영향농도는 0.0174mg/L 로 예상되었다. 이는 flow-through 법을 이용하여 확인한 milbemectin TC의 48시간 반수영양농도인 0.011mg/L에 비해 낮은 수준이다 (그림 145).

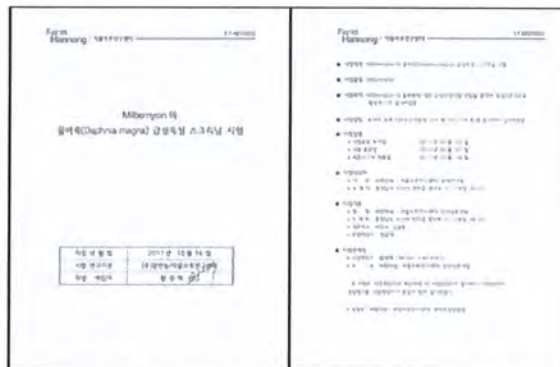


그림 145 급성물벼룩 독성 시험 결과보고서

제 7 절 시제품의 제작

분리 정제하여 얻어진 milbemycin에 대해 주관기관에서 보유한 제형의 제조법을 바탕으로 1% EC 제형으로 시제품을 제작하였다 (그림 146).



그림 146 (a) 시제품 제작 및 (b) milbemycin 1% EC 제품

제작된 1% EC 제형에 대해 Mitsui 사의 제품인 Milbeknock (milbemectin 1% EC)를 대조로 주관기관이 보유한 표준시험방법을 활용하여 점박이응에 성충에 대한 활성을 비교하였다 (그림 147). 그 결과, 제조한 시제품이 대조와 대등한 활성을 보임을 확인하였다 (표 40).



그림 147 시제품의 활성평가

표 39 시제품 (Milbemycin EC 1%)의 점박이 응에 성충에 대한 활성효과

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)		비고
				1 DAT	2 DAT	
1 무처리	-	40	3	[96]	[96]	[생충율]
2 Milbemycin 1% (EC) 시제품	10	40	3	100	100	
3 밀베노크 1%(EC)	10	40		100	100	



제 8 절 DBM-01 대사체의 활성 비교

1. DBM-01 균주의 대사체 활성 평가

DBM-01이 생산하는 ivermectin analogue 대사체에 의한 해충의 방제활성을 평가하기 위해, ethyl acetate로 추출하여 농축한 대사체 혼합물과 silica column chromatography를 이용하여 분리한 5-methoxy 형태의 ivermectin analogue 혼합물, 5-hydroxy 형태의 ivermectin analogue 혼합물 및 개별물질을 이용하여 생물활성을 평가하였다.

가. 점박이용에에 대한 방제활성 평가

상기 대사물질과 대조로 Abamectin을 이용하여 점박이용에 성충에 대한 방제활성을 평가하였음. 평가과정은 주관기관이 보유한 표준 시험방법을 활용하였으며, 약제처리 2일후 생충수를 조사하였다 (표 41).

표 40. DBM-01 균주 대사체의 점박이용에에 대한 생물효과

Trt No.	Treatment Name	Rate (ppm)	Efficiency (%) 2DAT	Appl Description
1	Check	-	[96.7]	생충률
2	DBM-01	6	100.0 ± 0.0	-
3	대사체혼합물	0.6	72.4 ± 5.8	-
4	5-methoxy 형태 Ivermectin analogue	6	100.0 ± 0.0	-
5	(IV3, IV5, IV6)	0.6	48.3 ± 10.0	-
6	5-hydroxy 형태 Ivermectin analogue	6	100.0 ± 0.0	-
7	(IV1, IV2, IV4)	0.6	93.1 ± 5.8	-
8	Abamectin	6	100.0 ± 0.0	기준량
9	(STD)	0.6	100.0 ± 0.0	1/10량

그 결과, 대조의 기준량에서는 대사체인 ivermectin analogue 활성이 100%를 보였으나, 1/10량에서는 대조 대비 낮은 활성을 보이는 것을 알 수 있었다. 또한, 5-methoxy 형태의 ivermectin analogue가 5-hydroxy 형태의 ivermectin analogue보다 활성이 낮음을 알 수 있었다.

나. 배추좀나방에 대한 방제활성 평가

상기 대사물질과 대조로 아바멕틴을 이용하여 배추좀나방 2령충에 대한 방제활성을 평가하였다. 평가과정은 팜한농이 보유한 표준 시험방법을 활용하였으며, 약제처리 1일후 생충



수를 조사하였다 (표 42).

표 41. 배추좀나방에 대한 DBM-01 대사체의 생물활성

Trt No.	Treatment Name	Rate (ppm)	Efficacy(%) 배추좀나방 1DAT	Appl Description
1	무처리	-	[100.0]	생충률
2	DBM-01 대사체	0.600	100.0	
3		0.060	100.0	
4		0.006	90 ± 10	
5		0.600	100.0	
6	5-methoxy 형태 Ivermectin analogue	0.060	100.0	
7		0.006	100 ± 0.0	
8		0.600	100.0	
9	5-hydroxy 형태 Ivermectin analogue	0.060	100.0	
10		0.006	96.7 ± 5.8	
11		0.600	100.0	
12	Abamectin	0.060	96.7 ± 5.8	
13		0.006	90.0 ± 10	

그 결과 대조인 Abamectin에 비하여 배추좀나방에 대한 ivermectin analogue의 활성이 매우 우수한 것으로 확인되었다. 따라서, 개별 물질에 대한 배추좀나방의 활성을 확인하였다. 대조물질은 Abamectin의 화학적 유도체로 나방류에 활성이 높은 Emamectin benzoate를 사용하여 비교하였다. DBM-01 대사체 혼합물, 5-methoxy ivermectin analogue 혼합물, 5-hydroxy 형태 ivermectin analogue 및 개별 분리한 Ivermectin analogue의 활성을 비교하였다 (표 43).

