

발간등록번호

11-1541000-000478-01

생명공학 기술을 활용한 농용 항진균제
발리다마이신 생산 기술 개발 및 실용화 연구
(Biotech Development of Production System
for Agro-Fungicide Validamycin)

세부:생명공학 기법을 활용한 발리다마이신 및 그
중간체 생산 실용화 기술 개발
(Biotech Development of Production System for Validamycin and
its Intermediate)

협동1:산업적으로 유용한 발리다마이신 생산기술
(Industrial Production of Validamycin)

협동2: 대사공학을 이용한 발리다마이신 생합성 경로
조작 및 생산균주 개발
(Metabolic Engineering of Validamycin Biosynthetic Pathway and
its Application)

농림수산식품자료실



0004610

(주)씨트리

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생명공학 기술을 활용한 농용 항진균제 발리다마이신 생산 기술 개발 및 실용화 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 28 일

주관연구기관명 : (주)씨트리

총괄연구책임자 : 김 순 옥

연 구 원 :

연 구 원 :

협동연구기관명 : 명지대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 서 주 원

협동연구기관명 : 명지대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 권 형 진

요 약 문

I. 제 목

생명공학 기술을 활용한 농용 항진균제 발리다마이신 생산 기술 개발 및 실용화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

농용항생제란 가축 및 농작물의 병해를 방제해 주는 천연물질로서 주로 토양 미생물인 방선균들에서 생산된다. 천연생리활성물질의 특성으로서 일반 합성농약에 비하여 **저독성**이며, **특이성**이 높고, **속분해성 (비잔류성)** 등의 장점을 갖고 있다. 일반적으로 천연생리활성물질은 구조적으로 매우 복잡하며 경제적인 유기합성 제조법을 확립하는 것이 거의 불가능하여 미생물 발효가 그 주요 공급원 역할을 하여 오고 있다.

발리다마이신 (validamycin A)은 **벼잎집무늬마름병**의 방제에 널리 이용되고 있는 농용 항진균제로서 **1972년에 개발된 이후 현재까지 그 내성이나 약해가 보고된 바 없는 친환경 농업소재**이다. 또한 발리다마이신 생합성의 중간체인 발리엔아민 (valienamine)은 당뇨병 치료제인 보글리보즈 (상품명: 베이슨)생산의 원재료로 사용된다. 현재 보글리보즈의 생산은 발리엔아민을 시발물질로한 유기합성으로 이루어진다. 발리엔아민의 경우 발리다마이신을 가수분해 하여 얻을 수 있다.

현재 국내 발리다마이신 수요는 100 ton에 이르고 있으나 전량 중국으로부터 수입하고 있는 실정이다. 중국의 값싼 노동력으로 인하여 국내의 많은 미생물 발효 산업이 경쟁력을 이미 소실한 것이 사실이며, 발리다마이신 균주의 경우 산업 균주의 생산성은 이미 그 포화치를 달성하여 고전적인 균주 개량 방법으로 산업 경쟁력을 확보한다는 것은 불가능한 실정이다. 이는 미생물 발효 산업 분야의 전반적인 실정이라 보아야 하겠다. 현재 미생물 발효 산업 분야에 새로운 동기를 제시하여 국가 경쟁력 증진에 기여할 수 있는 방안이 유전 공학 및 대사공학 분야라 할 수 있으며 유전 공학 기술을 활용하여 고전적인 균주 개량 기법의 한계를 극복하려는 연구가 많은 국내 연구진에 의하여 이루어지고 있음을 주지하여야 할 것이다.

본 연구진은 세계 최초로 발리다마이신 생합성 유전자군을 분리, 동정하는 성과를 거두었으며 이에 그치지 않고 그 생합성 유전자군의 기능을 실증하는 데에 성공하였다. 발리다마이신 생합성 연구에 있어서 세계 최고 연구팀임을 자부하는 바이다. 본 연구진이 축적된 연구 성과들을 적절히 활용하여 실용화 연구를 진행한다면 **미생물 공학 및 친환경 농업소재 개발 분야의 새로운 성장 동력을** 제시할 수 있을 것으로 기대된다. 장기적인 측면에서는 효소공학을 통하여 새로운 당뇨병 치료제의 개발을 기대할 수 있으며, 단기적으로는 발리다마이신 및 발리엔아민의 대량 생산 발효주를 개발하여 경쟁력있는 생산 단가를 제공한다면 빠른 시일 내에 산업화를 달성할 수 있을 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제에서는 생명 공학 기법을 활용하여 농업 소재인 발리다마이신과 관련 중간체의 산업적 생산 시스템을 구축하고자 한다. 발라다마이신은 벼의 잎집무늬마름병 방제를 위한 농용 항진균제로서 널리 사용되고 있을 뿐 아니라 발리다마이신을 생물학적으로 분해하여 얻어지는 발리엔아민은 당뇨병 치료제인 보글리보즈 (상품명: 베이슨)생산의 원재료로 사용되고 있는 산업적 가치가 매우 우수한 천연 생리활성물질이다. 본 연구팀은 국내 독자 기술로서 **세계적 수준의 발리다마이신 고생산 균주를 개발하여 발리다마이신의 실용화를 달성하고, 이를 기반으로 고가 의약품인 보글리보즈를 생산하는 국내 독자 공정을 수립하고자 한다.**

Ⅳ. 연구개발결과 및 성과

본 연구과제 수행을 통하여 **발리다마이신 고생산 산업 균주**를 개발하였다. 해당 균주는 성공적인 대량발효공정을 통해 초기 연구개발 최종목표(5g/L)를 초과달성하여 발리다마이신을 8g/L 수준까지 생산할 수 있다. 이와 같은 경제적 발리다마이신 생산 기술을 바탕으로 참여 기업체는 **발리다마이신의 산 가수분해를 통하여 발리엔아민을 생산하는 공정**을 수립하였다.

발리다마이신은 활용성이 높은 항진균 천연물 농약이다. 따라서 본 연구팀이 확보한 발리다마이신 생산 기술을 산업화하여 대량 생산하고 상품화하여 농업 현장에 적용이 가능하도록 하고자 한다. 이러한 노력의 일환으로 양평군 농업기술센터, 새아침 영농법인과 **기술실시협약을 체결**하여 발리다마이신 생산 균주를 이용한 **친환경 작물 보호제 실용화** 연구를 추진하고 있으며, (주) 동부하이텍과도 공동 연구를 통한 실용화 추진에 관한 협약을 체결한 바 있다.

본 연구과제 수행을 통하여 친환경 생물공정 기술 개발을 위한 유전자 재조합 연구로 다수의 신기술을 확보하였다. 이는 발리다마이신 생합성 유전자를 활용하여 발리다마이신을 분해하여 고가 의약품 원료인 발리엔아민을 생산하는 균주 개발과 발리엔아민 자체를 생산하는 균주의 개발을 포함한다. 또한 발리다마이신 생합성 유전자를 타 산업 균주에 도입할 수 있는 기술의 수립 및 기존에 밝혀지지 않은 새로운 발리다마이신 생합성 유전자원의 확보 등이 해당 연구의 성과일 것이다. 본 과제의 성공적인 수행 결과로 개발된 친환경 기술들은 여러 정부기관, 농민단체, 기업 등의 주목과 관심을 받아 기술이전 계약 및 협약이 완료되고 앞으로 농업현장에서 많은 이용이 기대되고 있다. 또한 향후 지속적인 유전자원 활용 연구가 기반 기술의 실용화를 촉진할 수 있을 것이라 기대된다.

Ⅴ. 연구성과의 활용 계획

발리다마이신 (validamycin A)은 벼잎집무늬마름병의 방제에 널리 이용되고 있는 농용 항진균제로서 1972년에 개발된 이후 현재까지 그 내성이나 약해가 보고된 바 없는 저독성 농업소재이다. 명확히 말해 발리다마이신은 pro-drug으로서 곰팡이 세포 내에서 β -glycosidase에 의하여 발리독실아민 (validoxylamine A)로 전환된 후 trehalase의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 측면에서 해충의 활동성을 저해하는 효과가 있음도 확인된 바 있다. 따라서 **정책적으로 발리다마이신과 같은 친환경 천연물 농약의 활용 범위를 증가시킨다면 발리다마이신 수요를 충족시키는 과정에서 국내 발효 산업의 확대를 도모할 수**

있어 녹색 성장의 좋은 예가 될 수 있을 것으로 기대된다. 기실 발리다마이신 생산을 비롯한 많은 미생물 발효 산업의 경우, 국내 산업 기반이 근래 극적으로 약화된 것이 사실이다. 이는 중국과의 경쟁에서 사업 타당성을 확보할 수 없었기 때문이다. 발리다마이신 경우만 해도 국내 수요 (약 100억 원/년) 전량을 수입에 의존하고 있다. 그러나 최근 중국도 환경규제를 국가적으로 대폭 강화하고 있는 상황이기 때문에 가격이 급격히 오르고 있으며, 세계 경제의 흐름은 수입에 의존하는 산업 구조의 취약성을 직시할 수 있도록 한다. 이제 수입, 수출에 의존하는 산업 구조의 취약성을 극복하기 위하여서는 내수 비율을 확대하는 것이 필요할 것이며, 이러한 맥락에서 수입 대체를 위한 국내 발효 산업의 재도약이 절실히 요구되는 시점이라 할 수 있다.

본 연구진이 독자 기술로서 개발한 발리다마이신 고생산 균주는 연구개발 최종목표치인 5g/L를 초과달성하여 세계적 수준의 생산능력 (8g/L)을 갖춘 균주로서 발리다마이신의 국내 독자 제품 생산의 기반은 이미 마련되었다고 할 수 있다. 본 연구진은 후속 연구에서 발리다마이신 정제비용을 절감하고 (사실, 정제 비용이 거래되는 원제 가격의 60%이상 차지) 국내에서 발효생산하여 바로 미생물 농약으로 이용함으로써 농민들이 부담하는 추가비용을 줄일 수 있는 신개념 실용화 방안을 추진할 것이며, 이를 바탕으로 국내 발효 산업의 재도약과 녹색성장의 새로운 모티프 제시를 달성하기 위한 정책적 배려가 필요할 것이다. 구체적인 활용 계획은 다음과 같다.

1. 성공적인 연구개발 결과로, 초과 달성된 해당 고생산 균주(8g/L) 및 발효공정 기술을 경기도 양평군 농업기술센터에 이전하여 농가에 생균제제로 살포하는 실용화 실험을 진행 중이며, 향후 5년간 농민에게 혜택을 주는 목적으로 무상으로 실시하는 협약서를 체결하였다.
2. 1년간 동부하이텍과 “발리다마이신에이 생산균주 및 작물 보호제로 미생물 평가시험” 을 건설 중인 15만평 친환경 유리온실에서 실행할 계약을 체결하였다.
3. 경상북도 상주시 공검면 새아침 영농법인과 5년간 “발리다마이신 생산 균주를 이용한 친환경 작물 보호제” 실시 협약서를 체결하였다. 정액실시료는 본 연구가 국가연구비로 지원되어 농민 및 농업법인에게 혜택을 주도록 한 목적을 달성하기 위하여 자체적으로 생산하여 사용하는 것은 무상으로 하였다. 단, 사업화여 판매가 되면 매출액의 5%를 경상실시료로 납부하는 것으로 계약되었다.

발리다마이신 생합성 중간체인 발리엔아민은 당뇨병 치료제인 보글리보즈 (상품명: 베이슨)생산의 원재료로 사용된다. 주관 기업은 본 연구과제에서 생산된 발리다마이신을 활용하여 발리엔아민을 제조하고 이를 시발물질로 보글리보즈 시제품을 생산할 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

Validamycin complex, validamycin A as the main component, is produced by *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*. Validamycin A is an effective control agent against *Basidiomycetes*, particularly *Rhizoctonia solani* that causes sheath blight disease in rice, potatoes, vegetables, and others as well as damping off disease in vegetable seedlings, cotton, sugar beets, rice, and other plants and the potency is mainly attributed to its trehalase inhibitory effect. Valienamine is a component of validamycin and it serves as the starting material to produce voglibose, the anti-diabetic drug.

We have engineered the validamycin biosynthetic gene cluster to develop environment friendly green biotechnology in producing valienamine and validoxyamide. In terms of platform technology, we develop a system to introduce the validamycin biosynthetic genes into industrial microbe as demonstrated with *Micromonospora echinospora*, the gentamicin producer.

To establish the technology, which is relevant to commercialization, the validamycin high producer was generated through the classic strain development method. The strain gives 8 g/L of validamycin. We are in progress in commercializing the high-producer strain as a biocontrol agent for crop protection. With the economical production system of validamycin in hand, valienamine production process was set up with acid hydrolysis of validamycin.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview.....	
Chapter 2. Current Status and Technical Development.....	
Chapter 3. Methods and Results.....	
1. Development of Valienamine Production System and its Application.....	
1-1. Production of Valienamine through Acid-Hydrolysis of Validamycin.....	
1-2. Production of Valienamine through Microbial Degradation of Validamycin.....	
1-3. Production of α -Glucosidase Inhibitory Activity by Using Validamycin Biosynthetic Genes.....	
1-3-1. Production of α -Glucosidase Inhibitory Activity by Using Validamycin Biosynthetic Genes of <i>vldADF</i>	
1-3-2. Production of α -Glucosidase Inhibitory Activity through Heterologous Expression of Validamycin Biosynthetic Genes.....	
2. Development of Validamycin High-Producer and its Application.....	
2-1. Expression of Validamycin Biosynthetic Gene in <i>E. coli</i>	
2-2. Introduction to Development of Validamycin High-Producer.....	
2-3. Development of Validamycin High-Producer.....	
3. Functional Characterization of Validamycin Biosynthetic Genes and its Application to Produce Intermediates of Validamycin.....	
3-1. Development of <i>Streptomyces lividans</i> Producing Validamycin and its Intermediates.....	
3-2. Production in Valienamine by Using <i>Streptomyces lividans</i> transformed with <i>vldFG</i>	
3-3. Expression of Validamycin Biosynthetic Genes in <i>Micromonospora echinospora</i>	
3-4. Functional Characterization of Glycosyltransferase in Validamycin Biosynthesis.....	
3-5. Development of the Strain Producing Validoxylamine.....	
3-6. Confirmation of the Role of <i>vldC</i> , Glucokinase Gene, in Validamycin Biosynthesis.....	
3-7. Isolation of New Validamycin Biosynthetic Genes.....	
3-7-1. Isolation of Validamycin Biosynthetic Genes from <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/ 3-1.....	
3-7-2. <i>Streptomyces</i> -Expression of Validamycin Biosynthetic Genes from <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/ 3-1.....	
3-8. Validamycin Biosynthetic Pathway.....	

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	
1.	발리엔아민의 생산 공정 개발 및 활용.....	
1-1.	발리다마이신의 산 가수분해를 통한 발리엔아민 생산 공정 개발.....	
1-2.	발리다마이신 분해 균주를 이용한 발리엔아민 생산 공정 개발.....	
1-3.	발리다마이신 생합성 유전자를 활용한 α -glucosidase 저해활성생산.....	
1-3-1.	발리다마이신 생합성 유전자 <i>vldADF</i> 의 이중발현을 통한 α -glucosidase 저해활성생산.....	
1-3-2.	발리다마이신 생합성 유전자군의 이중발현을 통한 새로운 α -glucosidase 저해활성생산.....	
2.	발리다마이신 대량 생산 균주 개발 및 그 활용.....	
2-1.	발리다마이신 생산을 위한 대장균 발현 시스템 구축.....	
2-2.	발리다마이신 고생산 균주 개발 개요.....	
2-3.	발리다마이신 고생산 균주 선발.....	
3.	발리다마이신 생합성 유전자원 기능 규명 및 발굴과 이를 활용한 중간체 생산 기술 개발.....	
3-1.	발리다마이신 및 중간체를 생산하는 <i>Streptomyces lividans</i> 균주 수립.....	
3-2.	<i>vldE/vldG</i> 로 형질전환된 <i>Streptomyces lividans</i> 균주를 활용한 발리엔아민 생산 기술.....	
3-3.	<i>Micromonospora echinospora</i> 에서 발리다마이신 생합성 유전자 발현.....	
3-4.	발리다마이신 생합성 유전자 특성 규명 및 당전이 기작 규명.....	
3-5.	발리독실아민 생산 균주 개발.....	
3-6.	발리다마이신 생합성 유전자 상의 <i>vldC</i> , <i>glucokinase</i> 유전자의 기능 확인.....	
3-7.	발리다마이신 유전자원 발굴.....	
3-7-1.	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/ 3-1로부터 발리다마이신 생합성 유전자원 분리.....	
3-7-2.	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/ 3-1유래 발리다마이신 생합성 유전자원의 <i>Streptomyces</i> 이중 발현.....	
3-8.	발리다마이신 생합성 경로 수립.....	

제 1 장 연구개발과제의 개요

* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

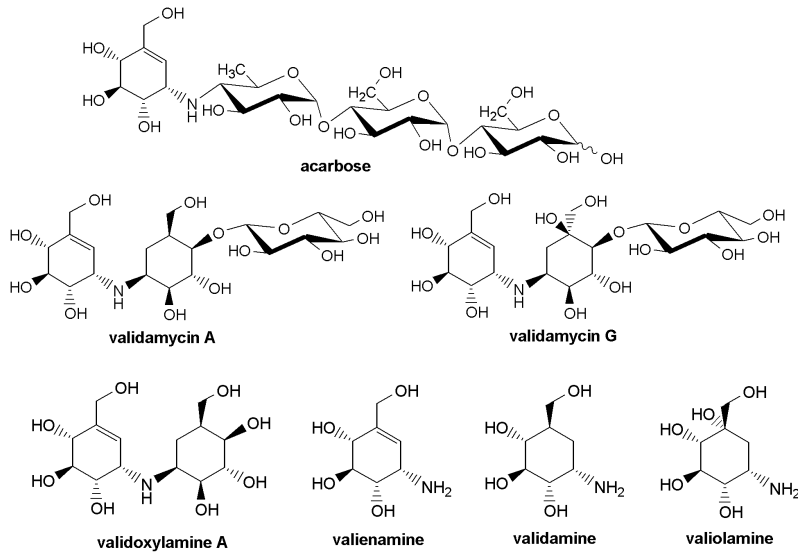
우리나라의 연간 농약 소비량이 7,100억원 (1997년 농림 통계), 세계의 농약 소비량은 250억불 (1995년 UN통계)에 달하고 있지만 병충해에 의한 농작물 생산량 손실은 총 생산량의 30%에 달한다. 농약 사용에 의한 직접 손실 외에 인명피해 및 자연 생태계 파괴 등 간접 피해는 농약 사용량의 2-4배에 달할 것으로 추정된다. 이를 보완하기 위하여 **환경 친화적인 농업 소재 개발연구가 활발히 이루어지고 있다.**

친환경 농법이란 농업의 지속적 발전을 지향하여 현재 세대의 후생을 극대화하면서도 미래 세대의 후생을 감소시키지 않은 발전을 의미한다. 이러한 의미에서 지속적 농법은 화학비료 및 농약의 사용 절감을 통하여 환경의 생산 능력을 지속적으로 유지하는 방안으로도 접근할 수 있으나 현실적으로 비료 나 농약의 사용을 줄이면서 그 생산량을 유지하는 것은 불가능한 일이라 할 수 있다. 따라서 가장 합리적인 대안이 환경친화적인 비료, 농약 소재의 개발이며, 이의 구체적인 실천 방안 중 하나가 **친환경 천연물 농약**을 개발하는 것이다.

농용항생제란 가축 및 농작물의 병해를 방제해 주는 천연물질로서 주로 토양 미생물인 방선균들에서 생산된다. 천연생리활성물질의 특성으로서 일반 합성농약에 비하여 **저독성**이며, **특이성**이 높고, **속분해성 (비잔류성)** 등의 장점을 갖고 있다. 일반적으로 천연생리활성물질은 구조적으로 매우 복잡하며 경제적인 유기합성 제조법을 확립하는 것이 거의 불가능하여 미생물 발효가 그 주요 공급원 역할을 하여 오고 있다.