표 42 . Ivermectin analogue의 활성 확인

Trt No.	Treatment Name	Rate	Unit	Efficacy(%) 배추좀나방 2DAT			
1	무처리	-	-	[90.0]	생충률		
2	DBM-01대사체 혼합물	0.002	PPM	74.1	-		
3	5-methoxy 혼합물			85.2	-		
4	5-hydroxy 혼합물			88.9	-		
5	IV3			51.9	5-methoxy		
6	IV5			70.4			
7	IV6			25.9			
8	IV1			77.8	5-hydroxy		
9	IV2			81.5			
10	IV4			66.7			
11	Emamectin benzoate(STD)					74.1	



시험 결과, 배추좀나방에 대하여 5-methoxy 혼합물, 5-hydroxy 혼합물 및 IV2의 활성이 대조에 비해 높게 측정되었으며, 대사체 혼합물 및 IV1은 대등한 수준으로 보였다. 반면 5-methoxy 형태의 개별 물질의 활성은 다소 낮았다. 알려진 물질인 Ivermectin A1b의 활성이 가장 낮았으며, Ivermectin B1b의 경우 Emamectin benzoate에 비해 다소 낮지만 상당한 수준의 활성을 확인할 수 있었다. 25-methyl 형태와 25-ethyl 형태의 Ivermectin을 비교할 때, 25-ethyl 형태의 활성이 우수하였다.

다. 담배거세미 나방에 대한 DBM-01 대사체의 방제효과

DBM-01의 대사체가 배추좀나방에 대해 우수한 효과 보였기 때문에 나방류에 대한 효과가 우수한 것으로 사료되어 담배거세미 나방에 대한 생물활성을 확인하였다. 대조로서 Emamectin benzoate와 Ivermectin을 사용하고 침지 처리 후 시험충을 접종하여 접종 2일과 3일 후의 생충률을 조사하였다 (표 44).

표 43. 담배거세미 나방에 대한 DBM-01 대사물질의 생물활성

Trt No.	Treatment Name	Other Rate (ppm)	Mortality (%) 2DAT	Mortality (%) 3DAT	Appl Description
1	무처리 구	-	[100.0]	[100.0]	생충률
2	Emamectin Benzoate (STD)	1	100.0	100.0	
3	Ivermectin(STD)		26.7	26.7	
4	IV1		3.3	3.3	
5	IV2		3.3	3.3	
6	IV3		0.0	0.0	
7	IV5		3.3	3.3	

DBM-01의 대사물질의 담배 거세미나방에 대한 생물활성은 배추좀나방의 경우와 달리 낮은 것을 알 수 있었다. 따라서, 보다 효과적인 약제 개발을 위해서는 대사물질에 대한 화학적 유도체의 추가 개발이 필요할 것으로 사료된다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

1. 목표달성도

가. 최종목표 달성도

본 과제 의 최종목표는 milbemycin 고생산균주 및 대량생산공정을 개발하고 이를 기반으로 1% EC 형태의 시제품을 제작하는 것이다. 이를 위해 milbemycin 2.5 g/L 생산할 수 있는 milbemycin 고생산균주를 확보하고, 정제수율이 60% 이상인 정제공정을 확보하는 것을 세부목표로 하였으며, 분리 정제된 milbemycin의 표준품과 동질성 확인 및 기초안전성 자료를 확보하고 1% EC 제품을 제작하는 것을 목표로 하였다.

○ 최종목표 달성도

최종목표	연구세부목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	연구 개발 성과	
Milbemycin 생산균주 개발	Milbemycin 고생산균주 개발: 5L 발효시 2.5g/L	25	80	<ul style="list-style-type: none"> • Milbemycin 생산균주 제작 • 4,600여개 돌연변이 생산성 평가 • 생산성 증가를 위한 유전자 12종 평가 및 유효 유전자 형질 4종 발굴 • 돌연변이 우수 균주와 유효유전자 형질 2종의 통합균주 개발 • 통합균주 5L 발효시 1.5g/L 생산확인 	
대량생산 공정개발 및 1% EC 시제품 생산	Milbemycin 발효 scale-up : 300L 발효수행, 2.5g/L milbemycin 생산	75	20	80	<ul style="list-style-type: none"> • 실험계획법 기반 발효배지 평가 및 생산성 개선을 위한 배지첨가물 효과 검증 • DO, pH, 교반속도 등에 의한 배양 조건 최적화 진행 • 개발균주의 발효 Scale-up 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 500L 발효 수행 - 1.3g/L milbemycin 생산 확인
	Milbemycin 정제조건 최적화 : 정제수율 60% 및 순도 95%		30	100	<ul style="list-style-type: none"> • Silica column chromatography 정제공정 <ul style="list-style-type: none"> - Ivermectin analogue 정제수율: 60%, 상대순도 90% - Milbemycin 상대순도: 94%, A3+A4함량 92%(w/w) • 다단계 용매추출법 기반 정제공정 확보 :정제수율 73%, 상대순도 96%, A3+A4 함량 95% (w/w) • 재결정 조건 확보 :상대순도 97%, A3+A4함량 99% (w/w)
	Milbemycin 순수분리 및 구조분석		5	100	<ul style="list-style-type: none"> • 분리 정제한 milbemycin 개별물질의 표준품과 비교 • UPLC-qTOF-HR-MS/MS를 통해 동일 분자량 및 Mass 패턴 동일함 확인
	기초안전성 자료확보		10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 3차년도 제시한 3건의 기초안전성 자료인 급성경구독성, 급성여독성 및 급성물벼룩 독성 자료를 확보