발리다마이신 (validamycin A)은 **벼잎집무늬마름병**의 방제에 널리 이용되고 있는 농용 항진균제로서 1972년에 개발된 이후 현재까지 그 내성이나 약해가 보고된 바 없는 친환경 농업소재이다. 명확히 말해 validamycin A는 pro-drug으로서 곰팡이 세포 내에서 β -glycosidase에 의하여 validoxylamine A로 전환된 후 trehalase의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 발리다마이신 생합성의 중간체인 발리엔아민 (valienamine)은 당뇨병 치료제인 보글리보즈 (상품명: 베이슨)생산의 원재료로 사용된다. 이는 valienamine이 갖고 있는 고유 활성인 α -D-glucosidase 저해활성을 유기합성으로 개선하여 혈당 공급을 제어하는 당뇨병 치료제로 개발한 것이다. 현재 보글리보즈의 생산은 발리엔아민을 시발물질로한 유기합성으로 이루어진다. 발리엔아민의 경우 발리다마이신 생산균주인 *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* 균주에서도 분리하거나 유기합성을 통하여 확보할 수 있다. 또한 발리다마이신 (validamycin A)을 가수소분해 (hydrogenolysis)하거나 발리독실아민 (validoxylamine A)을 N-bromosuccinimide (NBS) 처리로 분해하여 얻을 수 있다. 그러나 가장 경제적인 방법은 발리다마이신 (validamycin A)을 미생물을 이용하여 생분해하는 것으로서 *Pseudomonas denitroficans* 나 *Flavobacterium saccharophilum* 균주 발효를 이용하여 분해하는 방법이 발리엔아민을 실질적인 산업 공정이다.

발리다마이신 이외에도 발리엔아민 구조를 갖는 천연생리활성물질들은 역시 당뇨병 치료제인 아카보즈 (acarbose), 아디포신 (adisposin), 살보스타틴 (salbostatin), 파이랄로미신 (pyralomicin) 등이 있다. 여타 화합물들이 하나의 발리엔아민 구조를 보유한 반면 발리다마이신은 발리엔아민과 발리다민 (발리엔아민 이중 결합이 환원된 형태)이 질소 원소를 매개로 하여 연결된 이당체 구조를 갖는 고유의 구조적 특성을 갖고 있다 (그림 참조).



발리엔아민을 포함하는 활성물질 중 그 상업적 중요성에 따라 아카보즈와 발리다마이신의 생합성 연구가 이루어졌다. 본 연구진이 독자적으로 완성한 발리다마이신 생합성 유전자 연구는 이러한 측면에서 주목할 만한 연구업적이라 할 수 있겠다. 아카보즈의 경우 발리엔아민 구조를 포함하고 있음에도 불구하고 발리엔아민은 생합성 중간체가 아님이 확인되었다. 따라서 생합성 측면에서 발리엔아민을 생산할 수 있는 능력은 발리다마이신 생합성 경로의 고유 잠재력이라 할 수 있다. 이와 같은 맥락에서 *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* 에서 발리다마이신 및 관련 중간체 (발리엔아민 포함)의 생합성 기작을 이해하는 것은 산업적 응용 측면에서 매우 가치 있는 과제라 할 수 있다.

본 연구진은 세계 최초로 발리다마이신 생합성 유전자군을 분리, 동정하는 성과를 거두었으며 이에 그치지 않고 그 생합성 유전자군의 기능을 실증하는 데에 성공하였다. 발리다마이신 생합성 연구에 있어서 세계 최고 연구팀임을 자부하는 바이다. 본 연구진이 축적된 연구 성과들을 적절히 활용하여 실용화 연구를 진행한다면 **미생물 공학 및 친환경 농업소재 개발 분야의 새로운 성장 동력을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.** 장기적인 측면에서는 효소공학을 통하여 새로운 당뇨병 치료제의 개발을 기대할 수 있으며, 단기적으로는 발리다마이신 및 발리엔아민의 대량 생산 발효주를 개발하여 경쟁력있는 생산 단가를 제공한다면 빠른 시일 내에 산업화를 달성할 수 있을 것으로 기대된다.

미생물 유전체 정보 증대와 그 해석기술의 발달에 기반하여 제시되는 신개념의 미생물 공학 전략이 대사공학이다. 이는 중요 천연활성물질의 생산성 증대를 달성하는데 대사 조절인자에 대한 유전체 정보를 활용하는 것을 포함한다. 그러나 유전자원에 대한 정보는 기하급수적으로 증가하는 반면 이를 활용하여 대사공학 균주를 개발한 실례는 아직 부족한 상태이다. 이에 대한 주된 이유는 대사공학에 있어서의 유전자원의 활용이 대상 효소 기작의 생물 화학적 이해를 선제 조건으로 함이 간과되고 또한 대상 균주에 대한 유전자 조작 체계를 확립하지 못하는 데에 있다고 할 수 있다. 따라서 산업화 대상 균주의 유전자 조작 기법 확립, 대상 천연활성물질 생합성의 효소 화학적 이해가 대사 공학의 기반성 및 핵심성을 확립하는 방안이라 할 수 있다. 본 과제는 이러한 기반 기술을 이미 확보하였다. 발리다마이신 생산 균주에 대한 유전자 조작 체계를 확립하였으며, 그 생합성 유전자 및 효소 연구를 통하여 발리다마이신 생합성 경로 정보를 독자적으로 확보하였다. 또한 이중발현 기술을 통하여 균주 개량 및 발효 조건 최적화 달성이 가능한 균주에서 대상 활성물질을 생산하는 기술을 확보하고 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

발리다마이신 (validamycin A)은 벼잎집무늬마름병의 방제에 널리 이용되고 있는 농용 항진균제로서 1972년에 개발된 이후 현재까지 그 내성이나 약해가 보고된 바 없는 저독성 농업소재이다. 명확히 말해 발리다마이신은 pro-drug으로서 곰팡이 세포 내에서 β -glycosidase에 의하여 발리독실아민 (validoxylamine A)로 전환된 후 trehalase의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 측면에서 해충의 활동성을 저해하는 효과가 있음도 확인된 바 있다. 따라서 정책적으로 발리다마이신과 같은 친환경 천연물 농약의 활용 범위를 증가시킨다면 발리다마이신 수요를 충족시키는 과정에서 국내 발효 산업의 확대를 도모할 수 있어 녹색 성장의 좋은 예가 될 수 있을 것으로 기대된다. 기실 발리다마이신 생산을 비롯한 많은 미생물 발효 산업의 경우, 국내 산업 기반이 근래 극적으로 약화된 것이 사실이다. 이는 중국과의 경쟁에서 사업 타당성을 확보할 수 없었기 때문이다. 발리다마이신 경우만 해도 국내 수요 (약 100억 원/년) 전량을 수입에 의존하고 있다. 그러나 최근 세계 경제의 흐름은 수입에 의존하는 산업 구조의 취약성을 직시할 수 있도록 한다. 이제 수입, 수출에 의존하는 산업 구조의 취약성을 극복하기 위하여서는 내수 비율을 확대하는 것이 필요할 것이며, 이러한 맥락에서 수입 대체를 위한 국내 발효 산업의 재도약이 절실히 요구되는 시점이라 할 수 있다.

보글리보스의 β -glycosidase 저해 활성 (glucoamylase, sucrase 등에 대한 경쟁적 가역적 저해 활성)은 이당류의 분해를 저해하여 소장 내의 당 소화, 흡수를 지연하는 효과를 보이는 생리활성 물질이며, 이를 통하여 혈당치 상승을 억제하는 효과를 나타낸다. 이와 같은 작용 기전에 기인하여 보글리보스는 1994년 일본에서 제2형 당뇨병 치료제로 허가를 취득하였다 (Takeda 사의 Basen). 보글리보스는 전분 섭취를 주적으로 하는 동양인에게 보다 효과적인 작용 기전을 보유하는 것으로 인식되어지고 있다. 2004년 JP-1611546 특허가 만료되어 generic 제품의 출시가 가능하게 되었으며, 이에 즈음하여 다수의 국외 소규모 제약 기업들이 보글리보스 생산 기술을 개발, generic 제품을 출시하였다. 국내의 경우 보글리보스를 원료로 하는 당뇨치료제의 국내 시장은 약 300억원으로 추정되며, 보글리보스의 주원료인 발리엔아민을 생산하여 일본에 수출하는 방식으로 기술 개발이 이루어진 바 있다. 발리엔아민의 생산 공정은 발리다마이신 또는 아카보즈를 가수분해하여 기술이 일반적이며, 국내 제약 기업들도 이에 대한 국내 특허를 취득하고 있다. 본 과제의 주관 기업인 주식회사 씨트리네는 아카보즈의 가수분해를 통하여 발리엔아민을 생산하는 기술의 기술 특허를 취득하고 있으며 (대한민국 특허등록 10-0593849), 본 과제는 통하여 발리다마이신의 가수분해를 통한 발리엔아민 생산 기술을 수립하였다. 또한 해당 기업은 발리엔아민 유도체인 발리올아민으로부터 보글리보스를 제조하는 화학 공정 기술 또한 수립하고 있다 (대한민국 특허등록 10-0740458).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

1. 발리엔아민의 생산 공정 개발 및 활용

본 연구진은 1, 2차년도 연구를 통하여 생물학적 기법으로서 발리엔아민을 생산하는 기술을 수립하였다. 이는 **친환경 생물공정**에서 기반 기술 수립에 그 의의가 있다 하겠다. 반면 경제적인 측면에 있어서는 기존의 화학 공정이 실용화 적합성이 높음을 확인할 수 있었다. 본 연구진은 산업균주 개발을 통하여 **발리다마이신의 경제적 생산 기술을 확보**하였으므로, 기존의 화학 공정으로 발리엔아민 생산의 실용화를 추진하였다. 그러한 맥락에서 실용화 기술이 산 가수분해를 먼저 소개하고, 친환경 생물공정을 후에 소개하고자 한다.

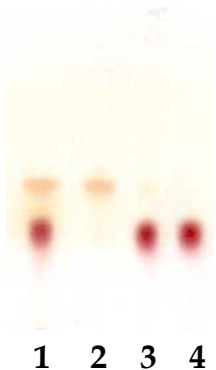
1-1. 발리다마이신의 산 가수분해를 통한 발리엔아민 생산 공정 개발

본 연구진은 아카보즈를 염기 가수분해하여 발리엔아민을 생산하는 공정에 대하여 국내 특허를 취득한 바 있다. 이러한 기술을 기반으로 TFA를 활용한 산 가수분해를 수행하여 발리엔아민의 생산 기술 수립을 진행하였으며, 이때 아카보즈와 발리다마이신을 동시에 시도하였다.

1. 아카보즈 10g, 최종농도 5%/10% TFA, 100°C 12hr
- 2.02g valienamine
2. 아카보즈 10g, 최종농도 5%/10% TFA, 121°C 1hr
- 2.1g valienamine
3. 발리다마이신 10g, 최종농도 2%/45% TFA, 100°C 12hr
- 2.4g valienamine + 4.5g pseudosugar
4. 발리다마이신 10g, 최종농도 3%/45% TFA, 121°C 1hr
- 2.6g valienamine + 4.8g pseudosugar

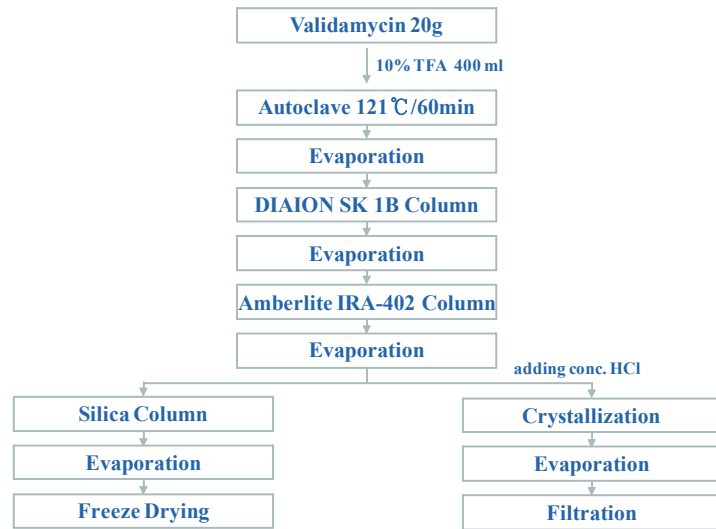
이상의 시도를 통하여 발리다마이신을 TFA 처리로 가수 분해하였을 시에 아카보즈에서와 유사한 수율의 발리엔아민을 얻을 수 있었다. 발리다마이신 산 가수분해 후 발리엔아민의 정제를 위하여서는 이온 수지를 활용하였으며, 그 실시예는 다음과 같다.

- 1: Dowex 50W 정제
- 2: Dowex 1 fraction (뒷부분 농축)
- 3: Dowex 1 fraction (앞부분 농축)
- 4: Valienamine control

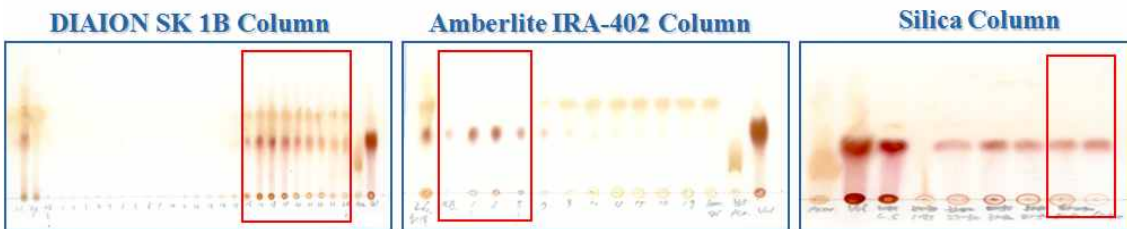


이 후 발리엔아민의 생산 공정을 수립하였으며, 이를 도식화 하면 다음과 같다.

Flow chart of purification of valienamine from validamycin A

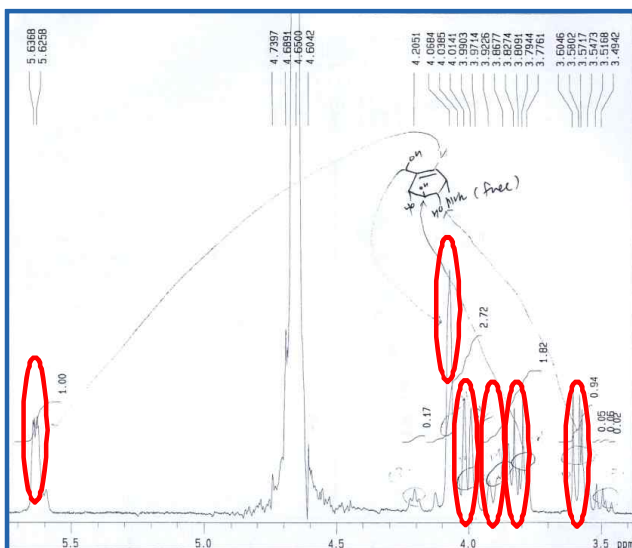


다음은 위의 공정에 따라 발리엔아민을 분리한 실시예를 보여준다.

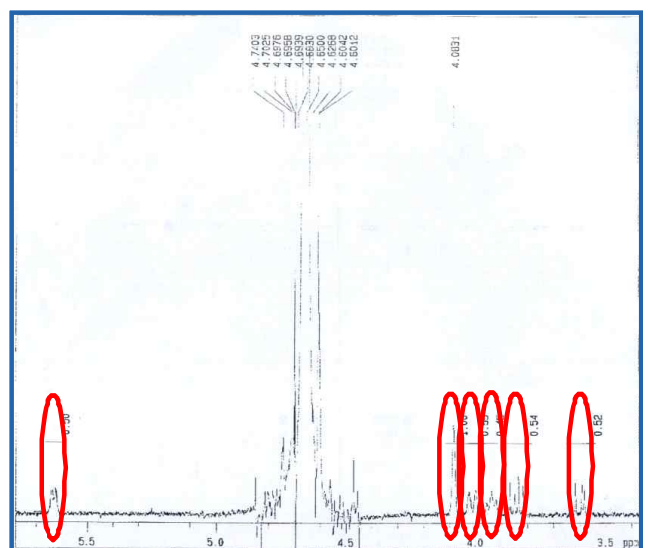


수립된 공정을 통하여 얻어진 발리엔아민은 proton NMR 분석을 통하여 순수 분리를 확인하였다.

Positive control valienamine



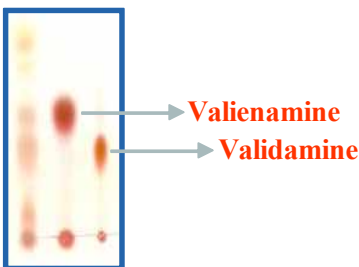
C-TRI valienamine



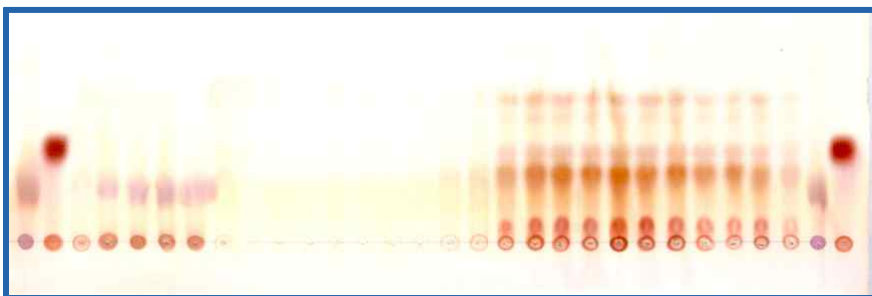
1-2. 발리다마이신 분해 균주를 이용한 발리엔아민 생산 공정 개발

발리다마이신 생합성 유전자를 활용한 재조합 균주에서 발리엔아민을 생산하는 연구는 그 경제성의 한계에 직면 하였으며, 이에 대한 대안으로서 기업의 생산 시스템 구축을 위한 공정 수립 연구를 진행하였다. 즉, 학문적인 성취도 보다는 실용적 공정 수립과 사업화 달성으로 주관 기업의 연구 방향을 전환하였다. 발리엔아민 함유하는 천연물질들을 *Pseudomonas denitrificans*와 같은 미생물 배양체에 투여하였을 시에 생분해를 유도하여 발리엔아민을 생산할 수 있음은 학문적으로 이미 1970년부터 보고된 사실이다. 본 과제에서는 제 1 협동과제에서 산업적으로 경제성을 확보한 고생산 균주의 창출에 성공하였음을 바탕으로 하여 발리다마이신을 분해하여 발리엔아민을 확보하고 이를 활용하여 보글리보즈를 생산하는 공정 수립 R&D를 진행하고 실질적인 보글리보즈 매출과 연계하기로 하였다. 2 차년도에는 일차적인 공정 수립으로서 환경 친화적인 생분해 공정 수립 연구를 시도하였다.

발리다마이신의 생분해를 위하여 *Achromobacter xylosoxidans denitrificans* (1322), *Aeromonas hydrophila anaerogenes* (1653), *Flavobacterium saccharophilum* (8520), *Rhizobium sp.* (4718) 균주들을 구입 확보하였다. 이들 균주의 배양체에 발리다마이신을 1% 투여한 후 발리엔아민의 생성을 조사하였다. 이들 균주를 활용하여 발리다마이신의 생분해 및 발리엔아민의 생성을 추적한 결과 이미 이와 같은 역할이 1980년도에 보고된 바 있는 *Flavobacterium saccharophilum*이 가장 효율적 생분해 공정을 제공함을 확인할 수 있었다. *Flavobacterium saccharophilum* 배양체를 활용하여 얻어진 조추출물을 TLC를 통하여 분석한 결과는 다음과 같다.



얻어진 발리엔아민을 분리하기 위하여 Dianion SK 1B (H^+) column chromatography를 진행하였다.