	시제품 생산 (1% EC)	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • (주) 팜한농이 보유한 EC 제형기술 활용하여 1% EC 시제품 제작 • 기존 milbemectin 완제품과 동일한 활성 확인
	합계	100점		

나. 연차별 목표 및 달성도

연차별 목표 중 2차년도 제시한 연구전략 변경사항을 반영하여 2차년도 세부 목표에 대한 가중치를 조정하였다.

구분	세부연구목표	가중치 (%)	달성도 (%)	연구개발 수행 내용
1차 년도	Milbemycin 야생생산균주의 생산유전자 집단 분석	20	100	야생균주의 생산유전자 집단분석: 70kb 염기서열 확보
	Milbemycin 생산유전자집단 조립	20	100	Milbemycin 생산유전자 집단의 클로닝완료
	Avermectin 고생산 균주의 유전자 조작법 확립	5	100	유전자 조작을 위한 벡터 제작 및 확보 형질전환, 접합법에 의한 유전자조작법 확립
	이종균주로 이용하기 위한 avermectin고생산 숙주균주 개량	15	100	Avermectin 생합성 유전자 집단 제거 균주 제작
	Flask 수준에서의 숙주균주 발효조건 최적화	20	100	Flask 배양조건 확보: total avermectin 3 g/L
	5L 발효조에서 숙주균주 발효	10	100	5L 발효 수행, Total avermectin 2 g/L 확인
	Milbemycin 생산 확인을 위한 분석 방법 확립	10	100	• Milbemycin 및 Avermectin HPLC 분석조건 및 LC-ESI/MS 분석조건 확립
2차 년도	Milbemycin 이종생산균주 제작	20	100	<ul style="list-style-type: none"> • avermectin 고생산균주에 milbemycin 생합성유전자 milA1, milA3 순차도입 • milA1 도입에 의한 Ivermectin analogue 생산균주 제작 (DBM-01) • milA3 (module 7) 추가 도입 milbemycin 생산균주 확보 (DBM-03)
	대사공학을 통한 Milbemycin 이종 생산균주 개량	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • 전구물질 강화 유전자 3종 (acc, pcc, panK)도입 및 평가 • pathway specific 조절유전자 aveR 평가 : milbemycin 생산성 23% 증가

	생산균주 개량	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • 유도체 유발유전자 (aveD) 활성제거 (DBM-04) : 5-methoxy-milbemycin 제거확인 • 돌연변이를 통한 균주개량 : 24-well 배양 기반 스크리닝 시스템 구축 (1,100 colony/month) : UV 돌연변이 유발조건 확보 • A4 생산 강화균주 개발 : Loading module 기질특이성 변경 가능성 확인 : DEBS loading module로 치환
	5L 발효조 생산공정 최적화	20	80	<ul style="list-style-type: none"> • milA1 삽입균주 DBM-01 5L 발효 : Ivermectin analogue 생산성 ~1.0g/L • 실험계획법 기반 DBM-01 최적배지 확인 및 유효 배지성분 스크리닝 • DBM-04 발효: 0.5g/L
	Milbemycin 분리정제 공정 개발 연구 진행	20	100	<ul style="list-style-type: none"> • Ethyl acetate를 활용한 추출 조건 확보 • Ivermectin analogue에 대한 silica column chromatography 조건 확보 및 개별 물질 구조분석 (상대순도 ~90%, 정제수율 60%) • milbemycin 발효 추출물에 대한 silica column chromatography 조건 확보
	DBM-01 및 milbemycin 생산균주 생물활성 검증	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • DBM-01 대사물질의 생물활성 확인 : 대조 대비 점박이응에 방제효과는 약함 배추좀나방에 대한 활성 우수 (100%@0.06ppm) 5-hydroxy 형태 대사물질의 활성이 보다 우수
3차 년 도	Milbemycin 생산균주 개량 목표: 2.5g/L milbemycin	20	80	<ul style="list-style-type: none"> • milbemycin 생산성 증가 <ul style="list-style-type: none"> - 무작위 돌연변이 4,600 여종에 대한 스크리닝 : 7-10 균주 확보 - 조절유전자 제거/강화 5종 수행 : 유효형질 sig6 및 avaR1 확인 - 경쟁부산물 oilgomycin 제거균주 확보 • milbemycin A4 생산 강화 <ul style="list-style-type: none"> - 전구물질 강화 유전자 (prpE) 도입: 효과없음 - loading module 기질특이성 변화 추가 : milbemycin D 생산강화 • 개발형질을 통합한 균주 7-10Δsig6ΔavaR1 제작 : 모균주 DBM-04 대비 3.3배 생산성 증가 • 통합균주 생산성 검증 : milbemycin ~1.5g/L, 5L 발효
				<ul style="list-style-type: none"> • 배지 및 배양조건 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 발효부산물 생성 억제조건 확보 - 배지첨가물 효과 확인 - 산업용 배지, 종균배양 및 물리조건 확보 - 생산배지 평가 수행 - Simulation을 통한 500L 발효조건 확보

대량생산 공정 확립 및 시제품 생산	70	93	<ul style="list-style-type: none"> • 대량배양공정 Scale-up <ul style="list-style-type: none"> - 500L 발효 수행 - milbemycin 발효농도 1.3g/L 확인 • 정제조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - Silica column chromatography에 의한 milbemycin 정제공정 확보 :상대순도 94%, A3+A4 함량 92% (w/w) - 다단계 유기용매 추출법 기반 milbemycin 정제공정 확보 :정제수율 73%, 상대순도 96%, A3+A4 함량 95% (w/w) - 재결정 조건 확인: 상대순도 97%, A3+A4 함량 99% (w/w) • Milbemycin 순수분리 및 구조분석 <ul style="list-style-type: none"> - 분리정제 milbemycin 개별물질과 표준품 비교 - 분자량 및 Mass 패턴이 동일함 • 기초 안전성 자료 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 기초안전성 자료 3종 확보 • 시제품 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 1% EC 제품 제작 - 대조제품과 동등한 활성 확인
DBM-01 대사체 생물활성 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 배추좀나방에 대한 개별물질 생물활성 평가 <ul style="list-style-type: none"> : 5-hydroxy 형태 대사체 활성 우수 (>80%@0.002ppm) • 담배거세미 나방에 대한 생물활성은 저조하였음

다. 추가 성과

1) Milbemycin D 생산균주 개발

Milbemycin A4의 생산을 강화하기 위한 노력의 일환으로 milbemycin A3, A4, D의 종류를 결정하는 *milA1* loading module의 기질특이성을 변화하고자 하였다. 이를 위해 loading module의 단백질 구조를 avermectin 합성효소의 loading module 구조를 기반으로 유추하고 기질특이성을 결정하는 아미노산을 추정하였다. 상기 위치 아미노산을 변형하였을 때, milbemycin A4에 비해 milbemycin D를 주요하게 생산하는 것을 알 수 있었다. milbemycin D는 과거 동물의약품으로 개발되었으나 가격이 높아 일본의 지역에 등록되지 못하고 milbemycin oxime으로 대체되었다. 최근의 연구결과에서는 항암효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 상기 균주 및 시험결과는 국내 출원 중이다. (출원번호: 10-2017-0119833, 출원일 2017.09.18)

2. 관련분야 기여도

의약, 동물 의약품 및 작물보호제에 개발에 있어서 신규 원제에 대한 요구가 지속적으로 증대되고 있으며, 미생물 혹은 식물체 유래의 이차대사산물은 주요한 타겟 중 하나이다. 특히 새로운 구조의 물질이면서 생리활성이 뛰어나다고 하더라도 이를 대량 생산할 수 있는 기반기술을 확보하지 못한다면 산업화가 어렵다. 이때 산업화에 1차적으로 필요한 것은 고생산 균주의 확보이며 이를 기반으로 한 대량배양 및 정제기술 확보가 필수적이다.

널리 알려져 있는 것과 같이 방선균의 2차 대사물질은 의약품, 동물 의약품, 작물보호제로서 널리 사용되고 있다. 방선균의 2차 대사산물의 경우 상업화 가능한 생산성을 갖는 균주의 개발과 대량생산 공정을 확보하는 것의 사업화 성공의 주요 요인이다. 초기 자연에서 분리된 방선균이 생산하는 2차 대사산물의 경우 생산성이 매우 낮아 상업화 가능 수준의 생산성을 갖는 균주개발에 오랜 기간이 소요된다. 일례로 작물보호제로 사용되고 있는 Spinosad의 경우 유효 균주가 1982년 발견된 후 일련의 개발과정을 거쳐 작물보호제로 사업화 출시가 되는 1995년 까지 약 13년의 기간이 소요되었다. 등록기간을 감안할 때 고생산성 균주 및 대량 생산공정을 확보하는데 까지 약 10년이 소요될 것으로 사료된다. 본 연구에서 확보한 방선균 고생산균주 개발 및 대량배양 기술 적용시 이종의 2차 대사산물의 고생산 균주의 개발기간을 단축할 수 있고, 숙주균주의 배양 조건을 활용하여 배지 최적화 과정 역시 단축시킬 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장. 연구결과의 활용계획

본 연구개발과정을 통해 avermectin을 생산하는 *S. avermitilis*를 숙주균주로 활용하여 milbemycin 생산균주 개발이 가능하였다. 이를 통해 산업균주로서 널리 이용되는 숙주균주의 생산성 향상 관련 여러 연구결과를 활용할 수 있었고 공개된 배지, 배양특성을 기반으로 대량발효 조건 확보에 도움을 얻을 수 있었다. 초기 균주의 생산성이 낮아 무작위 돌연변이 스크리닝 시스템, 유효 유전자 평가 등 다양한 균주개발 과정을 수행하였으며 이를 통해 모 균주 대비 생산성이 증가한 균주를 확보할 수 있었다. 유기용매 회수가 용이한 다단계 유기용매 추출법에 기반한 milbemycin 분리정제법을 확보할 수 있었다.