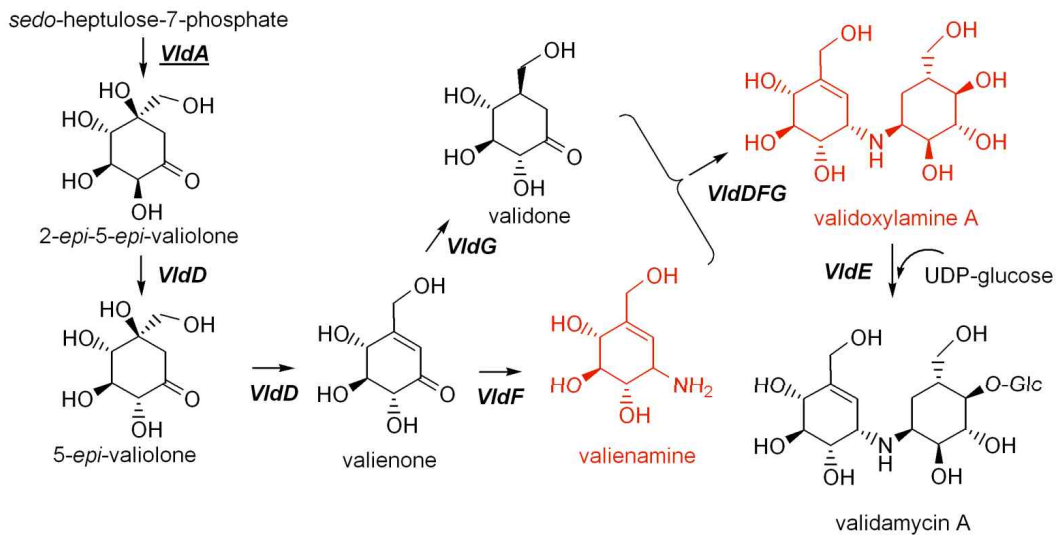


후반부에 얻어진 분획을 확보하여 재차 CG-50 column을 진행하였으나, 발리엔아민의 순수 분리를 달성할 수 없었다. 또한 공정 수립 상 gradient elution을 통한 CG-50 column chromatography의 활용은 경제적으로 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 수율 문제는 처제하더라도 생분해과정은 발리엔아민의 순수 확보에는 적절한 공정이 아닌 것으로 평가할 수 있었다. 차 후 공정 수립을 위하여서는 친환경 공정의 수립을 포기하고 유기화학적 분해 공정을 수립하는 것이 타당한 선택인 것으로 판단된다.

1-3. 발리다마이신 생합성 유전자를 활용한 α -glucosidase 저해활성생산

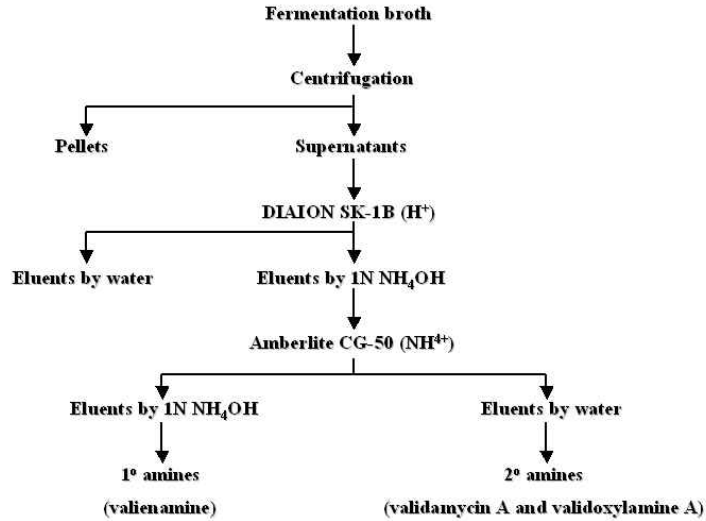
1-3-1. 발리다마이신 생합성 유전자 *vldADF*의 이중발현을 통한 α -glucosidase 저해활성생산

본 연구진은 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 발리다마이신 생합성 유전자군을 분리하고 그 생물학적 기능 규명을 완료한 바 있다. 해당 유전자군 내 유전자들의 기능을 고려하여 발리다마이신 생합성 경로를 제안하였다 (그림; 발리다마이신 생합성 경로 및 해당 유전자)



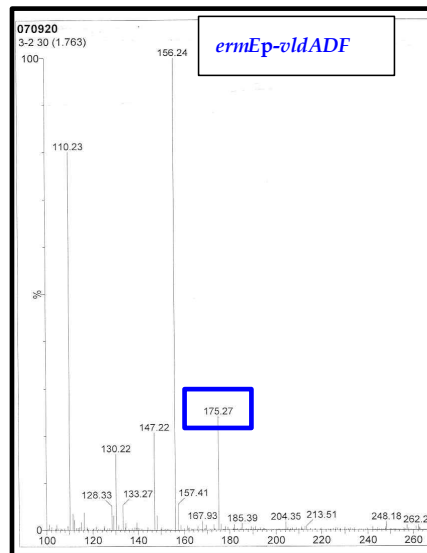
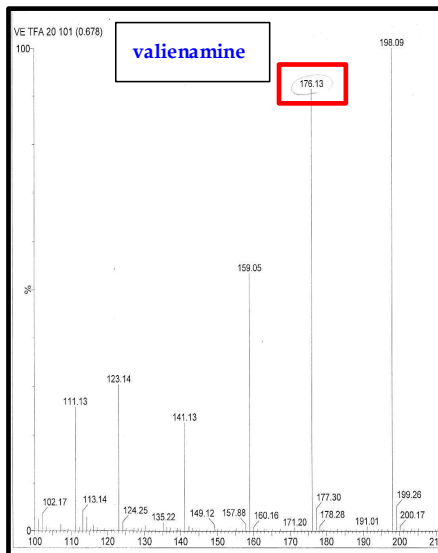
발리다마이신 생합성 경로 및 해당 유전자

제안된 생합성 경로에 기초한다면 *VldA* (heptulose 7-phosphate cyclase), *VldD* (4-ketosugar dehydratase/epimerase), *VldF* (aminotransferase) 세 개의 효소 작용 만으로 *valienamine*이 생성될 것으로 예측된다. 따라서 *valienamine*의 효율적인 생산 시스템 구축을 위하여 *vldADF* 세 개의 유전자가 과발현된 이중 균주를 제조하였으며, 해당 균주에서 α -glucosidase 저해 활성 물질의 생산을 조사하였다. 또한 *vldADF*와 함께 dehydrogenase를 지정하는 것으로 예측되는 *vldG* 유전자를 과발현한 균주를 제조하여 α -glucosidase 저해 활성 물질의 생산을 조사하였다. 구체적으로는 위의 유전자들을 방선균 expression vector인 *pWHM3* vector 에 방선균에서의 strong promoter인 *ermE* promoter 하단에 장착하여, *pWHM3-ermEp:vldADF*, *pWHM3-ermEp:vldADFG*를 제조하였다. 얻어진 발현 plasmid를 *Streptomyces albus*에 형질전환하여, 형질전환체를 배양 후, 2차에 걸친 정제를 수행하였다 (그림; *Streptomyces albus* 형질전환체에서 α -glucosidase 저해 활성 정제과정).



Streptomyces albus 형질전환체 배양 및 α -glucosidase 저해 활성 정제과정

α -glucosidase 저해 활성의 측정은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 기질로 사용하며, α -glucosidase (Sigma)에 의하여 생성되는 *p*-nitrophenol의 양을 405nm에서의 흡광도로 측정하는 방식으로 진행하였다. *vldADF*가 과발현된 *S. albus* 균주의 배양체에서 α -glucosidase 저해 활성을 조사한 결과 유의성 있는 저해활성을 관찰할 수 있었다 (Negative control, 2.203; valienamine positive, 0.602; 시료 1.326). 시료를 SK1B ion-exchange column에 적용하고 1N 암모니아수 용출을 시도하여 활성 물질을 일차 정제하였다 (Negative control, 2.313; valienamine positive, 0.088; 시료 0.445). 이후 CG-50 ion-exchange column에 적용하고 1N 암모니아수 용출을 시도하여 활성 물질을 정제하였다 (Negative control, 2.407; valienamine positive, 0.113; 시료 0.774). 얻어진 활성 분획의 질량 분석을 진행한 결과 m/e , $[M+H]^+$ 175의 화합물이 존재함을 확인하였다. valienamine의 분자량이 175이므로 valienamine이 존재할 시에 예상되는 m/e , $[M+H]^+$ 값은 176에 해당한다 (그림 참조).

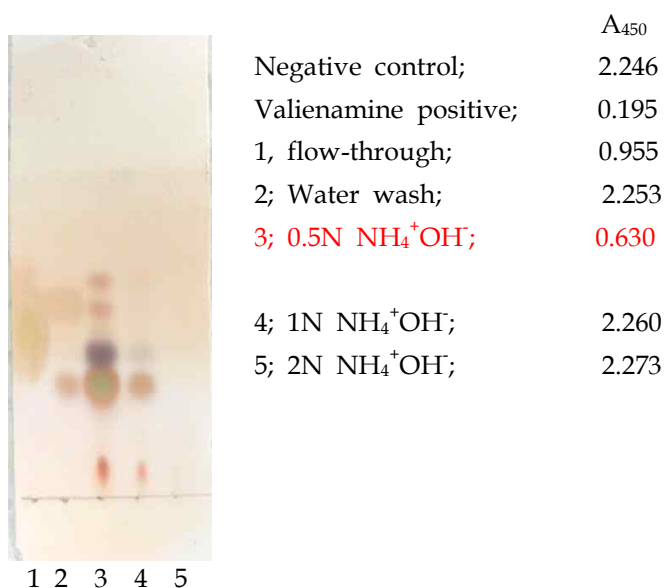


따라서 *vldADF*의 과발현에 의하여 생산된 α -glucosidase 저해 활성 물질은 valienamine 자체가 아닌 그 유사체임을 제안할 수 있었다. 이러한 유도체의 생산은 필수 생합성 유전자의 결손에 의한 것으로 가설을 설정하고, dehydrogenase 유전자인 *vldG*를 첨가하여 *vldADFG*의 과발현 균주를 제조하였다. *vldADEFG* 과발현 균주의 배양체를 활용한 α -glucosidase 저해 활성 측정 결과는 다음과 같다. (Negative control; valienamine positive; 시료), 배양체 (2.335; 0.095; 1.169), SK1B-1N 암모니아수 용출 (2.314; 0.116; 0.201), CG-50-1N 암모니아수 용출 (2.343; 0.136; 0.575). 얻어진 추출물의 질량 분석 결과 *vldADF* 발현에서 관찰되었던 *m/e*, $[M+H]^+$ 175의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 통하여 *vldADF*의 과발현만으로도 α -glucosidase 저해 활성 물질의 생산을 유도할 수 있음을 확인하였으며, 해당 물질은 valienamine은 아니며, *VldADF* 효소가 균주 내의 대사 작용과 상호 작용하여 생산하는 새로운 구조물임을 짐작할 수 있었다.

1-3-2. 발리다마이신 생합성 유전자군의 이중발현을 통한 새로운 α -glucosidase 저해활성생산

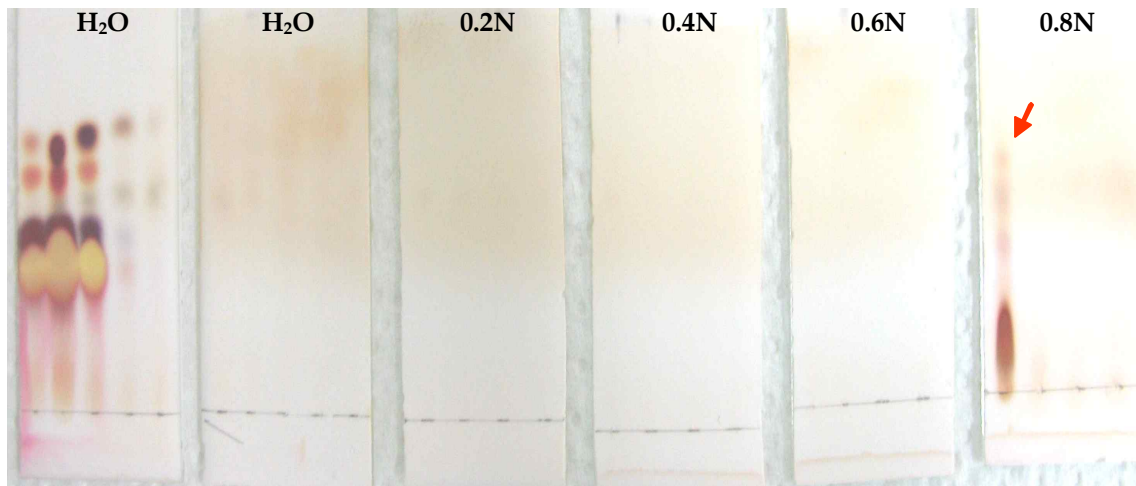
이상의 결과에서 관찰된 새로운 α -glucosidase 저해 활성의 생산이 발리다마이신 생합성 유전자군 중 특정 활성에 결핍에 의한 것인지를 확인하기 위하여 발리다마이신 생합성 전체 유전자군을 포함하는 24-kb 영역을 pWHM3에 cloning 하고 *S. albus*에 도입하였다. 위에 기술된 방식으로 SK1B, CG-50 정제를 실시한 후 활성 분획의 질량 분석을 시도한 결과, 역시 *m/e*, $[M+H]^+$ 175의 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 기존의 연구에서 발리다마이신 생합성 유전자군의 이중발현이 valienamine을 생산한다는 결과는 해석의 오류이며, valienamine이 아닌 새로운 α -glucosidase 저해 활성 물질이 생산되는 것으로 확인할 수 있었다.

발리다마이신 생합성 유전자군의 이중발현에 의하여 생산되는 새로운 α -glucosidase 저해 활성 물질의 구조를 확인하는 작업을 수행하기로 결정하여 활성물질의 순수 분리를 진행하였다. 이를 위하여 *S. albus* 형질전환 균주의 7-liter 배양을 진행하였다. 일차적으로 배양액을 Diaion SK1B 강양이온 수지에 적용한 후 0.5N, 1N, 2N 암모니아수로 용출을 시도하였다. 용출 분획의 TLC 분석과 α -glucosidase 저해 활성 결과는 다음과 같다.



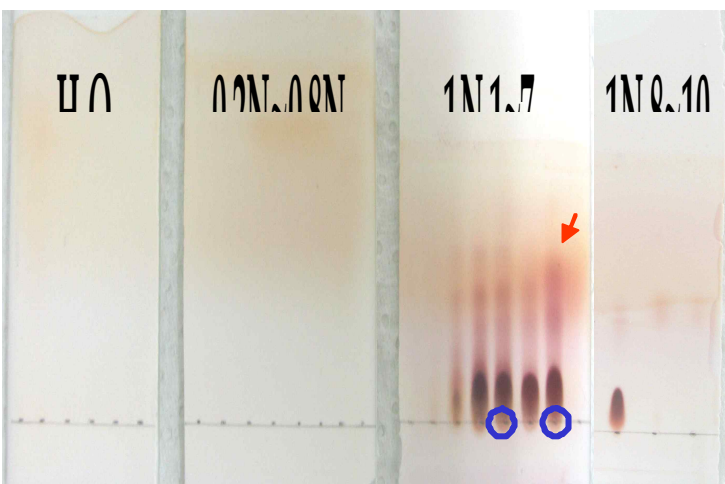
Flow-through에서도 상당량의 α -glucosidase 저해 활성이 관찰되었으며 이는 이온 성질을 보유하지 않은 α -glucosidase 저해물질이 존재함을 의미한다. 본 실험에서는 활성 물질의 순수 분리를 목표로 하여 0.5N 암모니아수 용출 분획을 대상으로 순수 분리를 진행하였다.

SK1B의 0.5N 암모니아수 용출 분획을 농축한 후 Amberlite CG-50 약양이온 수지에 적용한 후 암모니아수 분획을 취하여 α -glucosidase 저해 활성을 측정하였다.



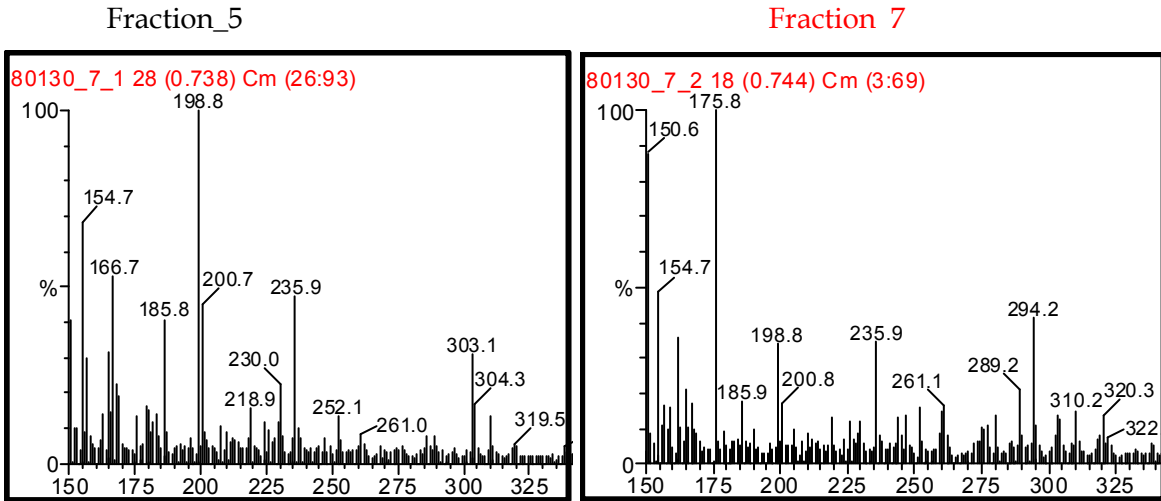
Negative control	Positive control	D.W 1	D.W 2	D.W 3	D.W 4	D.W 5	0.2N 1	0.4N 1	0.6N 1	0.8N 1	0.8N 2	0.8N 3
2.317	0.178	2.209	2.231	2.223	2.271	2.411	2.310	2.330	2.314	0.645	2.295	2.268

일차 CG-50 chromatography를 통하여 0.8N 암모니아수 용출분획에서 강력한 α -glucosidase 저해 활성이 나타남을 관찰하였다. 이 분획을 농축한 후 이차 CG-50 chromatography를 진행하였다.



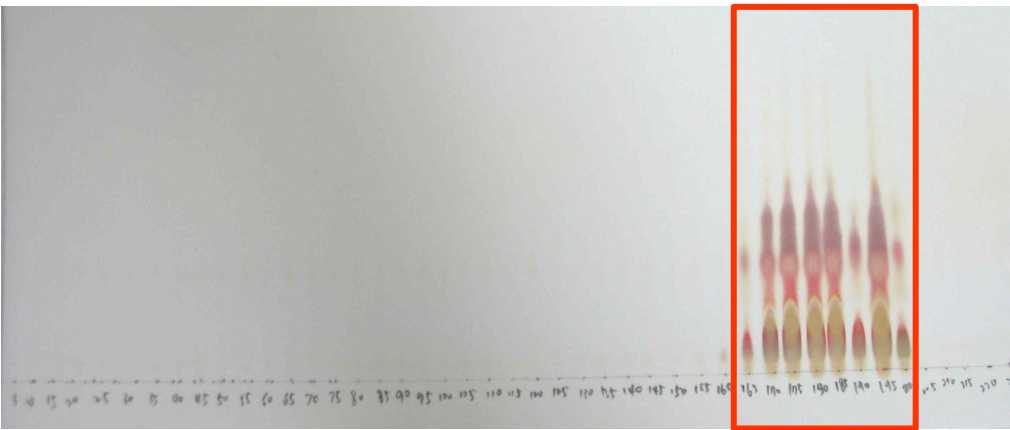
Negative control	Positive control	D.W	0.2N	0.4N	0.6N	0.8N	1N 1	1N 2	1N 3	1N 4	1N 5	1N 6	1N 7	1N 8
2.266	0.382	2.295	2.259	2.261	2.297	2.350	2.167	1.936	1.256	1.249	1.603	0.989	0.301	0.682

이차 CG-50 chromatography를 통하여 1N 암모니아수 용출 분획 중 7번째 분획에서 강력한 α -glucosidase 저해 활성이 관찰되었다. 이 시점에서 활성이 미비한 분획 5번과 활성이 강한 분획 7번을 선택하여 질량분석을 시도하였다.



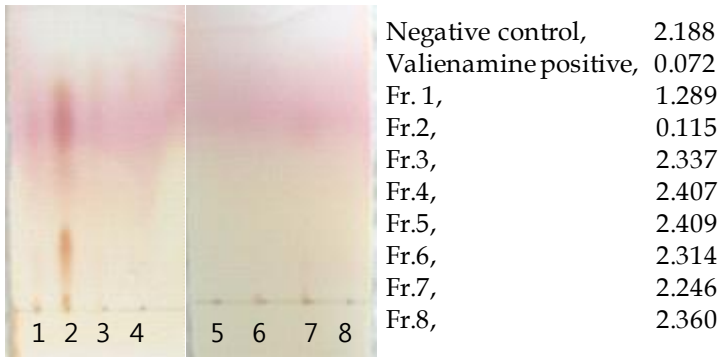
α -glucosidase 저해 활성과 일치하여 7번째 분획에서 m/e , $[M+H]^+$ 175의 존재를 확인할 수 있었다. 이 후 반복적인 CG-50 chromatography를 진행하였으나, 목표 물질의 순수 분리를 달성하지 못하였으며, 이 과정에서 활성 물질이 모두 소실되는 결과를 초래하였다. 이 후 *S. albus* 형질전환 균주의 5-liter 배양을 다시 진행하였으며, CG-50 chromatography 단계에서 암모니아수의 농도 구배에 따라 분획을 취하는 방법을 선택하였다.

활성물질 분리의 이차 시도에서 SK1B chromatography의 활성분획을 농축한 후 CG-50 chromatography에 적용하고 암모니아수의 농도구배 (0~0.6N)에 따라 분획을 취한 후 TLC 분석을 시도한 예는 다음과 같다.



Negative Control	Positive control	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205
2.188	0.072	1.948	1.487	1.472	0.776	0.457	0.397	0.400	0.435	0.462	0.374	0.533	2.65

α -glucosidase 저해 활성을 측정된 결과, 얻어진 분획의 TLC/ninhydrin 검출 결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 따라서 다양한 양이온성 물질들 간의 분리가 이루어지지 않음을 짐작할 수 있었다. 활성분획을 모두 수집한 후 농축하고 음이온 교환수지인 Dowex 1 음이온수지에 적용하였으며, 증류수 용출을 통하여 활성 분획을 확보하였다.



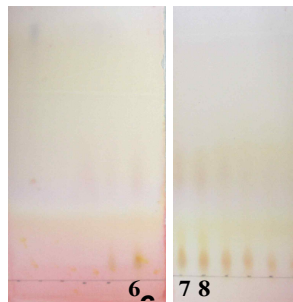
얻어진 분획을 재차 CG-50 chromatography에 적용한 후 세심한 농도 구배를 통하여 활성 분획을 취하였다. 이때 활성을 나타내는 분획을 제시하면 다음과 같다.

Negative control	Positive Control	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205
2.188	0.072	1.524	0.936	0.512	1.167	1.481	0.234	0.454	0.975	1.308	1.370	1.120	1.641	1.907

활성 분획을 TLC/ninhydrin으로 분석하면 150~155 분획은 Dowex 1 chromatography에서 얻어진 2번 분획과 유사한 양상을 보인 반면, 170~175 분획은 물질의 존재를 확인할 수 없었다. $^1\text{H-NMR}$ 분석을 시도한 결과 두 경우 모두 물질의 함량이 매우 낮아 (특히 170~175 분획은 물질의 존재 여부를 확인할 수 없는 수준) 구조 동정을 진행할 수 없었다. 이상과 같이 양이온 수지로 시작한 활성물질 분리가 성공하지 못함에 따라 분리 전략을 수정하여 재차 활성물질의 동정을 시도하였다.

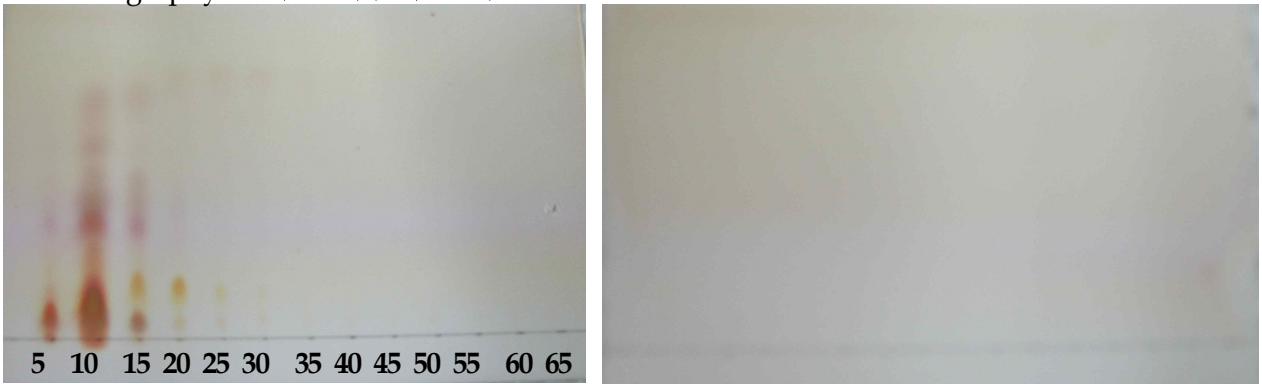
새로이 5-liter의 배양액을 회수한 후 다음의 과정으로 활성물질의 분리를 시도하였다:
음이온 Dowex 1을 이용하여 1차 정제 -> 양이온 Dowex 50W를 이용하여 2차 정제
-> LH20 gel filtration 3차 정제 -> C-18 column 4차 정제

Dowex 50W를 활용한 이차 정제 결과 (0.1 N 암모니아수 용출)를 제시하면 다음과 같다.



Negative control	Positive control	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.902	0.028	1.957	1.959	2.029	2.068	1.355	0.967	0.643	0.351	1.252	1.611	1.926	2.037	1.984

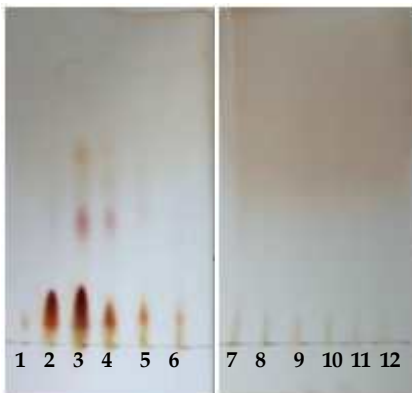
얻어진 7, 8번 분획을 농축한 후 LH20 gel-filtration을 반복 수행하였으며, 삼차 LH20 chromatography 결과는 다음과 같다.



Negative control	Positive control	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
0.528	0.016	1.718	1.125	0.592	0.681	1.674	1.915	1.008	1.287	1.967	2.023	2.063	2.039	1.985

반복적인 LH20 gel-filtration을 통하여 main 물질과 활성이 나누어지는 현상을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 통하여 활성물질과 ninhydrin으로 검출되어지는 물질과는 연관성이 없음을 확인할 수 있었으며, 목표 활성은 극소량의 고활성 물질임을 짐작할 수 있었다.

얻어진 15~20 분획을 C-18 resin에 적용한 후 증류수 용출을 진행하였다.



Negative control	Positive control	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.053	2.300	2.288	2.055	0.667	1.593	2.155	2.296	2.417	2.386	2.287	2.417	2.272	2.261

이상의 C-18 용출에서 보여지 듯이 3번 분획에서 우수한 α -glucosidase 저해 활성을 관찰할 수 있었다. 그러나 3번 분획의 TLC/ninhydrin 분석 결과를 2번 분획, 4번 분획과 비교하면, 3번 분획에만 존재하는 물질을 동정하는 것이 불가능함을 알 수 있다. 이와 같은 맥락에서 이들의 $^1\text{H-NMR}$ 분석에서 3번 분획의 특이적인 signal을 검출할 수 없었다. 따라서 목표하였던 활성물질은 5-liter 수준의 배양에서는 확보할 수 없는 미량의 물질임을 짐작할 수 있겠다. 발리다마이신 생합성 유전자의 이중 발현을 통하여 *S. albus* 균주에서 축적되는 미지의 α -glucosidase 저해 활성을 동정하는 것이 기초 과학적인 측면에서 매우 흥미로운 주제일 것이지만, 물질의 확보가 난이한 점은 본 연구 과제의 기본 목표인 실용화와 부합되지 않는 점이다.

2. 발리다마이신 대량 생산 균주 개발 및 그 활용

본 연구진은 국내 독자 기술로서 세계적 수준의 발리다마이신 산업균주를 개발하였다. 해당 고생산 균주는 현재의 고환율 시대에서 보다 독보적인 가치를 보유한다고 평가할 수 있겠다. 본 연구진은 이와 같은 탁월한 연구 기반을 바탕으로 발리다마이신 생산 공정의 실용화를 달성하였다.

2-1. 발리다마이신 생산을 위한 대장균 발현 시스템 구축

vld 유전자들을 발현하여 발효가 용이하고, 대사 공학이 우월한 균주에서 발리다마이신 및 그 중간체 생산을 유도하기 위하여 host 균주로 *E. coli*를 선정하였다. 본 연구를 진행하기 위하여서는 각 유전자들에 대한 발현 벡터를 구축하여야 한다. 이의 일차적인 진행으로서 *vldADEF*G 유전자들 대상으로 *E. coli* 발현 벡터를 구축하였다.

사용되어진 벡터는 pET24b를 사용하였다. 사용되어진 PCR primer 들은 다음과 같다.

vldA: 5'-CTCTTCACGAATTCAGGTCGATGAC-3'/5'-GCGCGGCCTAAGCTTTCACACCCCCAT-3'

vldD: 5'-CTTCATATGGTGCCTGGCCGCATC-3'/5'-ATTCTCGAGTCAGGAGATGAGGGC-3'

vldE: 5'-ATTGAATTCGTGACCGGATCTGAGATC-3'/5'-CTTAAGCTTTCAGAGGTCTGCTCG-3'

vldF: 5'-CTTCATATGCTGACCGCCATGACC-3'/5'-ATTCTCGAGTCACGCGATGCCCTC-3'

vldG: 5'-ATTGAATTCGTGACTCTGGAGGAG-3'/5'-CTTAAGCTTTCAGGAGGGTTCGGG-3'

얻어진 PCR product를 nucleotide sequencing을 통하여 확인한 후 pET28a에 subcloning 하고 *E. coli* BL21에 형질전화하고 단백질의 발현을 조사하였다.

일차적인 발현 유도는 1 mM IPTG를 활용하여 37 °C에서 진행하였다. SDS-PAGE를 통하여 발현을 조사한 예는 그림 4와 같다. 다섯 개의 construct 모두에서 수월하게 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다. *vldE*의 경우는 수월하게 soluble protein을 얻을 수 있었으며, 다른 발현체의 경우 soluble protein의 농도는 상대적으로 매우 낮았다.

후속 연구로서 각 유전자에 대하여 발현 벡터 및 발현 조건을 개선하여 발현 실험을 진행하였다.

*vldA*의 경우 5'-CTCTTCACCATATGAGGTCGATGAC-3'/5'-GCGCGGCCTGGATCCTCACACCCCCAT-3' primer를 사용하며 *vldA* 유전자를 pET22b에 subcloning하여 soluble 형태의 발현을 달성하였다. 같은 유전자를 pRSET에 subcloning 하였을 시에도 soluble 형태의 발현을 달성할 수 있음을 확인하였다.

*vldD*의 경우 5'-GAATTCATGTCTGACCTTCGCTCG-3'/5'-AAGCTTGGAGATGAGGGGCATG-3' primer를 사용하며 *vldD* 유전자를 pET29b에 subcloning하여 soluble 형태의 발현을 달성하였다.

*vldF*의 경우 5'-GGATCCATGGCAACGACGAAAC-3'/5'-AAGCTTCGCGATGCCCTCCAG-3' primer를 사용하며 *vldF* 유전자를 pET28a에 subcloning하여 soluble 형태의 발현을 달성하였다. 다른 construct와는 달리 *vldF*의 경우 soluble 형태로 얻어지는 단백질의 농도가 매우 낮은 것을 알 수 있었다.

*vldG*의 경우 5'-GGATCCGIGAGAGTGACTCTGGAG-3'/5'-AAGCTTGGAGGTTCGGGGGIG-3' primer를 사용하며 *vldG* 유전자를 pET32a에 subcloning하여 soluble 형태의 발현을 달성하였다.

2-2. 발리다마이신 고생산 균주 개발 개요

발리다마이신 생산 균주인 *S. hygrosopicus* var. *limoneus*는 최적의 상태에서 이미 liter 당 500mg 상당의 발리다마이신을 생산할 수 있음이 보고되었다 (J. Am. Chem. Soc., 2001, 123:2733-2742). 이에 착안하여 고생산성 균주 선발 작업을 진행하였다. 과제 1차년도 성과 점검 (공개 발표 심사) 과정에서 대장균 발현 시스템의 산업적 타당성에 대한 의문이 제시되었으며, 이에 대한 산업화 대안으로서 *S. hygrosopicus* var. *limoneus*를 산업화 균주로 개발하는 전략을 선택하게 되었다.

2-3. 발리다마이신 고생산 균주 선발

발리다마이신 고생산 균주를 screening하기 위해 평판 희석기술을 이용하였다. *S. hygrosopicus* var. *limoneu* 배양액을 멸균수로 약 10^5 배 희석시킨 후, 상기 희석액 0.1 ml을 효모-맥아 한천배지(효모 엑기스 4 g/l, 맥아즙 10 g/l, 포도당 4 g/l, 한천 20 g/l, 증류수 1 l, pH 6.8 ~ 7.0로 제조된 배지) 상에 산포하였다. 이후, 28℃에서 약 21일간 배양시킨 후, 효모-맥아 한천 배지 상에 증식한 콜로니를 멸균된 바늘을 이용하여 새로운 효모-맥아 한천 배지 상에 일정 간격을 두고 계대 배양하였다. 계대 배양되어 증식된 콜로니들을 다시 28℃에서 10일간 배양한 후, 콜로니가 증식된 배지 위에 *Rhizoctonia solani* 포자현탁액 ($1 \times 10^7 \sim 10^8$ 세포/ml)을 0.5 ml씩 도포하였다. 이때, 항생물질 생산을 통하여 지시균의 생육을 저해하는 균들을 후보 균주로 이용하였다. 그 결과, 선별된 균주 중에서 활성이 가장 좋은 균주들을 1차 선발한 후, 각 균주를 R2YE 액체 현탁 배양하여 균주들의 특성을 확인하였다.

● 선별된 발리다마이신 고생산 균주의 대량배양을 위한 균주 분리

(1) 1차 selection

확보된 발리다마이신 생산 현탁 배양 균주를 만들어 gradient dilution시켜 배지에 도말한다. 충분히 배양 후 single colony를 따서 F1 slant에 계대 한다. F1 slant에서 성숙되면 F2 slant에 계대 한다. 동시에 1차 seed로 접종하여, 배양 플라스크에 넣어 배양한다. 배양 플라스크에서 나온 역가를 기준으로 F1 slant 에서 우수한 균주들을 선발한다. 구체적인 실험 순서는 다음과 같다:

- 1) 균 현탁액의 준비: 균액을 glass bead로 균일하게 만들어 single colony를 얻을 수 있을 정도로 gradient dilution한다. 보통 10^8 정도로 희석한다.
- 2) 배지 도말과 배양: 희석된 균액을 분리 배지에 균일하게 plating하여 배양한다. 배양 온도는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 적당하고, 일반적으로 7일 정도면 적당한 single colony가 자란다. 배양 시 첫째 날은 plate를 정면 방치배양하고 둘째 날부터 뒤집어서 배양한다.
- 3) F1 slant의 배양: 분리용 plate에서 적당한 single colony를 따서 F1 slant로 옮겨 접종한다. F1 slant의 적절한 배양 온도는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 이며 상대습도는 40 ~ 60%로 유지해주면 일반적으로 7일 정도 배양하면 성숙된다. 성숙한 slant의 특징은 표면에 회백색 포자가 있으며, 흡수반이 있고 주변이 동그랗고 colony가 포만하게 자라는 특징이 있다.
- 4) 1차 selection: F1 slant가 성숙되면, 두 가지 실험을 수행한다. 먼저 F2 slant에 대량으로 옮긴 다음, F1 slant에서 약 $2 \sim 3\text{cm}^2$ 면적의 spore를 긁어서 배양 플라스크에 접종하여 배양한다. Shaking 속도는 220 ~ 240rpm, 최적온도 및 배양시간은 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 96시간 배양한다. 그중에서 발효단위 10% 이상인 F1 slant를 선택해서 2차 selection한다.

일반적으로 발효단위가 20,000u/ml 이상인 F1 slant를 선택한다.

(2) 2차 selection

1차 selection에서 선발된 F1 slant를 대량 접종하여 F2 slant (생산용 slant)를 만든다. F2 slant의 최적배양 온도는 $37\pm 1^\circ\text{C}$, 상대 습도는 40% ~ 60%이며, 보통 7 ~ 9일정도 배양하면 성숙된다. 성숙된 slant의 특징은 표면에 회백색 포자가 있으며, 흡수반이 있고 주변이 동그랗고 colony가 포만하게 생겼다. F2 slant가 성숙되면 배양 플라스크에 접종하여 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 96시간 진탕 배양한다. 배양 플라스크에서 나온 발효단위를 통해 F1 slant의 발효단위를 재검증한다. 보통 2차 selection 발효 단위는 20,000u/ml 이상 되어야 한다.

(3) Sand tube spore의 준비

1차, 2차 selection을 통해 적당한 F1 slant가 선발되면 해당하는 성숙된 F2 slant에서 sand tube를 만든다. 구체적인 실험순서는 다음과 같다:

성숙된 F2 slant를 무균 환경 하에서 loop를 사용해 slant 포자를 살살 긁어서 멸균된 sand tube에 옮긴다. 충분히 교반한 후 진공건조기에서 1시간 정도 감압 건조(진공도 $\leq -0.095\text{MPa}$)시킨다. 그리고 sand tube를 $0 \sim 8^\circ\text{C}$ 에서 냉장 보관한다.

(4) 생산균주의 준비

생산의 필요성에 따라 slant 포자를 이용하여 접종하기도 한다. Slant 포자를 이용하여 접종할 때, 멸균수를 성숙된 F2 slant에 첨가하여 loop를 이용해 substrate mycelium 을 포함한 모든 lawn를 긁어 현탁 배양 플라스크에 접종한다.

● 발리다마이신 생산균주의 대량배양을 위한 배지 조건 및 배양 조건 검토

(1) Slant 배지 조성

Glucose 2.0%, Aspartic acid 0.1%, NaCl 0.1%, agar 1.5%, pH는 6.4 ~ 6.7정도가 적당하며 aspartic acid를 제외한 성분을 120°C 에서 30분 감압멸균 후 aspartic acid를 첨가하여 균일하게 교반 후 각각의 플라스크에 분주하여 115°C 에 20분간 재차 멸균하여 냉각한 후 사용한다.

(2) 생산균주의 배양공정도



Slant tube, tube slant 및 round flask slant에서 동일한 배지를 사용하고, 배양시간은 약 7일정도이며 배양온도는 37°C 이다.

(3) Slant seed quality

표면에 회백색 포자가 자라고 흡수반이 있고 colony주변에 동그란 원을 형성하면서 포만하면 우수한 slant seed가 형성된 것이다.

● 발리다마이신 생산균주에서 발리다마이신 생산성 증대 효과를 정량적으로 검정

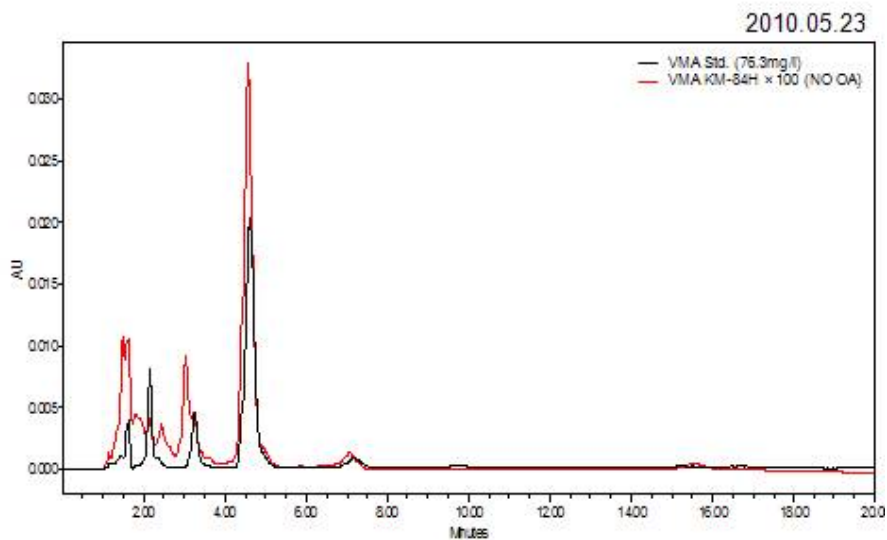
(1) HPLC 검정

선발된 고생산 균주를 각각 250 ml baffled flask에 25 ml의 상기 기술된 배지를 넣고 37±1℃, 220 ~ 240 rpm에서 36시간동안 seed 배양한 후, 모두 각각 5개씩 250 ml baffled flask에 30 ml의 배양배지를 넣고 최종 2%가 되도록 접종하고 5일 동안 본배양했다. 배양이 끝난 뒤 균주를 포함한 배지 5 ml를 두 반복으로 methanol 1-volume과 섞은 후, 30분 혼합하여, 원심분리를 통해 상층액을 회수하여 농축했다. 발리다마이신 생산 증가여부를 정량적으로 HPLC를 사용하여 확인했다. HPLC 분석 조건은 RP-18 column (4.0 X 250 mm, 5 μm)을 사용하였고, 215 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이동상은 아세톤나이트릴:물:인산 (600:400:1, v/v/v) 으로 흘려주고 측정했으며 구체적인 측정 protocol은 다음과 같다.