1. 추가연구의 필요성

본 연구과제를 통해 확보한 핵심기술인 Milbemycin 고생산 재조합 미생물 및 대량 발효기술을 효과적으로 활용하기 위해서 추가의 경쟁력 강화를 위한 milbemycin 생산균주 개량이 필요할 것으로 사료된다. 첫째로, 제조원가 경쟁력을 강화하기 위해 개발된 milbemycin 생산균주의 추가 생산성 증대가 필요하다. 또한, milbemycin A4의 비율을 70% 이상으로 증대하여 개발된 원제의 등록을 용이하게 함으로서 제품 개발비용을 감소하는 것이 필요하다. 이를 위해 연구 개발기간동안 확보한 돌연변이 스크리닝 시스템이나 2~3차년도 연구결과에서 생산성 증가가 확인된 타겟 유전자 중 현 통합균주에 도입되지 않은 유효 형질을 적용하여 milbemycin 생산성 증가를 확인하는 것이 필요하다.

milbemycin A4의 생산 비율 증가의 경우 본 과제기간 동안의 연구가 milbemycin A4의 시작 전구물질인 propionyl-CoA에 대한 기질특이성 증가에 초점을 맞춰 진행하였으나, 기대한 효과를 얻지 못하였다. 따라서, propionyl-CoA의 세포내 농도를 증가시키기 위한 대사 경로 강화를 통해 A4의 생산비율을 증대하는 추가연구가 필요하다.

2. 타 연구에의 활용

1) Ivermectin Analogue의 활용

아바멕틴 생산균주 *Str. avermitilis*에 milbemycin 생산유전자 1번을 도입하여 제작된 DBM-01의 경우 특징적인 6개의 metabolite를 생산하였으며, 구조분석 결과 ivermectin B1b와 A1b 및 이들의 analogue로 확인되었다. 이들의 혼합물과 개별물질로 분리 정제한 물질의 경우 주요 나방류 해충인 배추좀나방에 대한 활성이 전문약제인 emamectin benzoate와 비등한 정도로 우수한 것을 확인하였다. Ivermectin analogue 중 5-hydroxy 형태는 avermectin으로부터 화학적으로 합성되어 구조가 알려진 물질이었으나 5-methoxy 형태에 비해 활성이 뛰어나다. 따라서, avermectin의 화학적 유도체인 emamectin benzoate가 나방류에 대한 전문약제로서 개발되었던 것과 같은 맥락으로서 ivermectin analogue의 화학적 유도체 개발을 통해 안전하면서 활성이 뛰어난 전문약제 개발 가능성이 있으므로, 개발가능성 및 경제성 검토를 통해 추가 개발여부 확인할 필요가 있다.

2) 기타 방선균 대사물질 연구 활용

본 과제를 통해 산업적으로 활용되고 있는 방선균에 타겟 2차 대사산물의 생합성 유전자 군을 도입하여 효과적으로 타겟 물질을 생산할 수 있음을 확인하였으며, DBM-01의 경우와 같이 PKS 합성효소의 유전자 및 module의 변환을 통해 신규 물질을 대량생산 할 수 있는 가능성을 확인하였다.

따라서, 본 연구과제를 통해 확보한 기술을 기반으로 작물보호제로 유망한 여러 방선균 유래의 대사물질을 탐색하고 확보된 타겟 대사물질의 고생산균주 및 대량생산 공정 기술 확보 기간을 단축하여 상업화 가능성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