- ㉠ 표준품 standard 만들기; 발리다마이신에이 표준품 0.1g 을 50ml 짜리 volumetric flask 에 물로 녹여 정용하여 균일하게 mixing 한다. pipette로 2ml을 취하여 50ml volumetric flask에 옮겨 물로 희석하여 정용한다.
- ㉡ sample 만들기; 발효액이나 농축된 가루 적당한 양을 취하여, 물로 녹인 후 filter 한다. 그리고 최종 함유량이 1000 unit 정도 까지 희석한다.
- ㉢ 측정; 위와 같은 조건으로 baseline이 안정되면, 샘플을 injection 하여 측정한다.
- ㉣ 계산; 발리다마이신에이의 역가

$$= \text{Sample peak 면적} \times \text{희석배수} \times \frac{\text{standard 역가}}{\text{standard peak 면적}}$$

KM-84H

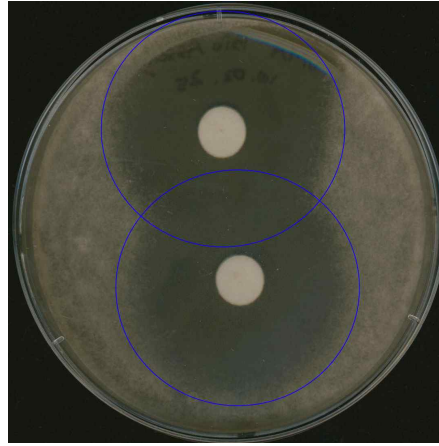


발리다마이신에이 HPLC 분석법에 의한 측정결과

(2) 항진균 활성 측정

생산균주의 발리다마이신 활성 측정 방법은 *Thanatephorus cucumeris* DMS1907에 대한 항진균 활성의 측정을 통하여 진행하였다. 구체적으로 발리다마이신 생산 발효 배양액의 상등액을

멸균수로 10, 100배 희석시킨 후, 상기 희석액에 침지한 paper disc를 미리 *Thanatephorus cucumeris* DMS1907의 포자 현탁액($1 \times 10^7 \sim 10^8$ 세포/ml)을 0.1 ml씩 도포하여 미세한 콜로니가 생성된 Potato dextrose 한천배지위에 올린다. 25°C에서 2일간 추가 배양하여 *Thanatephorus cucumeris* DMS1907의 생장을 저해한 holo zone을 확인한다.



발효액 상등액 100배 희석액 침지한 샘플

2-1-2. 발리다마이신 고생산 균주의 개량

효모-맥아 한천 배지에서 28°C에서 7~14일간 배양한 출발균주의 포자를 수집하기 위해 멸균수를 이용하여 포자현탁액을 만들었다. 구체적으로 상기 배양한 plate에 1개당 3ml 생리염수를 가하고 백금으로 포자를 수집하였다. 포자를 포함한 생리염수를 glass bead가 담긴 삼각플라스크에 넣어 30분간 shaking하였다. 그 후 탈지면을 통과하여 단일포자현탁액을 획득하였다. 포자농도를 확인하기 위해 상기 포자현탁액 0.1 ml을 0.9 ml 생리식염수에 연속 희석한 후 0.1 ml을 취하여 plate에 도말하였다. 이러하여 포자농도를 ml당 10^6 개로 맞춰주고 UV, HNO₃ 등 돌연변이 방법으로 변이를 유도한 후 효모-맥아 한천 배지 상에 도말하여 28도에서 10일간 배양한다. UV변이 조건은 파장 253 nm, 인15W UV 등으로 30 cm 거리에서 30초 조사하였다. HNO₃변이 조건은 0.1 M의 NaNO₂ 용액을 이용하여 10 ~ 60분간 처리하였다. 이렇게 얻은 단일 콜로니를 다시 효모-맥아 한천 사면배지에 접종하여 28°C에서 7 ~ 14일간 배양한 후 삼각플라스크에 접종하여 액체배양 실시하여 최종역가를 확인하였다. 위에서 얻은 고생산 균주를 사면배지에 여러 차례 계대 배양을 통해 발효역가 및 안정성을 검정하여 유전성능이 좋은 고생산 균주를 확보하였다.

● 발리다마이신 고생산균주의 안정화 및 선별

고생산균주의 발리다마이신 생산성이 발효조건에 의해 크게 영향을 받기 때문에 고생산성 균주의 개발 및 발효조건 최적화를 위한 꾸준히 노력이 요구된다. 따라서 상기에서 선별된 우량 균주를 여러 차례 계대 배양을 통해 고체배지에서 서로 다른 형태로 나타나는 콜로니의 빈도수를 줄일 수 있었으며 보다 안정적인 생산균주를 획득 할 수 있었다. 또한 발리다마이신을 산업균주 수준정도로 자란 콜로니를 택하여 발효배양을 수행했다.

● 생산균주의 발효 배지조건 최적화

발리다마이신 생산균주의 탄소원 대체 실험을 통해 glucose이외 다른 탄소원을 이용하면

발리다마이신 생산이 현저히 증가되는 것을 확인하였다. 하지만 가용성 녹말을 탄소원으로 사용할 경우 배양액의 고점도 현상이 나타나 산소 공급을 유지하기 위해 더 높은 교반속도가 필요하다. 따라서 쌀가루 또는 쌀가루와 대두박과 같은 탄소원을 혼용하여 같은 발효조건에서 가용성 glucose 보다 더 많은 발리다마이신을 생산하는 것을 확인했다. 그래서 전배양에서 쌀가루만을 사용하고 본배양에서는 쌀가루와 대두박을 혼용하여 사용했다. 질소원으로는 전배양에서는 yeast extract와 peanut powder를 사용하였고, 본배양에서는 yeast extract와 peanut powder뿐만 아니라 cotton seed powder를 이용했다. 그 외에 K_2HPO_4 , NaCl, $CaCO_3$, 소포제 등에 의한 발리다마이신의 발효조건 최적화를 수행하였다. 2%이상의 glucose를 탄소원으로 포함된 배지에서는 대사저해에 의해 발리다마이신 생산이 억제된 것을 확인하였다. 또한 본배양시 적합한 탄소원, 질소원이 들어간 배지에 K_2HPO_4 를 첨가하여 실험한 결과, 발리다마이신 생산을 대조구보다 30% 정도 증가시켰다.

(1) 전배양 발효조건

1) 전배양 배지 조성:

쌀가루	6%
NaCl	0.2%
Yeast extract	0.3%
Peanut powder	3.0%
K_2HPO_4	0.1%

2) 배양 방법: 배지를 5000L jar에 넣고 물 2500L를 첨가한다. 소포제 소량 첨가 후 121℃에서 45분간 멸균한다. 50℃까지 냉각 시킨 후 slant seed를 접종 한다 (예, 3000L 배양액에 round flask slant 한 개 정도 접종).

3) 접종방법: 화염접종 혹은 미공접종 (round flask slant를 멸균수로 현탁한 후, needle을 정착하여 압력 차이를 이용하여 접종)으로 접종한다.

4) 배양조건: 최적 배양온도는 36 ~ 40℃이고 압력은 0.05Mpa, 통기량은 1 : 0.5로 25 ~ 40시간 주기로 교반 배양한다.

5) 배양시간 및 접종시기: seed가 형태학적으로 확인해 보았을 때 상태가 양호한 정도로 PMV 35%이상이야 한다, 대략 시간은 20 ~ 25시간 정도 걸리며, 이때 온도를 적정온도보다 낮춰 사용한다. 형태학적인 확인은 현미경으로 관찰하는데 균사체가 전체적으로 시야에 퍼져있고 PMV 35% 이상 (3000 rpm), pH 최저로 떨어졌다가 다시 약간 올라올 때(6.0-6.4)가 최적 접종시기이다. 보통 pH6.8 이상이면 된다.

(2) 본배양 발효 조건

1) 본배양 배지 조성:

쌀가루	13%
대두박	0.8%

Yeast extract	0.8%
Peanut powder	1.0%
K ₂ HPO ₄	0.1%
Cotton seed powder	0.3%
NaCl	0.15%
CaCO ₃	0.25%
소포제	0.03%

- 2) 배양 방법 및 접종방법: 상기 배지조성 원료(CaCO₃제외)를 발효jar에 첨가하여, NaOH로 pH 7.2로 조절하여, CaCO₃를 첨가 한 다음 38 ton까지 정용한다. 121-125℃에서 45분 멸균 후 40℃까지 냉각 시켜서 seed를 접종한다. 접종량은 10-15%로한 후 교반 배양한다.
- 3) 배양조건: 최적 배양온도는 40 ~ 41℃이고 압력은 0.05Mpa, 통기량은 0 ~ 10시간 1 : 0.5로 25 ~ 40시간 교반 배양한다.
- 4) 중간확인: 발효 과정 중 8시간 간격으로 pH, 총당, nitrogen, pMV를 측정하여 기록한다. 발효 45시간 경과 후에 최종 회수하고 역가를 측정한다.
- 5) 발효 종료 시기 판정: 균사체가 용해되며, pH가 올라가고 발효주기는 약 65시간 정도가 되면 발효를 종료한다.

● 생산균주의 고체배양 및 보존법 확립

구체적으로, 생산균주를 30 ml의 효모-백미 한천배지(전분 10 g/l, 효모엑기스 4 g/l, 백미 10 g/l, 한천 20 g/l, 증류수 1 l, 살균 후 pH 6.8 ~ 7.0)가 함유된 사면배지에서 37℃로, 7 ~ 14일간 단일 콜로니(monocolony)로 배양하였다. 그 후, 1.5 ml의 생리식염수에서 배양된 단일 콜로니를 현탁한 후, 상기 고체배지가 함유된 수개의 plate에 도말하고, 다시 37℃에서 7 ~ 14일간 배양하였다. 상기 배양한 plate에 1개당 살균된 15%(w/v) skim milk solution 5ml씩을 가한 후, 화염살균한 루프(loop)로 긁어서 포자 와 일부 균사체 현탁액을 수확하였다. 그 후, 살균된 주사기를 이용하여 포자 현탁액을 유리솜에 통과시켜 균사체가 제거된 포자 현탁액을 제조하였다. 단기적으로 보존할 경우 냉동고(-80℃)에 넣어 보관한다. 장기적으로 보존할 경우 동결건조 법으로 ampoule 만드는 것이 바람직하다. 0.2ml의 현탁액을 pasture pipette로 ampoule에 넣고 입구를 원래 멸균된 솜으로 막은 후 동결건조기(-80℃)에서 30~40분간 진공건조를 행한다.

장기간 발리다마이신 균주 보존은 sand slant를 사용해 보관이 가능하고 단기간 보관 시에는 고체 spore slant tube를 사용한다. 그 구체적인 방법은 다음과 같다:

- 1) Sand slant 의 준비: 모래 적당히 취하여 수돗물이나 증류수로 담가두었다 pH 중성이 될 때까지 여러 번 씻어 낸다. 건조 후 60목 mesh로 걸러낸다. 그리고 자석을 이용해서 철분 불순물을 제거한다. 1 m 깊이에 있는 황토를 채취해, 수돗물이나 증류수로 pH 중성 될

때까지 여러 번 씻어 낸다. 건조 후 가루로 갈아서 120목 mesh로 걸어 낸다. 이렇게 준비된 모래와 황토를 1:1 비율이나 2:1 (kg:kg)배율로 혼합한다. 1-2 g 을 직경 12 mm, 길이 100 mm의 tube에 담아 면전으로 입구를 막고 포장한다. 0.1Mpa 조건하에 1 시간씩 5번 습식 멸균한다. 멸균 후 oven 에서 건조 시킨다.

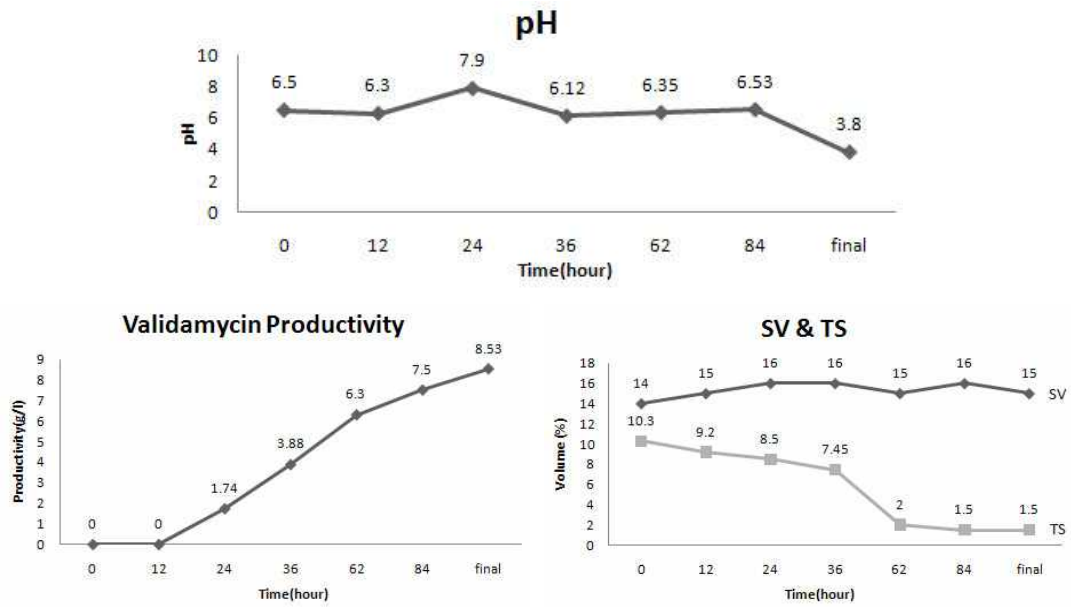
2) Sand slant spore 준비: 균주 육종으로 얻은 우량 slant spore를 증류수 2 ml에 현탁하여 sand tube 에 옮겨 4-5시간 진공 처리한다. 흙덩어리를 부드럽게 흔들 주어 터트리면 sand slant spore가 준비된다.

● 생산균주의 액체배양 확립

종균배양을 위해 100 ml 삼각 플라스크에 종균배양 배지(Glucose 1.0%, Soluble starch 1.0%, Yeast extract 1%, Corn steep powder 0.5%, CaCO₃ 0.1%, pH6.6) 25 ml를 첨가하여 121℃, 20분 동안 살균하였다. 상기 제조된 포자 현탁액을 효모-맥아 한천배지에 접종하여 28℃로, 4~5일간 단일 콜로니(monocolony)이 생길 때 까지 배양한다. 그 후, 색소나 클로니 형태를 관찰하여 경험적으로 선택한 클로니 하나를 화염 살균한 루프(loop)로 따서 종균배양 배지에 식균하여 37℃에서 220 rpm으로 48시간 동안 배양하여 종균 배양액을 제조하였다. 이후, 본배양을 위해 250ml 삼각 플라스크에 본배양 배지(Glucose 1.0%, Dextrin 10%, Dried Yeast 1%, peanut powder 0.5%, K₂HPO₄ 2%, CaCO₃ 0.1%, pH6.8) 50ml를 첨가하여 121℃, 20분 동안 살균하였다. 그 후, 상기 제조된 종균 배양액(2%(v/v))을 본 배양 배지에 식균하여 37℃에서 220rpm으로 6~9일 동안 배양하여 본 배양 배양액을 제조하였다. 산업성을 고려하여 주로 저가의 공업용 원료를 사용하였다. 배양액에 합성 고분자인 Neorin 같은 Anti forming reagent를 첨가하면(농도는 0.1%(v/v)) 발효가 상대적으로 안정화되었다.

● 발리다마이신 고생산 균주를 이용한 발효조 조건 최적화

500ml의 둥근 플라스크에 50ml의 전배양 배지를 가하여 121℃에서 40분 동안 살균한 다음, 포자 현탁액을 1%(v/v)되게 식균하였다. 그 후, 식균된 균주를 37℃, 120회 왕복으로 48시간 동안 배양하여, 1단 전배양액(gemination culture)을 수득하였다. 상기 1단 전배양액을 2.0%(v/v)되게 전배양액이 1ℓ 들어있는 2.5ℓ 발효조에 식균하였다. 그 후, 24시간 동안 37℃, 400rpm, 1vvm의 조건으로 2단 전 배양(seed culture)한 다음, 4ℓ의 본 배양액이 들어있는 7.5ℓ 발효 조에 2단 전배양액을 10%(v/v)되게 식균하여 37℃, 300~500rpm, 1vvm의 조건으로 7~8일 동안 배양하였다. 이렇게 얻은 배양액을 상기 서술한 추출법을 이용하여 HPLC법에 의한 분석결과, 8 g/L의 고농도의 발리다마이신이 생산됨을 확인하였다.



〈 발효과정 중 pH, SV & TS 및 역가 변화 〉



대량 발효용 50L 및 300L 발효조

2-3. 발리다마이신을 를 이용한 농가 실증시험 [양평군 농업기술센터에서 재현실험 진행중]

(1) 목 적

최근 친환경농산물 소비가 급증하고 있으며, 이에 따라 친환경농업실천농가가 급증하고 있으나, 친환경농업에 투입되는 농자재는 부재한 실정이어서 친환경농자재로 이용하고자 함.

(2) 사업개요

(가) 발리다마이신을 함유하고 있는 화학농약을 대체할 수 있는 미생물을 선발·이용하여 친환경농자재로써 대체 하고자함.

(나) 항균력을 가진 미생물을 이용하여 농가에 실증시험을 실시하여 친환경농자재로써 가능성을 확인하고자 함.

(3) 실증시험내용

(가) 발리다마이신 A 를 이용한 모잘록병(*Rhizoctonia solani*) 방제시험

① 시험자재 : 발리다마이신A

② 시험작물(품종) : 벼(추청벼), 상추(치마상추), 고추(마니따), 토마토(슈퍼도태랑)

③ 시험기간 : 4월 하순 ~ 5월하순

④ 시험방법

㉞ 처리내용

처리내용	희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법
발리다마이신 처리	미생물배양액 처리	과종후15일부터 7일간격 처리
대비구	화학농약처리	과종후15일부터 7일간격 처리
관행재배	-	무처리

㉟ 병해처리

처리내용	처리구	관행재배(대조)
병해제어	병원균처리 1×10^6 이상	좌동

㉞ 시험구 배치 : 무처리구, 처리구, 대비구 난괴법 2반복

⑤ 결과조사 : 발리다마이신 처리후 7일간격으로 발병정도 조사

병해명	조사항목	발병조사	규 모	약효표시법
모잘록병	이병주율	처리후 7일간격	처리구, 대조구 3반복이상	이병주율(%)= (이병주수/조사주수)*100

(나) 발리다마이신을 이용한 감자검은무늬썩음병(*Rhizoctonia solani*) 방제시험

① 시험자재 : 발리다마이신A

② 시험작물(품종) : 감자(정부보급종 씨감자)

③ 시험기간 : 4월 하순

④ 시험방법 : Pot 실험

㉞ 처리내용 : 병원균을 접종한후, 시험구, 대비구, 무처리별 발병율조사

※병원균밀도 : *Rhizoctonia solani* 1.0×10^6 이상

㉟ 시험구배치 : 난괴법 2반복 및 대조구 2반복

⑤ 결과조사

병해명	조사항목	발병조사	규 모	약효표시법
검은무늬 썩음병	이병주율	처리후 7일간격	처리구,대조구 3반복이상	이병주율(%)= (이병주수/조사주수)*100

(다) 발리다마이신A를 이용한 벼잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*) 방제시험

- ① 시험자재 : 발리다마이신A
- ② 시험작물(품종) : 벼(추청)
- ③ 시험기간 : 7월 중순
- ④ 시험방법 : 비교실험(시험구,처리구,무처리구)후 발병을 조사
 - ㉠ 처리내용 : 시험구(발리다마이신 처리) - 100평
 처리구(시중 화학농약처리) - 100평
 무처리- 100평
 - ㉡ 시험구배치 : 시험구, 처리구, 무처리구를 100평이상 구획
- ⑤ 결과조사

병해명	조사항목	발병조사	규 모	약효표시법
벼잎집무 늪마름병	이병주율	처리후 7일간격	처리구,대조구 3반복이상	이병주율(%)= (이병주수/조사주수)*100

(라) 발리다마이신A를 이용한 고추 주요병방제 시험

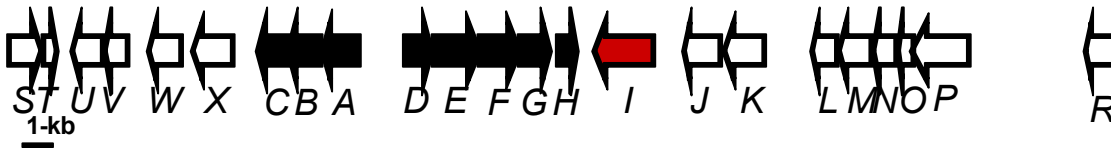
- ① 시험자재 : 발리다마이신A
- ② 시험작물(품종) : 고추(마니따)
- ③ 시험기간 : 4월 하순 ~ 5월중순
- ④ 주요병방제 시험 : Pot 실험
 - 고추역병(*Phytophthora Capsici*)
 - 고추청고병(*Pseudomonas Solanacearum*)
 - 고추탄저병(*Glomerella cingulata*)
- ⑤ 시험방법 : 난괴법 2반복 및 대조구 2반복
 - ㉠ 처리내용 : 시험구(발리다마이신 처리) - 9Pot
 처리구(시중 화학농약처리) - 9Pot
 무처리- 9Pot
- ⑥ 결과조사

병해명	조사항목	발병조사	규 모	약효표시법
벼잎집무 늪마름병	이병주율	처리후 7일간격	처리구,대조구 3반복이상	이병주율(%)= (이병주수/조사주수)*100

3. 발리다마이신 생합성 유전자원 기능 규명 및 발굴과 이를 활용한 중간체 생산 기술 개발

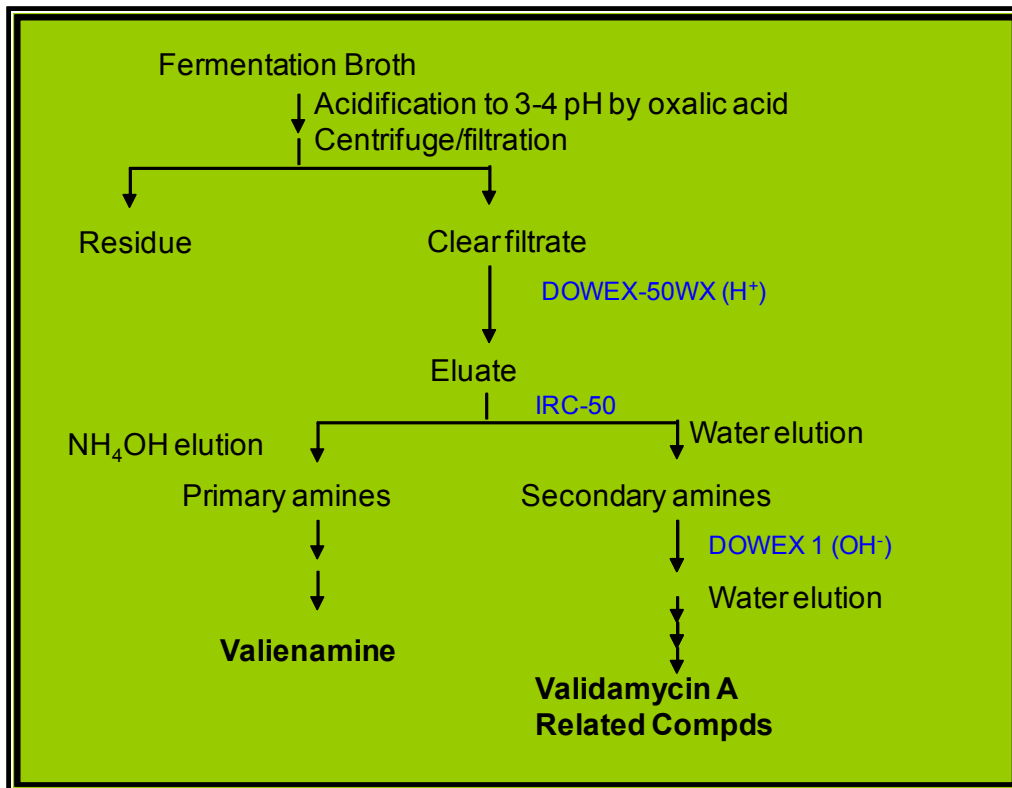
3-1. 발리다마이신 및 중간체를 생산하는 *Streptomyces lividans* 균주 수립

선행 연구에서 확보된 발리다마이신 생합성 유전자군의 유전자 지도는 다음과 같다.



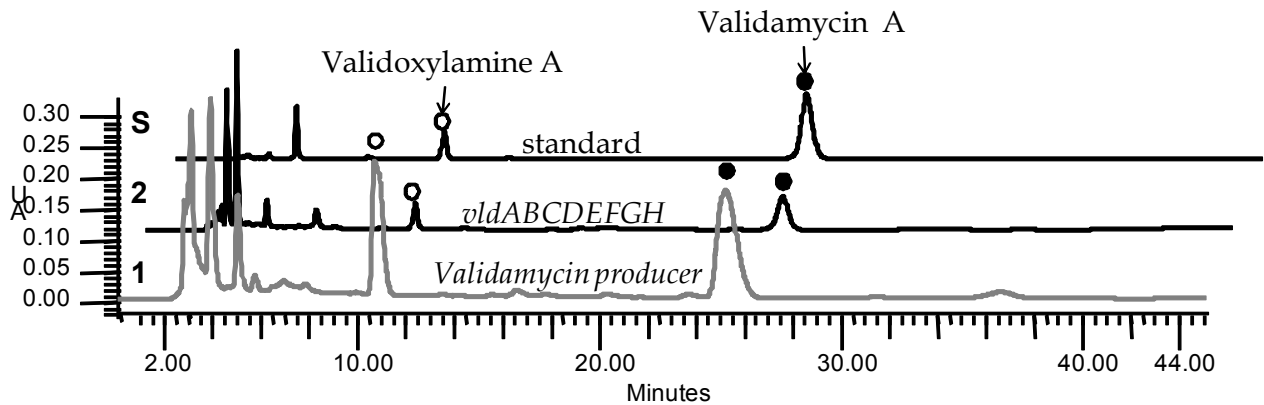
이 유전자군에서 VldA 단백질은 sedo-heptulose-7-phosphate에서 2-*epi*-5-*epi*-valiolone을 생산하는 2-*epi*-5-*epi*-valiolone synthase로 규명한 바 있다. 또한 VldC 단백질은 D-glucose에서 D-glucose-6-phosphate를 생성하는 glucokinase 활성을 보유하고 있으며, VldB 단백질은 D-glucose- α -1-phosphate에서 UDP-glucose를 생산하는 D-glucose- α -1-phosphate uridylyl transferase인 것으로 확인한 바 있다. 이와 같은 실험 결과와 위의 유전자 구성을 고려하면 *vldABC* 및 *vldDEFGH* 로 구성된 두 operon인 발리다마이신 생합성의 핵심 유전자 부위임을 예측할 수 있다.

*vldABC*와 *vldDEFGH*를 *S. lividans*에서 발현하기 위하여 *vldDEFGH*는 pWHM3 벡터 (thiostrepton resistance)에 *vldABC*는 pSET152 벡터 (apramycin resistance, site-specific integration vector)에 sub-cloning하였다. 이때 각 유전자단에 대하여 *Streptomyces* strong constitutive promoter인 *ermE* promoter를 장착하였다. 구축된 두 개의 plasmid를 동시에 *S. lividans*에 형질 전환한 후 발리다마이신의 생산을 조사하였다. 명확한 분석 결과를 얻기 위하여 *Thanatephorus cucumeris* NBRC 9253 (*Pellicularia filamentosa*) 지시균으로 활용한 antifungal assay를 지표로 추출물을 조정제하였다. 조정제 과정은 다음과 같다.



Ion-exchange chromatography를 통한 validamycin A의 조추출 과정

이상의 chromatography 과정을 거쳐 정제하면 순수한 validamycin A를 얻을 수는 없으나 HPLC 및 질량 분석에 적절한 시료를 확보할 수 있다. 이와 같은 방법으로 얻어진 시료를 HPLC 기법으로 분석한 결과는 다음과 같다: HPLC 분석은 ODS-A C18 column (4.6×250 nm, 5 μ, YMC)을 사용하였으며, 5 mM sodium phosphate (pH 7.0)와 acetone을 사용한 gradient elution으로 210 nm에서 시료를 검출하였다. Gradient elution 프로파일은 10분간 5 mM sodium phosphate로 흘려준 후 acetone의 농도를 20분간 10%까지 증가 시켰다. 이후 10분 동안 10% acetone 용출 조건을 유지하였다.

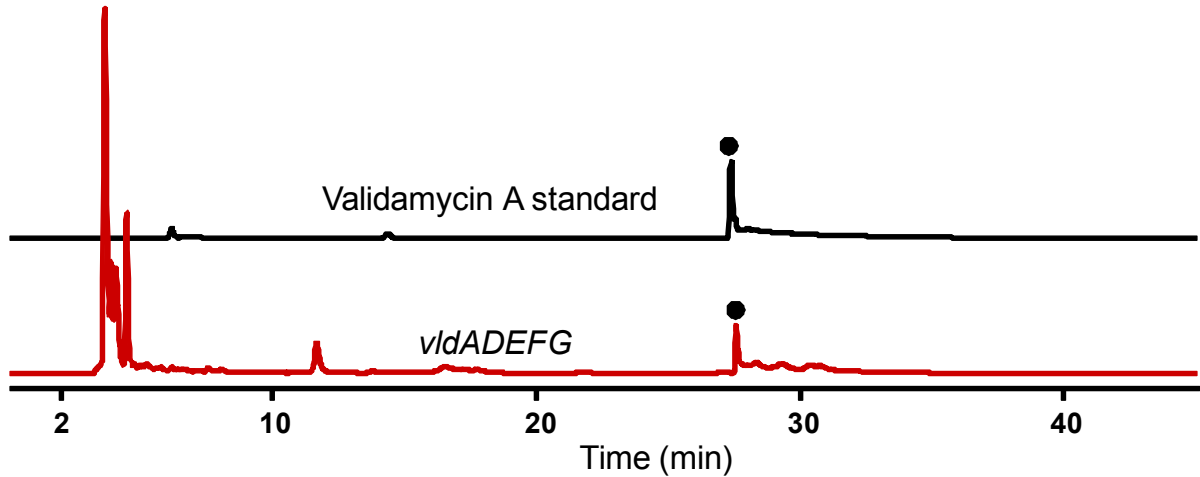


vldABCDEFGH를 S. lividans에 발현한 후 발리다아미신-A 및 그 중간체 발리독실아민-A의 생산을 확인한 HPLC 분석 결과

그림에서 보여지듯이 HPLC 분석을 통하여 vldABCDEFGH를 S. lividans에서 발현하여 발리다마이신-A 및 그 중간체인 발리독실아민-A를 생산하는 재조합 균주를 제조하는 데에 성공하였다. 이때 발리다마이신-A의 생산 정도는 liter 배양 당 0.6 mg 인 것으로 산출되었다. 이러한 발리다마이신-A의 생산성은 원 생산 균주인 S. hygroscopicus var. limoneus에 비하여 매우 낮은 정도이지만 본 단계의 실험은 S. hygroscopicus var. limoneus 배양에서 사용한 배지를 그대로 사용하였으므로, S. lividans에 대하여 배양 조건을 개선할 시에는 월등히 향상된 생산성을 기대할 수 있을 것으로 믿어진다. 또한 S. lividans의 경우는 많은 이차대사 조절 기작 및 조절 유전자들이 알려져 있으며, 생합성 유전자의 발현을 조절할 수 있는 시스템도 다수 알려져 있어 향후 균주 개량의 가능성이 크다고 할 수 있다.

원천 기술 확보의 측면에서 발리다마이신-A를 생산할 수 있는 최소 유전자들을 동정하는 것이 필요하므로 vldABCDEFGH에서 유전자의 숫자를, 예측된 기능에 근거하여, 축소하였다. 이때 선정된 유전자는 2-epi-5-epi-valiolone synthase 유전자인 vldA, 2-epi-5-epi-valiolone을 modification 하는 효소인 것으로 추정되는 epimerase/dehydratase 유전자인 vldD와 oxidoreductase 유전자인 vldG, glucose 잔기를 부착하는 기능을 수행할 것으로 예측되는 glycosyltransferase 유전자인 vldE, nitrogen assimilation 기능을 위하여 필수적일 것으로 사료된 aminotransferase 유전자인 vldF를 선정하였다. 이를 위하여 vldDEFG와 vldA 발현 백터를 S. lividans에 형질전환한 후 위에 설명된 방법에 따라 추출, 조정제 및 HPLC 분석을 진행하였다. 그에 대한 실험 결과는 그림 3에 나타난 바와 같다. 역시 발리다마이신-A의 생산을 확인할 수 있었으나 그 생산량은 매우 낮아 HPLC 분석으로는 liter 당 0.075 mg, trehalase 저해 활성 분석으로는 liter 당 0.115 mg이 생산되어진 것으로 추정되었다. 따라서 본 연구의 결과로서 vldADEFG 만으로도 발리다마이신-A를 생산할 수

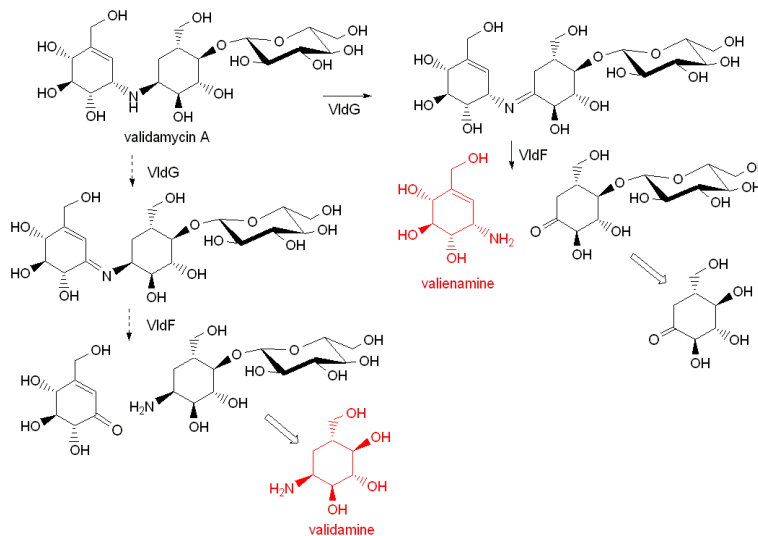
있음은 확인하였다. 그러나 *vldADEFG*만으로 발리다마이신-A를 생산하고자 할 때는 유전자의 발현을 최적화하는 노력과 대사공학을 통하여 UDP-glucose의 생산을 최적화하는 노력이 병행되어야 할 것으로 사료된다. 이는 *vldBCH* 유전자가 glucose로부터 UDP-glucose를 생합성하는 데에 기여할 것으로 예측되어지기 때문이다.



*vldADEFG*를 *S. lividans*에 발현한 후 발리다아미신-A의 생산을 확인한 HPLC 분석 결과

3-2. *vldF/vldG*로 형질전환된 *Streptomyces lividans* 균주를 활용한 발리엔아민 생산 기술

본 연구진이 수립한 발리다마이신의 생합성 경로를 살펴보면 발리다마이신 구조상의 질소 도입이 VldF aminotransferase의 기능에 의한 것임을 알 수 있다. 많은 경우 aminotransferase 반응은 가역 반응 임에 착안하여 *vldF*의 과발현을 통하여 발리다마이신 생분해를 달성할 수 있을 것으로 예측하였다. 이때 Schiff base 형성을 통하여 생분해를 촉진할 수 있도록 발리다마이신 생합성 경로에서 유일하게 존재하는 dehydrogenase 유전자인 *vldG*를 동시에 과발현 하였다. 이들의 작용에 의하여 α -glucosidase 저해 활성 물질이 생산될 가능성은 두 가지 경로로 제시할 수 있겠으며, 기실 두 가지 경로가 혼재하여 작동할 것으로 예상된다 (그림; VldG/VldF에 발리다마이신의 생분해 경로 제안).



VldG/ VldF에 발리다마이신의 생분해 경로 제안

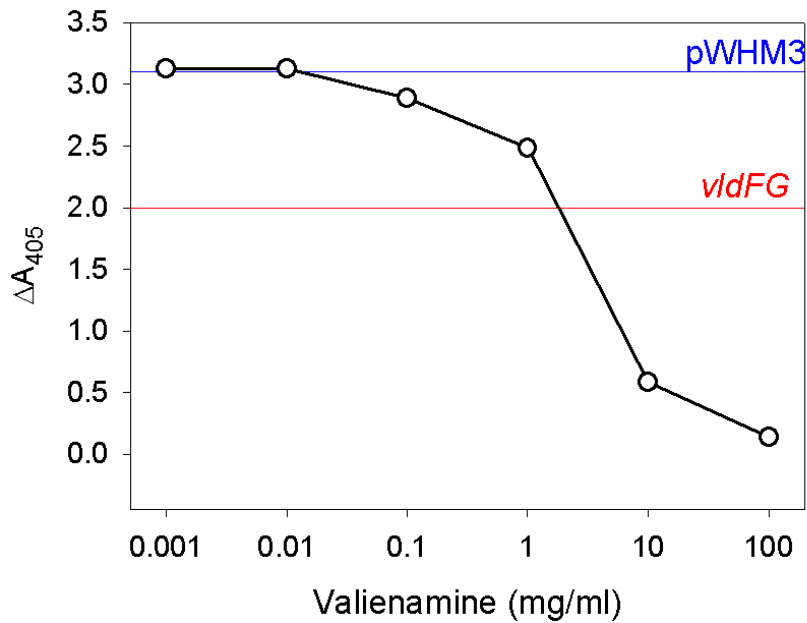
발리다마이신 생분해를 통한 발리엔아민 생산 공정을 수립하기 위하여 우선 발리다마이신 생합성 유전자의 발현을 통하여 발리다마이신의 생분해를 유도할 수 있는지를 조사하였다. *vldDEFG* 네 개의 유전자를 *ermEp* 하단에 장착하여 pWHM3에 삽입하여 pWHM3-*ermEp-vldDEFG*를 제조하였다. 제조한 플라즈미드의 형질전환체와 pWHM3가 도입된 대조균을 50 ml에서 24 시간 액체 배양하고 발리다마이신 50 mg 투여하였다. 이 후 24 시간 더 배양한 후 배양체 내에 잔존하는 발리다마이신의 함량을 측정하였다.

이때 배양조건 및 일차 정제는 기존에 보고된 바에 따라 진행하였다 (Haijun Dong 외 4인, Journal of the American Chemical Society, 2001년, 123:2733-2742). 구체적으로는 배양체의 배양액을 Dowex-50W (H+)에 적용하고 0.5N 암모니아수로 용출하여 얻어진 추출액 상에서 trehalase 저해 활성을 측정하여 발리다마이신 잔존량을 측정하였다. Trehalase 활성은 본 연구진이 대한민국 특허 10-0761340-0000에 기술된 바에 따라 진행하였다. 결과적으로 pWHM3가 도입된 대조균의 배양체에서는 40 mg의 발리다마이신에 해당하는 trehalase 저해 활성이 검출된 반면 pWHM3-*ermEp-vldDEFG*가 도입된 형질전환체에서는 20 mg의 발리다마이신에 해당하는 trehalase 활성이 검출되었다. 이를 통하여 발리다마이신 생합성 유전자인 *vldDEFG*의 발현이 발리다마이신의 생물학적 분해를 촉진할 수 있음을 확인하였다.

*vldDEFG*의 발현 실험을 진전시켜, *vldDE* 또는 *vldFG*가 발현된 *S. lividans* 형질전환체를 제조하고 같은 방식으로 발리다마이신 분해 능력을 측정하였다. pWHM3-*ermEp-vldDEFG*에서와 같이 *vldDE*, *vldFG* 각각 두 개씩의 유전자를 발현하는 재조합 플라즈미드를 구축하였다. 이들이 도입된 형질전환체에서는 50 mg의 발리다마이신을 공급하였을 시에 각각 32 mg과 15 mg의 발리다마이신에 해당하는 trehalase 저해 활성이 확인되었다. 따라서 *vldF*와 *vldG* 두 유전자를 발현하였을 시에 발리다마이신 생합성의 역반응이 진행되어 발리다마이신이 분해되는 것을 확인할 수 있었다.