: 해당사항 없음

제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

- 일반과제에 해당함

제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

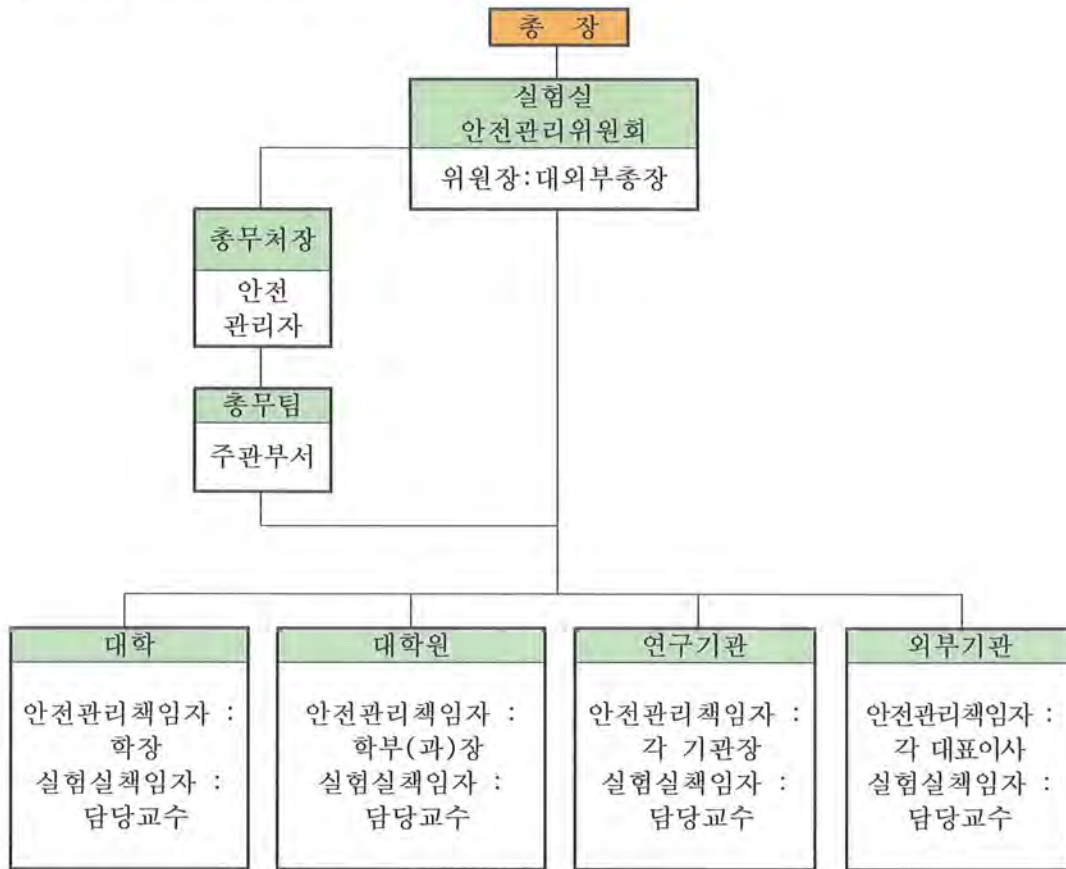
:해당사항 없음

제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>[연구실 안전환경 조성에 관한 법률] 및 [산업안전보건법]에 의하여 연구실 안전관리규정을 정하고 안전에 관한 기준을 확립하고 안전사고방지 및 최소화에 최선을 다하였음.</p>		
<p>1. 주관연구기관</p>		
<p>가. 기술적 위험요소 분석</p>		
<p>(1) 연구실 안전점검 실시</p>		
<p>(가) 일상점검</p>		
<p>① 점검자: 해당 연구실의 안전관리 담당자</p>		
<p>② 점검시기: 업무일마다 연구활동 시작 전 실시</p>		
<p>③ 연구실 이상 유무 확인 점검 및 미비사항 기록 보관</p>		
<p>(나) 정기점검과 정밀안전진단</p>		
<p>① 정기점검: 1년 1회 이상 실시</p>		
<p>② 정밀안전진단: 2년 1회 이상 실시</p>		
<p>③ 2017년 6월 정밀안전진단 실시 (외부전문기관 대한산업안전협회 대행) (문서번호 17-68680-05-0011)</p>		
<p>(2) 사전유해인자 위험분석</p>		
<p>(가) 담당자: 연구실책임자</p>		
<p>(3) 작업환경 측정: 작업장 내 유해인자 노출도 확인</p>		
<p>나. 안전관리대책</p>		
<p>(1) 연구실 안전관리규정 및 조직체계 구성</p>		
<p>(가) [연구실 안전환경 조성에 관한 법률] 및 [산업안전보건법]에 의한 안전관리규정 작성 및 게시</p>		
<p>(나) 연구실 안전관리위원회 구성</p>		
<p>① 연구실 안전점검 및 정밀안전진단의 실시계획 수립 및 실시</p>		
<p>② 연구실 사고 발생의 원인조사 및 안전관리 현황 관리 등</p>		
<p>(2) 연구 활동 종사자의 안전 교육</p>		
<p>(가) 정기교육</p>		
<p>① 교육대상: 연구활동 종사자</p>		
<p>② 교육시간: 분기별 6시간 이상 온라인 교육 실시</p>		
<p>(나) 신규교육</p>		
<p>① 교육대상: 신규 채용된 연구활동 종사자</p>		
<p>② 교육시간: 분기별 6시간 이상 실시</p>		
<p>③ 교육방법: 집체 또는 온라인 교육</p>		

2. 협동연구기관

가. 실험실 안전관리 조직도



나. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

1) 실험실 안전 점검 체계

일상점검 : 실험·실습·연구개발활동에 사용되는 기계·기구·전기·약품 등의 보관상태 및 보호장비의 관리상태 등을 육안점검하는 것으로 실험·실습·연구개발 활동을 시작하기 전에 매일 1회 실시

정기점검 : 실험·실습·연구개발활동에 사용되는 기계·기구·전기·약품 등의 보관상태 및 보호장비의 관리상태 등을 안전점검기기를 이용하여 실시하는 세부적인 점검으로서 매년 1회 이상 실시

※ 실험실을 화학약품사용, 동생물관련(LMO신고), 실험폐수발생, 고압가스사용, 기계설비사용, 조형예술분야 실험실로 분류하고, 실험실별 위험등급 설정 후 위험등급이 높은 실험실은 학기1회 이상, 그 외 실험실은 연1회 정기점검 실시

2) 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

- 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고



다. 교육 훈련

- 1) 개요 : 연구실안전환경조성에 따른 법령에 의거하여, 실험실의 안전관리에 관한 정보를 실험실 종사자에게 제공하고, 실험실 사용에 따르는 안전성 확보 및 사고예방에 필요한 교육·훈련을 실시
- 2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 등
- 3) 교육구분
 - 정기안전교육 : 학기별 1회 집합교육 혹은 온라인교육실시
 - 신입연구활동종사자 대상 안전교육
 - : 학기별 1회 대학원신입생 및 신입연구원 대상 집합교육 실시

라. 보험 가입 현황

보험명	보장내역	대상	주관부서
학교경영자배상책임보험	대인1인당1억원/1사고당5억원 대물1사고당5천만원 구내외치료비담보:1인당/1사고당1백만원 신입생OT상해담보 :사망1억원/의료비1백만원	학생 교직원	학생지원팀
연구활동종사자상해보험	상해사망:1억원 상해의료비:1천만원(실비보상)	학생	총무팀
교육시설재난공제회	건물, 취득가 5천만원 이상 고가기자재 자연재해로 발생한 건물·물품손해 및 신체 손해 전손-취득가 분손-복구비 실소요액 신체손해 치료실비	학생 교직원 연구활동 참여자	관제팀
교직원단체보험	재해사망:3천만원 재해장해/질병사망:2천만원 뇌출혈/급성심근경색증진단 :1천만원(최초1회한) 그외암진단,치료,종합입원의료비	교직원	인사팀

제10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	밀베마이신을 생산하는 제조합 미생물 및 이를 이용한 밀베마이신 생산방법	(주)팜한농/ 이화여자 대학교		대한민국 (출원번호 10-2016-012 1760)		2016.09.22 (출원일)	단독사사	PCT출원
2	특허	밀베마이신 D를 생산하는 제조합미생물 및 밀베마이신 생산방법	(주)팜한농		대한민국 (출원번호 10-2017-011 9833)		2017.09.18 (출원일)	단독사사	국내 출원
3	논문	Engineered biosynthesis of milbemycins in the avermectin high-producing strain <i>Streptomyces avermitilis</i>	이화여자 대학교/ (주)팜한농	교신 저자	Microbial Cell Factories	3.681	2017.01.17	중복사사	SCI
4	논문	Biosynthetic pathways of aminoglycosides and their engineering	이화여자 대학교	참여 저자	Current Opinion in Biotechnol- ogy	9.294	2017.12	중복사사	SCI (계재확정)
5	논문	Characterization of the Two methylation Steps Involved in the biosynthesis of myinosin in Tylosin	이화여자 대학교	참여 저자	Journal of Natural Products	3.281	2016.07	중복사사	SCI
6	논문	The biosynthetic pathway of FK50 and its engineering: from past achievements to future prospects	이화여자 대학교	참여 저자	Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology	2.810	2016.03	중복사사	SCI

제 11 장. 기타사항

: 해당사항 없음

제 12 장. 참고문헌

1. Agriservice, 2016, Phillip MacDougall
2. The cost of new agrochemical product discovery, development and registration in 1995, 2000, 2005-8 and 2010 to 2014, 2016, Phillip MacDougall
3. Takiguchi Y., Mishima H, Okuda M, Terao M, Aoki A., Fukuda R., 1980, Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. J. Antibiot (Tokyo), 33: 1120-1127.
4. Sun Y, Zhou X, Liu J. Bao K, Zhang G, Tu G, Kieser T, Deng Z. 2002 '*Streptomyces nanchangensis*' a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin contains multiple polyketide gene clusters. Microbiology 148(Pt2): 361-371.
5. Xiang WS, Wang JD, Wang XJ, Zhang J. 2007 Two new beta-class milbemycins from *Streptomyces bindchengensis*: fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 6-(10): 608-613.
6. Chen J. Liu M., Liu X, Miao J., FuC, Gao H., Müller R., Zhang Q., Zhang L., 2016, Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins., Synth. Syst. Biotechnol., 1: 7-16.
7. Gao H., Liu M., Zhou X., Liu J., Zhuo Y., Gou Z., Xu B., Zhang W., Liu X., Luo A., Zheng C., Chen X., Zhang L., 2010, Identification of avermectin-high-producing strains by high-throughput screening methods., Appl. Microbiol. Biotechnol., 85: 1219-1225.
8. Gao H., Liu M., Liu J., Dai H., Zhou X., Liu X., Zhuo Y., Zhang W., Zhang L., 2009, Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology., Bioresour. Technol., 100: 4012-4016.
9. Yin P., Wang Y.-H., Zhang S.-L., Chu J., Zhuang Y.-P., Chen N., 2008, Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations, J. Chin. Inst. Chem. Eng., 39:609-615.
10. Liang J.-G., Chu X.-H., Xiong Z.-Q., Chu J., Wang Y.-H., Zhuang Y.-P., 2011, Oxygen uptake rate regulation during cell growth phase for improving avermectin B1a batch fermentation on a pilot scale (2m³), World J. Microbiol. Biotechnol., 27:2639-2644.
11. Li M., Chen Z., Zhang X., Song Y., Wen Y., Li J., 2010., Enhancement of avermectin and ivermectin production by overexpression of the maltose ATP-binding cassette transporter in *Streptomyces avermitilis*., Bioresour. Technol., 101:9228-9235.
12. Yoon G.-S., Ko K.-H., Kang H.-W., Suh J.-W., Kim Y.-S., Ryu Y.-W., 2006, Characterization of S-adenosylmethionine synthetase from *Streptomyces avermitilis* NRRL8165 and its effect on antibiotic production. Enzyme Microb. Technol., 39:466-473.
13. Zhao X., Wang Q., Guo W., Cai Y., Wang C., Wang S., 2013, Overexpression of metK shows different effects on avermectin production in various *Streptomyces avermitilis* strains., World J. Microbiol. Biotechnol., 29:1869-1875.