최종적으로 *vldFG*에 의한 발리다마이신의 생분해를 통하여 α -glucosidase 저해 활성 물질 (발리엔아민 또는 발리다민)이 축적되는 지를 확인하기 위하여 *vldDE* 또는 *vldFG*가 도입된 형질전환체 배양체 (50 ml)에 발리다마이신 (50 mg)을 투여하고 배양하였다. 배양체에 황산을 가하여 산도를 조정하여 pH값이 3.0에 도달하도록 한 후 원심 분리하여 배양액을 확보하였다. 배양액의 pH를 4.5로 재조정 한 후 IRC-50 (H+)에 적용한 후 1 N 암모니아수로 용출하여 시료를 확보하였다. 1N 암모니아수 용출액은 감압 농축한 후 α -glucosidase 저해 활성을 측정하는 데 사용하였다. α -glucosidase 저해 활성 측정은 본 연구진이 대한민국 특허 10-0761340-0000에 기술된 바에 따라 진행하였다.

α -glucosidase 저해 활성 측정에서 발리엔아민을 표지물질로 하여 저해 물질을 정량하였다. 결과적으로 pWHM 형질전환 대조균 및 *vldDE* 형질 전환체에서는 유의성 있는 수준의 α -glucosidase 저해 활성을 검출하지 못한 반면, *vldF*와 *vldG* 두 유전자가 발현된 형질전환체에서는 1~2 mg 발리엔아민에 해당하는 α -glucosidase 저해 활성이 존재함을 확인하였다.

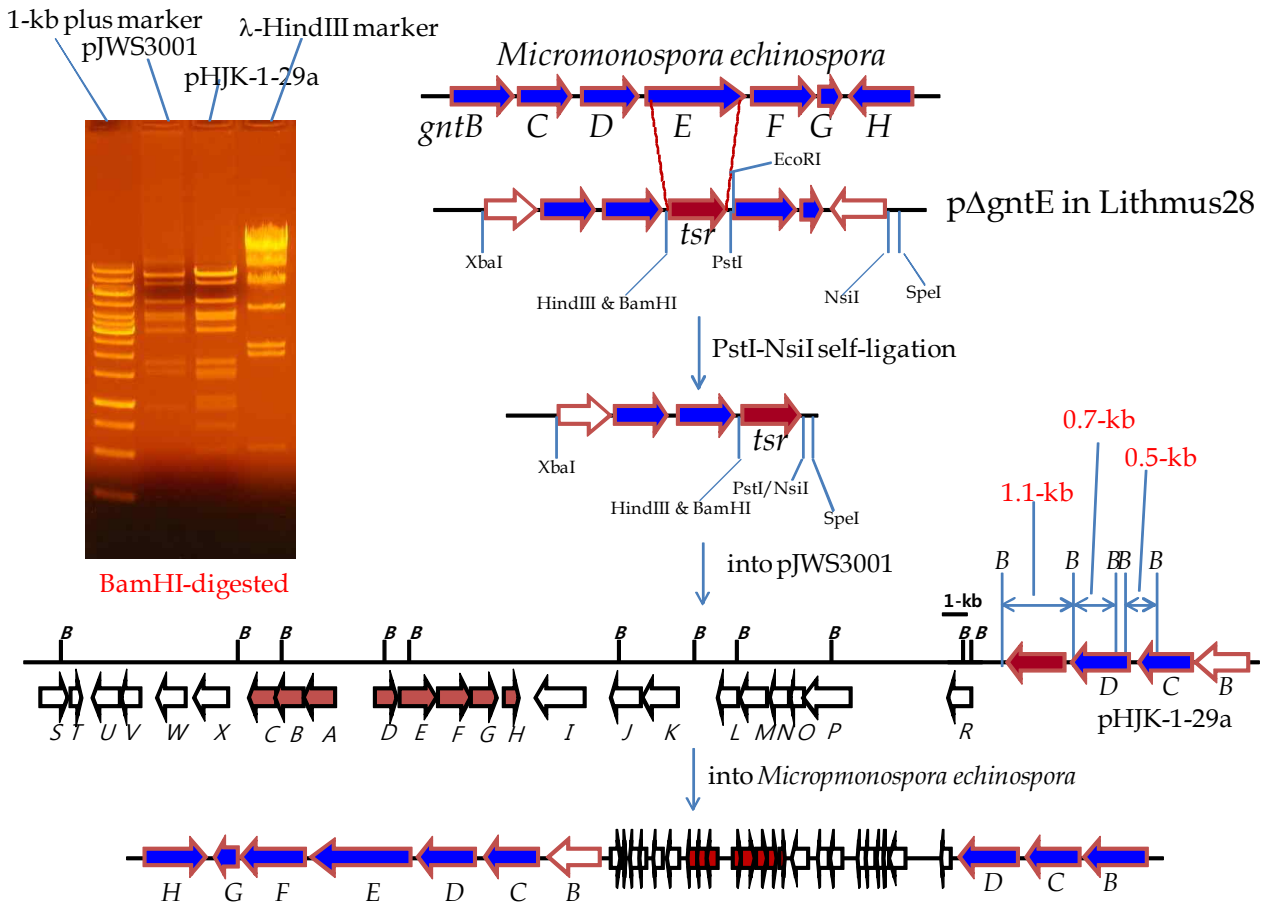


본 연구 성과는 발리다마이신 생합성 유전자를 활용하여 발리다마이신 생분해를 유도할 수 있으며, 이와 함께 α -glucosidase 저해 활성 물질의 생산을 도모할 수 있는 최초의 발견으로 국내 특허 출원을 완료하였다. 그러나 발견의 독창성에 비하여 산업적 타당성을 확보하려면 현재 단계의 수율을 획기적으로 개선하여야 한다는 것이 주관 기업의 평가이며, 이러한 배경에서 산업적 공정 개발로 전개할 수 없는 점이 아쉬움으로 남는다.

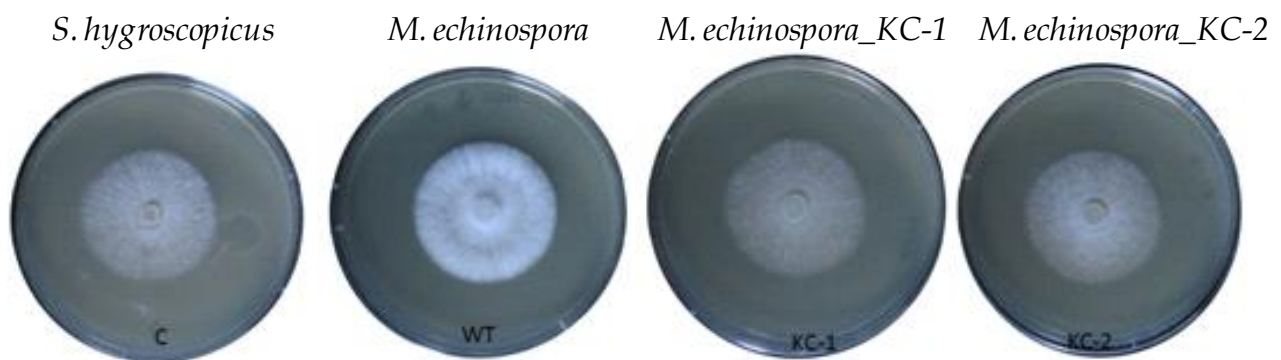
3-3. *Micromonospora echinospora*에서 발리다마이신 생합성 유전자 발현

*Micromonospora echinospora*는 상용화 항생제인 gentamicin 생산 균주이다. 본 연구진은 gentamicin 생산 산업 균주를 보유하고 있으며, *Micromonospora echinospora*에서 gentamicin 생합성 유전자에 대한 유전자 재조합 연구를 진행한 바 있다. 이러한 기반에서 발리다마이신 생합성 유전자를 *Micromonospora echinospora* 균주에 도입하여 gentamicin과 발리다마이신을 동시에 생산하는 균주를 개발하는 기술을 수립하는 연구를 수행하였다. 또한 두 가지 유사당 천연물질의 생합성 유전자들을 통합함으로써 새로운 생리 활성 물질의 창출을 기대할 수도 있을 것으로 기대하였다. 기술의 기반 수립 차원에서 유전자 재조합이 용이한 공시 균주를 활용하였다.

Homologous recombination을 통하여 발리다마이신 생합성 유전자군을 *Micromonospora echinospora* 유전체로 도입하기 위하여 기 제작된 *gntE* 불활성화 plasmid를 활용하였다. 구체적으로는 3-kb 단편 (*gntB-gntC-gntD*)과 thiostrepton 내성 유전자 (*tsr*)가 연결된 DNA 단편을 XbaI-SpeI 절편으로 확보한 후 발리다마이신 생합성 유전자군이 포함된 pJWS3001의 vector에 존재하는 XbaI site에 subcloning 하였다. 얻어진 pHJK-1-29a (pHJK3001 plus *gntBCD* and *tsr*)를 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 활용한 intergeneric conjugation 기법에 적용하여 *Micromonospora echinospora* 균주로 도입하였다. Gentamicin 생산 배양 조건 및 발리다마이신 생산 조건에서 배양하여 gentamicin 생산과 발리다마이신 생산을 검증하였다.



얻어진 *M. echinospora* 균주 (KC-1, KC-2)를 발리다마이신 생산 배지에서 배양한 후 배양액을 배지에 첨가하여 *Rhizoctonia solani* 저해 활성을 관찰하였을 시에 *S. hygroscopicus*와 유사한 저해 활성을 관찰할 수 있었다. 이는 발리다마이신 생합성 유전자군을 용이하게 유용 균주 (산업적 발효 균주 또는 바이오컨트롤 균주) 등에 도입할 수 있는 기술이 수립되었음을 의미한다.



3-4. 발리다마이신 생합성 유전자 특성 규명 및 당전이 기작 규명

언급된 바와 같이 VldE 단백질을 *E. coli*로부터 soluble 한 형태로 얻을 수 있었기에 이 단백질의 활성을 생화학적으로 검증하는 연구를 진행하였다. VldE은 glycosyltransferase 인 것으로 예측되었으며, 그 서열을 NCBI-Blast 상에서 분석하여 보면 trehalose-6-phosphate syntahse와 높은 상동성을 보임을 알 수 있었다.

그러나 VldE의 구조적 특성을 자세히 살펴보면 OtsA와는 다른 점을 찾을 수 있다. *E. coli* OtsA에서 UDP-glucose 상호 작용하는 잔기는 Gly22, Asp130, His154, Arg262, Lys267,

Asp361, Glu369로 제안되어 있는 데 이들에 해당하는 모든 잔기를 VldE에서 찾을 수 있다 (VldE 서열상의 Gly33, Asp158, His182, Arg290, Lys295, Asp383, Glu391). 그러나 OtsA의 또 다른 기질인 glucose-6-phosphate와 상호 작용하는 잔기 (OtsA 서열상의 Arg10과 Tyr76)는 VldE에서는 보존되어 있지 않음을 확인할 수 있다 (VldE 서열상의 Asp20, Gln97). 이와 같은 유전자 분석에 근거하여 VldE는 UDP-glucose를 sugar donor로 사용하는 glycosyltransferase인 것으로 예측할 수 있었으며, 발리다마이신 생합성과 상관하여 볼 때 sugar acceptor는 발리독실아민 또는 그 외의 중간체일 것일 것으로 예측할 수 있었다.

이와 같은 맥락에서 본 연구진이 찾고자 하였던 발리다마이신 생합성 최종 효소가 VldE이라는 가설 하에 recombinant VldE 단백질이 발리독실아민과 UDP-glucose를 활용하여 발리다마이신을 생합성 하는 활성을 갖추고 있는지 조사하였다.

```

1
VldE      1  MTGSEI AKRRAIT YDTPATGEP FWLAPGGT G NVVAEQAGVL NNSASADS EDIFRASALN PDGVTMELHS GRIEVLIR HDPWFRNVQ NFMTANWVA ANNYGWRWT QSFGSDAE
STIAU_4463 MSREFLLAGRAPVT YHRD-VSGAL TELAPGTA NVVADASQL QVSNIAOMT DEDRVASOH PRGMEVKVSA AMELHLLQ HDPWFCMQ EI ITADLWA SNNLWGWT KPTFDTRSHR
SCO4290  MASSFGAAQV ASVRGPVS YEVR-EDGSL HAKRGGQLV SGLSAI GPDA GALWVCSALS DGFEAVR-----6 VGEDGVRMLD VPADHADAY NGIANSVLWF YHMLYQTPL EPVFDAEFR
OtsA      MSAL VSNIAPDE HASAGLAV GILGALKAAG QLWFGWGET GNEDQPLK-----K KNITWASFN LSEQLEDY NDSVAVLWP AFHYRLD-----LVQFR
Consensus ..... as.r.l.y.r.a.g.hA.aggv ..l.al.....g.w..sat. #f.....g.i.....v..#.y..n.vSW.ahy..#..pf...r

131
VldE      131 GADFGRFTR DFADILKSS AQSADRYLV HDYQLVGVPA LLFEQRPDAP ILLVHIPWP SADYWRILPK EIRTGILHGM LPATTIGFFA DRWRNFLES VADLPDARI DREAMEWR GHRTRLRTMP
STIAU_4463 AKHFETFTE FATILLES KACPNRYLL HDYQMGVPQ HLFAQRPEAP QLEVHIPWP SADYWRMLPR PMREGLRM LGADVIAFFA TRWRNFLAC VEDLLPEARV DVBATVRWE GRAVREAMA
SCO4290  QASYEAYR AFAEALAEEA AEGA-VAIV QYH.TLVPG MLFELRPDLR IGFSHTWPA PLYFRLPD DIAEQVRGM LGADRLFLT RWADAFTAC CDAVW---- GLGGTE IGVHGLGADGDFLR
OtsA      AMDGLRWVA LLAQKLLPLL QDDD-IIWI HDYHLPFAH EFKRGVWNR IGFFLHIPPT TREIFNALPT --YDTLEQ CDYLLGQT ENDRLAFLDC LSNLTRVTTR SAKHTAWGK AREVYPIG
Consensus aW.#.r.n..f.AD.l.....!..hdYh..vp..LR.r#.r ig.F.HIPw..#yf.LP.....IL.gS..l.ad.ig.t..rw..af.c.....s.t.....g.rfv...

261
VldE      261 LGYSPLTDG RNPQLPE--G IEWADGHRLVHSGRTDPI KNAERAVRAF VLAARGGQL EKTRMRMN -PNRLYPAN ADYHRVETA VAEAELS D--TVR-ID NDNWHTA CFRRADLLIF
STIAU_4463 LGYSPRDI REGEVSP--E LAAWIGDPLVHSGRTDPI KNAERAVLAF TALQEDPGL RHARLUKMN -PNRLSEAN OQYRERVGRA VEARSLGT E--TVR-LV CTNSVNGTF ALRRADVLL
SCO4290  KRSHADVEE RMAELRE-Q IGE--GRRT IRVDRTELS KNIVRGLLAY RELLAGREW RERVWAFA YPSRQLAW REYTAEVERV ANAWEEFST RWTPW-LN LKDDFARSLA AYRADVALV
OtsA      IEPKIAKQA AQLPKLAK LKAELKNVQN IFSVERLDYS KGLPERLAY EALLEKYQH HGKIRYTQA PTSRGDVQY QDIRHQLENE AGRINGKYG LGWTRLYLN QHFDRKLLMK FRYSDVGLV
Consensus ...e.a.#.r.p..q..l.a.....!.v.Rt#.s Kn..r..IA#.al..p.....V.a..psR.dv.ay qyrh.ve..a..N..G..gwtpv..ln..d.....a..fr.adv..lv

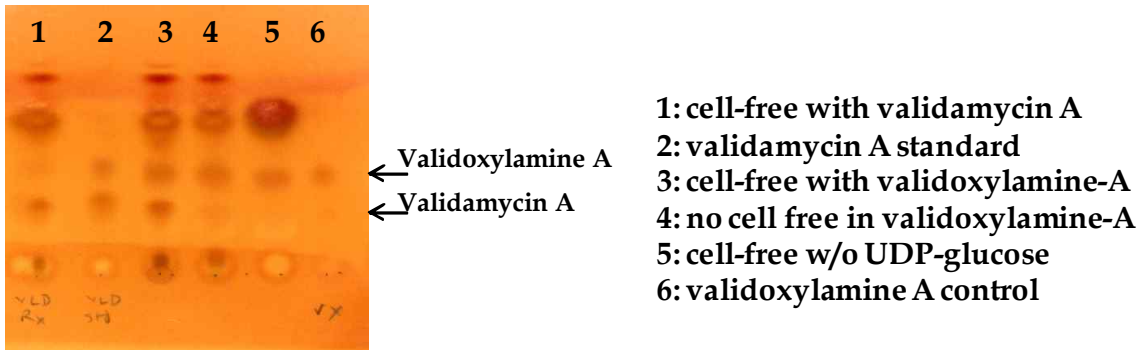
391
VldE      391 NSTVQQNLS TREAPLVE--RDADVLSE TGAEVLGE YCRSNPFL VEQAEISA LAAGPRPAE AARRDAAR PWTLEWQA QLDQAADHA ATATAERD TAPAVSTRD L
STIAU_4463 NSTVQQNLT AFEGTLFN--RDAVLLSE RGAEALAS VSRLVNPFDI VEQAQLREA LRASPAERAE AARREVL QYLPTWVRH QLSSLGLGEA PGDRR
SCO4290  NPVRDQINLV AKEVPVSD--TGCALVLSR EAGAYELGE DVVNPYDV VGTADALHAA LGLPAGQRAE RSKRLAAAGT ALPPAIFLE QLEALRG
OtsA      TLRDQINLV AKEVAADP ANPQLVLSD FAGANELTS -ALIVNPYDR DEVAALDRA LTMSLAERIS RHAEMLDVIV KNDINHQEC FSDLK-QIV PRSAESQQD KVATFPKIA
Consensus np.rDGMNLv akE.....#.....v!ILS..aGA#eLS..a.VNP%D..ve.A.A..L..sa#Re.r.ar..dv..d..W... qls.L..... pra.....d.....a..

```

VldE와 trehalose-6-phosphate synthase 들과의 유사성 비교. OtsA는 *E. coli* 유래의 trehalose-6-phosphate synthase로서 단백질 구조 연구를 비롯하여 구체적인 규명 연구가 되어져 있다. SCO4290은 *S. coelicolor* genome 상에서 trehalose-6-phosphate synthase를 coding 하는 것으로 추정된 유전자이며, STIAU 4463은 *Stigmatella aurantiaca* genome 상의 유전자로서 그 유추 아미노산 서열이 VldE와 높은 유사성을 보인다. 기질 STIAU 4463 주위의 유전자 구성을 살펴보면 validamycin 생합성의 핵심 유전자 부위 (vldABCDEFGH)와 매우 유사함을 알 수 있다.

pET24b-VldE (이 construct에서는 VldE에 6X histidine tag이 붙지 않음)를 E. coli BL21으로 형질전환한 후 cell-free reaction을 진행하였다. Cell pellet을 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and 5% glycerol)에 현탁시킨 후 sonication을 통하여 cell을 분쇄하였다. 분쇄된 현탁액을 원심분리한 후 상등액을 취하고 60% ammonium sulfate 침전을 진행하였다. 얻어진 침전물을 최소량의 lysis buffer에 다시 현탁한 후 dialysis를 진행하고 얻어진 단백질 조추출물을 활용하여 cell-free reaction을 진행하였다. Reaction buffer는 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM NH₄Cl, 10 mM UDP-glucose (disodium salt), 5 mM 발리독실아민-A (validoxylamine A)로 구성된다. 100 µl의 reaction buffer에 50 µl의 단백질 조추출액 (~1.5 mg/ml)을 가한 후 30 °C에서 1시간동안 방치하였다. 이 후 TLC를 통하여 반응액을 분석하였다. TLC 분석에는 Silica gel TLC plate (Kieselgel 60

F254, Merck)를 사용하였으며, 전개 용매로는 butanol/methanol/chloroform/25% ammonium hydroxide (4/5/2/5)를 사용하였다. 전개가 완료된 후 0.2% ninhydrin (in alcohol) 반응으로 화합물을 검출하였다. 이상의 결과를 통하여 VldE 단백질이 발리다마이신 생합성의 마지막 단계를 촉매하는 효소임을 확증할 수 있었다.