14. Kitani S., Ikeda H., Sakamoto T., Noguchi S., Nihira T., 2009, Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83:1089-1096.
15. Guo J., Zhao J., Li L., Chen Z., Wen Y., Li J., 2010 The pathway-specific regulator *AveR* from *Streptomyces avermitilis* positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis, *Mol. Genet. Genomics.* 283:123-33.
16. Huang J., Yu Z., Li M.H., Wang J.D., Bai H., Zhou J., Zheng Y.G., 2016, High Level of Spinosad Production in the Heterologous Host *Saccharopolyspora erythraea*, *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 5603-5611.
17. Baltz R.H., 2010, *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37:759-772.
18. Komatsu M., Komatsu K., Koiwai H., Yamada Y., Kozono I., Izumikawa M., Hashimoto J., Takagi M., Omura S., Shin-ya K., Cane D.E., Ikeda H., 2013, engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth. Biol.*, 2: 384-396.
19. Carter G.T., Nietsche H.A., Hertz M.R., Williams D.R., Siegel M.M., Morton G.O., James J.C., Borders D.B., 1988. LL-F28249 antibiotic complex: a new family of antiparasitic macrocyclic lactones. Isolation, characterization and structures of LL-F28294 alpha, beta, gamma, lambda, *J. Antibiot(Tokyo)* 41:519-529.
20. Okada S. and S. Iwamatu, 1997, Scale up Production of Milbemycin by *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus* with Control of Internal Pressure, Temperature, Aeration and Agitation., *J. Chemical Technol.*, 70: 179-187.
21. Wang X.J., Guo S.L., Guo W.Q., Xi D., Xiang W.S., 2009. Role of *nsdA* in negative regulation of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces bingchengensis*, *J. Antibiot. (Tokyo)*. 62:309-313.
22. Zhang J., An J., Wang J.J., Yan Y.J., He H.R., Wang X.J., Xiang W.S., 2013, Genetic engineering of *Streptomyces bingchengensis* to produce milbemycins A3/A4 as main components and eliminate the biosynthesis of nanchangmycin., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 10091-10101.
23. Wang H.Y., Zhang J., Zhang Y.J., Zhang B., Liu C.X., He H.R., Wang X.J., Xiang W.S., 2014, Combined application of plasma mutagenesis and gene engineering leads to 5-oxomilbemycins A3/A4 as main components from *Streptomyces bingchengensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98:9703-9712.
24. Zhang Y, He H, Liu H, Wang H, Wang X, Xiang W., 2016, Characterization of a pathway-specific activator of milbemycin biosynthesis and improved milbemycin production by its overexpression in *Streptomyces bingchengensis*., *Microb. Cell Fact.* 15: 152.
25. Wang XJ, Yan YJ, Zhang B, An J, Wang JJ, Tian J, Jiang L, Chen YH, Huang SX, Yin M, Zhang J, Gao AL, Liu CX, Zhu ZX, Xiang WS., 2010, Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchengensis*., *J. Bacteriol.*,

192:4526-4527.

26. Chabala J.C., Mrozik H., Tolman R.L., Eskola P., Lusi A., Peterson L.H., Woods M.F., fisher M.H., Campbell W.C., Egerton J.R., Ostlind D.A., 1980, Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *J. Med Chem.*, 23:1134-1136
27. Lin H., Vadali R.V., Bennett G.N., San K.Y., 2004, Applicability of CoA/acetyl-CoA manipulation system to enhance isoamyl acetate production in *Escherichia coli.*, *Metab. Eng.* 6: 294-299
28. Mo S, Ban YH, Park JW, Yoo YJ, Yoon YJ. 2009. Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(12):1473-82.
29. Floriano B. and M. Bibb, 1996, *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)., *Mol. Microbiol.*, 21:385-396.
30. Li L., Guo J., Wen Y., Chen Z., Song Y., Li J., 2010, Overexpression of ribosome recycling factor causes increased production of avermectin in *Streptomyces avermitilis* strains., *J. Ind. Microbiol., Biotechnol.*, 37:673-679.
31. Zhuo Y., Zhang W., Chen D., Gao H., Tao J., Liu M., Gou Z., Zhou X., Ye B.C., Zhang Q., Zhang S., Zhang L.X., 2010, Reverse biological engineering of *hrdB* to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis.*, *PNAS*, 107:11250-11254.
32. Jiang L, Liu Y, Wang P, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J., 2011, Inactivation of the extracytoplasmic function sigma factor Sig6 stimulates avermectin production in *Streptomyces avermitilis.*, *Biotechnol Lett.* 33:1955-1961.
33. Wang J.B., Zhang F., Pu J.Y., Zhao J., Zhao Q.F., Tang G.L., 2014, Characterization of *AvaR1*, an autoregulator receptor that negatively controls avermectins production in a high avermectin-producing strain., *Biotechnol. Lett.* 36:813-819.
34. Chen L, Lu Y, Chen J, Zhang W, Shu D, Qin Z, Yang S, Jiang W. 2008. Characterization of a negative regulator *AveI* for avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80(2):277-86.
35. Wei X., Yunxiang L., Yinghua Z., 2006, Enhancement and selective production of oligomycin through inactivation of avermectin's starter unit in *Streptomyces avermitilis.* *Biotechnol. Lett.*, 28:911-916
36. Horswill A.R. and J.C. Escalante-Semerena, 1999, The *prpE* gene of *Salmonella typhimurium* LT2 encodes propionyl-CoA synthetase., *Microbiology*, 145:1381-1388
37. Wang F., Wang Y, Ji J., Zhou Z., Yu J., Zhu H., Su Z., Zhang L., Zheng J., 2015, Structural and Functional Analysis of the Loading Acyltransferase from Avermectin Modular Polyketide Synthase, *ACS Chem. Biol.* 10:1017-1025.
38. Khosla C. and J. E. Bailey, 1988, Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli.* *Nature*, 331:633-635