단백질 조추출물을 활용한 VldE의 반응 분석

3-5. 발리독실아민 생산 균주 개발

발리독실아민 생산 균주의 개발에 있어서는 그 기능을 확인한 *vldE*를 불활성화하는 전략을 채택하였다. *vldE* 유전자의 불활성화를 달성하기 위하여 *vldE*를 포함하는 7-kb 단편을 *NsiI-StuI* 절단으로 pJWS3009로부터 분리하여 pLithmus28에 sucloning 하였다 (pHJK-1-27a). pHJK-1-27a를 *SacI*으로 *vldE* 내부를 절단한 후 pIJ778 유래의 1.4-kb *EcoRI-HindIII* 단편 [*oriT* (conjugal transfer *ori*), *aadA* (streptomycin, spectinomycin 저항성 유전자)]과 연결하였다. 이때 Klenow 처리를 통한 blunt-end ligation을 수행하였다. 이때 *aadA*가 *vldE*와 같은 방향으로 배치된 pHJK-1-28a와 반대 방향을 배치된 pHJK-1-28b를 확보하였다. pHJK-1-28a를 *SpeI-NsiI*으로 절단한 후 pUO909으로부터 1.5-kb *SpeI-PstI* 단편으로 얻어진 aparmycin resistance cassette와 연결하였다. 이상의 과정을 통하여 *vldE* inactivation construct인 pHJK-1-28d를 완성하였다.

발리다마이신 생합성 유전자군 근방에는 또 하나의 glycosyltransferase 유전자인 *vldK*가 존재한다. 발리독실아민의 생성은 glycosyltransferase 활성을 제거하여 달성할 수 있다. 본 연구진은 선행 연구를 통하여 VldE 효소가 발리독실아민에서 발리다마이신을 생합성하는 glycosyltransferase로 제안한 바 있다. 그러나 생물학적으로 VldK 또한 glucose를 붙이는 기능을 수행할 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 *vldE* inactivation construct와 함께 *vldK* inactivation construct를 제조하였다. *vldK* inactivation construct의 제조는 발리다마이신 생합성 유전자군 중 *vldK*를 포함하는 5.3-kb *KpnI-BglIII* 단편을 활용하여 제조하였다. 5.3-kb *KpnI-BglIII* 단편을 pJWS3001에서 분리하여 pUC18의 *KpnI-BamHI* site에 subcloning 하였다 (pHJK-1-45a). pHJK-1-45a를 *MunI* 효소를 사용하여 *vldK* 내부를 절단한 후 2.0-kb *EcoRI* 단편의 streptomycin 내성 유전자 cassette (*aadA* in pHP45 Ω)와 결합하였다. 이때 Klenow 처리를 통한 blunt-end ligation을 수행하였다. 이때 *aadA*가 *vldK*와 역방향으로 배치된 pHJK-1-45c와 같은 방향으로 배치된 pHJK-1-45d를 확보하였다. pHJK-1-45c의 insert를 *EcoRI-XbaI* 단편으로 분리한 후 pKC1139에 삽입하여 *vldK* inactivation plasmid를 제조하였다.

이상을 통하여 확보된 *vldE*, *vldK* inactivation plasmid를 발리다마이신 생산 균주

*Streptomyces hygrosopicus*에 적용하여 발리독실아민 생산 균주의 개발을 시도하였으나 파악되지 않는 기술적 문제로 유전자 불활성화를 달성하지 못하였다. 이에 대한 대안으로서 REDIRECT 기법을 활용하여 pJWS3001에서 *vldE* 및 *vldK*를 불활성화하는 실험을 진행하였다. REDIRECT 기법에 활용된 PCR primer는 다음과 같다.

vldK-forward

5'-TCCCCCTGGCGTGTATGCGTAACTCGACCCCAAGTCCATATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'

vldK-reverse

5'-TGAGCTCGCGATCCGGTGCGCCTCCTTGGTGAACGCCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'

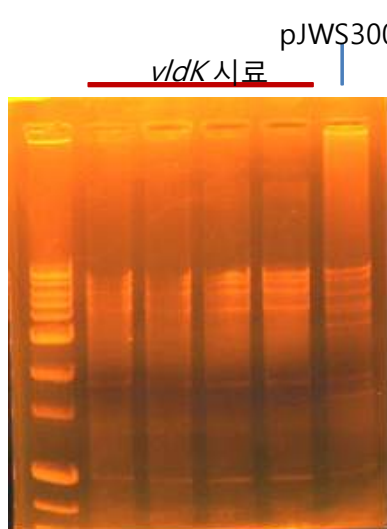
vldE-forward

5'-AAGCGCGCGGCGATCACCTACGACACCGACCCCGCCACCATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'

vldE-reverse

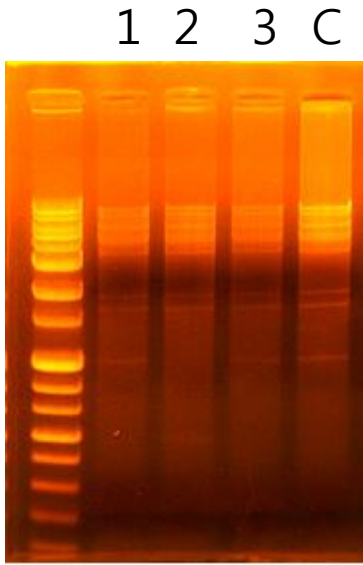
5'-TGCGGTGTCGAAGCGCTCAGCGTTGCCGTGCGGGCGGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'

이상의 primer set를 사용하여 pIJ778 유래의 1.4-kb streptomycin 생합성 유전자를 증폭하였다. 증폭된 단편을 pJWS3001을 함유한 *E. coli* BW25113/pIJ790 균주에 electroporation을 통하여 도입하였다. *vldK*의 경우 얻어진 4개의 colony를 조사하였을 시에 의외로 *vldK* 이하의 downstream 영역이 모두 소실되었음을 확인할 수 있었다.



참고로 *vldK*는 3.2-kb BamHI 단편에 존재하며, 3.2-kb BamHI 단편의 downstream에는 1.6-kb, 3.0-kb, 5.2-kb의 단편들이 존재한다. *vldK* 시료에서는 1.6-kb, 3.0-kb, 3.2-kb, 5.2-kb band가 모두 소실되었으며, ~6-kb band가 새롭게 생성되었음을 알 수 있다. 모든 시료에서 동일한 패턴이 관찰됨에 따라 본 현상은 실험적 과오가 아닌 파악되지 않은 원리에 지배된 현상이라 판단되었다. *vldK* 유전자에서 primer 작성 위치를 달리하여 시도하였을 시에도 downstream 영역이 소실됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 보고된 바 없는 매우 흥미로운 현상이지만 현재로서는 그 원리를 추론할 수 없다.

*vldE*의 경우 의도한 바와 같이 *vldE* 유전자 부위 (1.0-kb, 8.4-kb BamHI 단편에 걸쳐서 위치함)에서 특이적인 변화가 일어남을 관찰할 수 있었다. 3개의 clone을 조사하였을 시에 2개의 clone (1, 3번)은 pJWS3001이 존재하며, 하나의 clone (2번)에서 *vldE* 유전자 영역이 streptomycin 내성 유전자로 치환 (1.0-kb band가 0.5-kb band로 치환됨) 되었음을 확인하였다. 옆의 그림에서 C는 pJWS3001을 지칭한다.



얻어진 2번 clone을 *E. coli* BT340 균주에 도입함으로써 streptomycin 내성 유전자를 삭제하여 pJWS3001- $\Delta vldE$ 의 작성을 완료하였다.

pJWS3001, pJWS3001- $\Delta vldE$, pOJ446 (vector)를 각각 *Streptomyces lividans* 1326 균주에 도입하였다. pOJ446가 도입된 균주에 비하여 pJWS3001이 도입된 균주에서 생장이 느림을 관찰할 수 있었으며, pJWS3001- $\Delta vldE$ 의 경우는 pJWS3001에 보다는 생장이 더 지연됨을 관찰할 수 있었다. 이는 유전자 발현이 균주 성장에 좋지 않은 영향을 주기 때문이라 판단된다. 성장 저해를 극복하기 위하여 selection marker로 사용한 apramycin의 농도를 50 mg/L에서 15 mg/L로 감소시키고, 배양 온도를 37°C로 제공하였다.

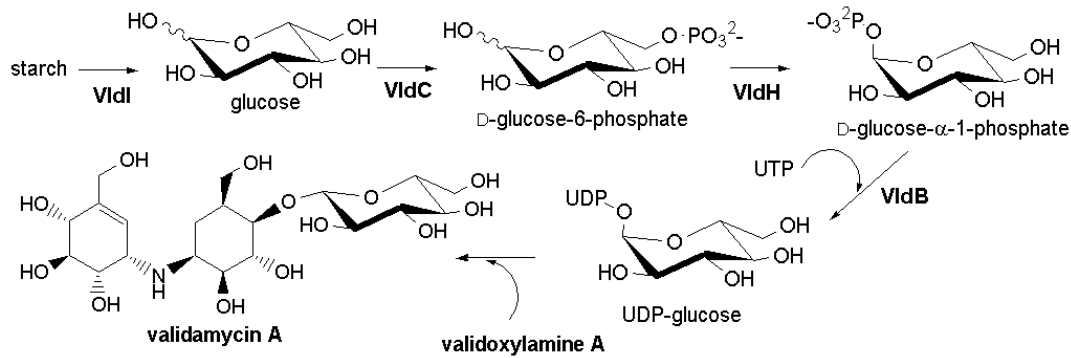
얻어진 균주에 대하여 *Rhizoctonia solani*에 대한 저해 활성을 조사하였을 시에 pJWS3001- $\Delta vldE$ 균주에서 pJWS3001 균주와 유사한 수준의 활성이 관찰되었다. 이는 pJWS3001- $\Delta vldE$ 균주에서 발리독실아민이 생산되었음을 시사하여 주는 결과이며, 향 후 발리독실아민의 생산을 화학적으로 증명하는 실험 (HPLC, MS)을 완수하고자 한다.

3-6. 발리다마이신 생합성 유전자 상의 *vldC*, glucokinase 유전자의 기능 확인

본 연구진은 선행 연구에서 발리다마이신 생합성 유전자상의 VldI를 glucoamylase로 VldC를 glucokinase로, VldB를 UDP-glucose synthase로 확인한 바 있다. 이를 기반으로 VldH를 phosphohexomutase로 제안하고, VldI-VldC-VldH-VldB로 이어지는 일련의 효소 반응을 통하여 UDP-glucose를 생합성하는 경로를 제안하였다. 그러나 연구진과 경쟁 관계인 Oregon 주립대의 Mahmud 교수 연구팀은 VldC는 glucokinase가 아닌 C7-cyclitol kinase 인 것으로 보고하였다 (ChemBioChem, 2007, 8:632-641). Glucokinase로서의 VldC의 기능을 부정하는 것은 VldH, VldB의 기능이 UDP-glucose 생합성에 관여한다는 가설로 부정하는 것이며, 나아가 발리다마이신 생합성이 *vldADEF*G 다섯 개의 유전자로 이루어진다는 본 연구진의 발견을 부정하게 되는 것이다. 따라서 본 연구진은 현 단계에서 VldC의 기능을 재확인할 필요가 있다 판단하였다.

본 연구진의 VldC를 glucokinase로 지정할 당시 pET32a에서 recombinant 단백질을 확보하였으며, 이때 생성되는 recombinant VldC는 N-terminal에 thioredoxin-tag, 6XHistidine-tag, S-tag를 보유하게 된다. 반면 Mahmud group은 VldC (기실 VldC ortholog, ValC로서 VldC와 단지 3개의 아미노산만 다르다.) 단백질을 pRSET-B를 통하여 N-terminal 6XHistidine-tag recombinant로 획득하였다. 두 경우 모두 recombinant 단백질을 사용하였으므로 이들의 기능에 대하여서는 반론의 여지가 존재한다 할 수 있겠다. 따라서 이에 대한 검증으로서 *vldBC* 유전자 영역을 그 고유 promoter 영역과 함께 site-specific integration vector인 pSET152에 삽입한 후 *S. lividans*에 도입하였다. 얻어진 형질전환체를 pSET152 대조군 형질전환체와 함께 배양한 후 cell-free extract (일반적인 ammonium sulfate 침전을 통하여 단백질 조추출물을 확보)를 준비하였다. 얻어진 추출물을 이용하여 glucokinase 활성을 측정할 시에 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 NADP를 첨가하여 340nm에서 반응의 진행을

추적할 수 있도록 하였다. 결과로 pSET152 대조군의 경우 0.026, 0.024의 측정치를 보여 NADPH의 생성이 거의 전무함을 확인할 수 있었으며, 반면에 *vldBC* 도입균주는 0.255, 0.235의 측정치를 나타내었다. 이상의 실험을 통하여 VldC는 최소한 *Streptomyces*에서는 glucokinase 활성을 보유함을 확인하여 본 연구진이 구축한 발리다마이신 생합성 경로에 문제점이 없음을 확인하였다.



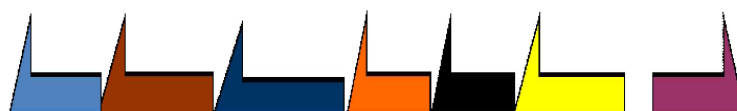
3-7. 발리다마이신 유전자원 발굴

확보된 발리다마이신 고생산 균주의 생산성을 한 단계 더 개선하기 위해서는 발리다마이신 생합성 유전자를 인위적으로 과발현시키는 대사공학 기법을 실행할 수 있을 것이다. 그러나 생산성이 liter 당 3g에 도달한 균주의 경우 내재된 발리다마이신 생합성 유전자의 발현은 이미 최적화에 근접하였다고 판단할 수 있다. 인위적으로 유전자 전사를 촉진한다 하여도 translation 단계에서 한계에 도달할 가능성이 높은 것이다. 따라서 생합성 효소의 과발현을 유도함에 있어 내재된 발리다마이신 생합성 유전자의 ortholog들을 차용한다면 상대적으로 생산성 증대를 기대할 가능성이 높을 것으로 예상된다. 즉 *Streptomyces* 이외의 균주에서 발리다마이신 생합성 유전자를 발취하여 고생산 균주의 재조합에 활용한다는 것이다. 이러한 가능성을 실현하기 위하여 *S. hygroscopicus* var. *limoneus* 유래 생합성 유전자를 활용하여 NCBI Genbank 상의 서열들을 면밀하게 검색하였다. 본 작업은 제 2 협동과제의 권형진 교수 연구팀이 수행하였다. 검색 결과 *Stigmatella aurantiaca* 균주의 genome 서열에서 *vldABDEFG* ortholog 들의 cluster를 발견하였다.

본 연구진은 독일 연구진 (ZMBH, Wulf Plaga)으로부터 *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 균주를 공급받아 PCR 기법을 통하여 해당 유전자 부위를 분리하였다.

3-7-1. *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1로부터 발리다마이신 생합성 유전자원 분리

Stigmatella aurantiaca DW4/3-1 균주는 *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*와 같이 유용 이차대사산물의 보고를 알려져 있다. 현재 다수의 *Streptomyces* 균주의 genome 서열이 공개되고 있으며, 이와 같은 맥락에서 *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 균주의 genome 서열이 NCBI GenBank에 공개되어있다. *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 균주의 genome 상의 *vldABDEFG*의 cluster의 구성은 다음과 같다.



그림에 보여지 듯이 *vldADEF*G (하나의 hypothetical 유전자 포함)는 operon 형태를 취하고 있다. 이들 유전자의 분리를 위하여 PCR 증폭을 시도하였다. 이때 *vldADEF*G를 포함하는 약 7-kb 영역을 증폭하는 시도가 실패하여 *vldAD*, *vldEFG* 두 개의 단편으로 증폭을 진행하였다. 또한 *vldB*를 독자적으로 증폭하였다. 이때 사용된 primer는 다음과 같다.

vldA-vldD

forward: ATTCTGCAGCTCGGCCGGTGAGCGCCCCCGAGAC
reverse: CTTTCTAGAAAAACGCCGCATCGCCCGTTTCC

vldEFG

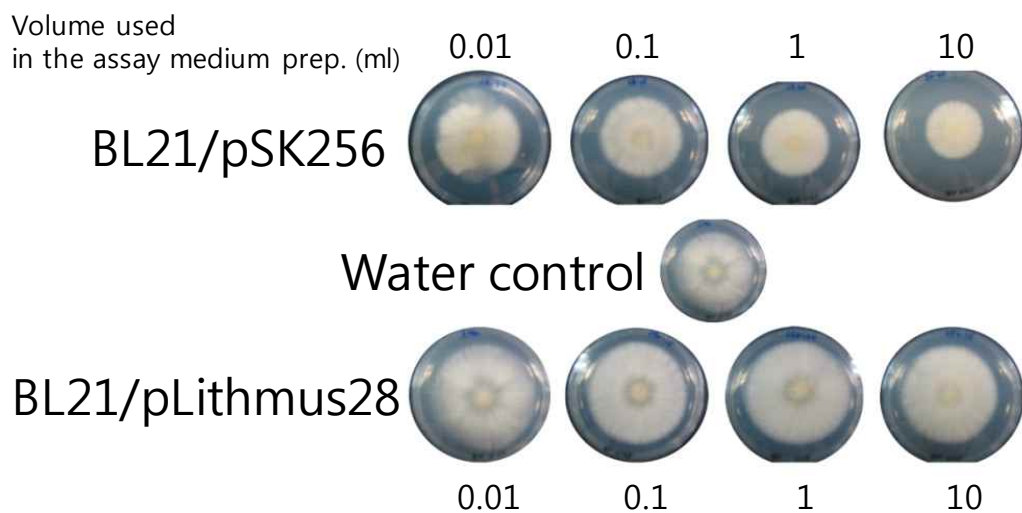
forward: ATTAAGCTTAGATTCCCCAGGCCCGTAGGCCA
reverse: CTTCTGCAGCCGGAGCTCTCCGGGCTGAGCATC

vldB

forward: CTTGGATCCCATGCAGCAAGAGGCTGC
reverse: ATTGAATTCGGAGAGCACGCAGGCCCG

vldAD 단편은 *Pst*I/*Hind*III으로 절단한 후 pBluescript-SK에 subcloning 하였다. *vldEFG* 단편은 *Hind*III/*Pst*I으로 절단한 후 pBluescript-SK에 subcloning 하였다. *vldB* 단편은 *Eco*RI/*Bam*HI를 절단한 후 pLithmus28에 subcloning 하였다. 이들 세 개 단편을 pLithmus28에 순차적으로 연결하여 pSK256을 완성하였다.

Stigmatella aurantiaca DW4/3-1 유래 *vldABDEF*G를 활용하여 발리다마이신의 생산을 유도할 수 있는지를 확인하기 위하여 pSK256을 *E. coli* BL21에 형질전환하고 IPTG induction을 수행하였다. 이때 유전자의 발현은 pLithmus28에 장착된 두 개의 T7 promoter에 의하여 이루어지게 된다. BL21/pSK256와 BL21/pLithmus28의 LB 배양체의 상등액을 위한 후 이들 사용하여 assay 배지를 준비하고, *Rhizoctonia solani*를 접종하였다. 다음 그림에 보여지듯이 미비하지만 *Rhizoctonia solani* 생장을 저해하는 활성이 BL21/pSK256 배양액에 존재함을 확인할 수 있었다. 이후 *Streptomyces* 이종 발현을 진행하였다.

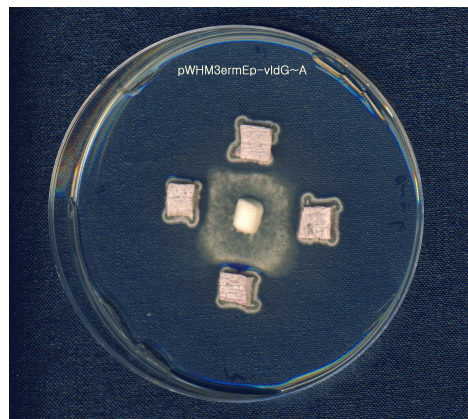


3-7-2. *Stigmatella aurantiaca* DW4/ 3-1 유래 발리다마이신 생합성 유전자원의 *Streptomyces* 이중 발현

본 단계의 실험은 기초 학문적으로 새로운 발리다마이신 생합성 유전자군을 동정하여 생합성 최소 유전자 set의 확립에 활용하고, 이를 바탕으로 본 연구진이 제안한 생합성 경로를 재확인하고자 한다. 응용적 측면에서는 발리다마이신 고생산 균주에 개량에 활용하고자 한다. 후자의 경우 해당 유전자의 발현이 *Streptomyces*에서 발리다마이신 생합성을 유도할 수 있음을 확인하는 작업이 선행되어야 한다.

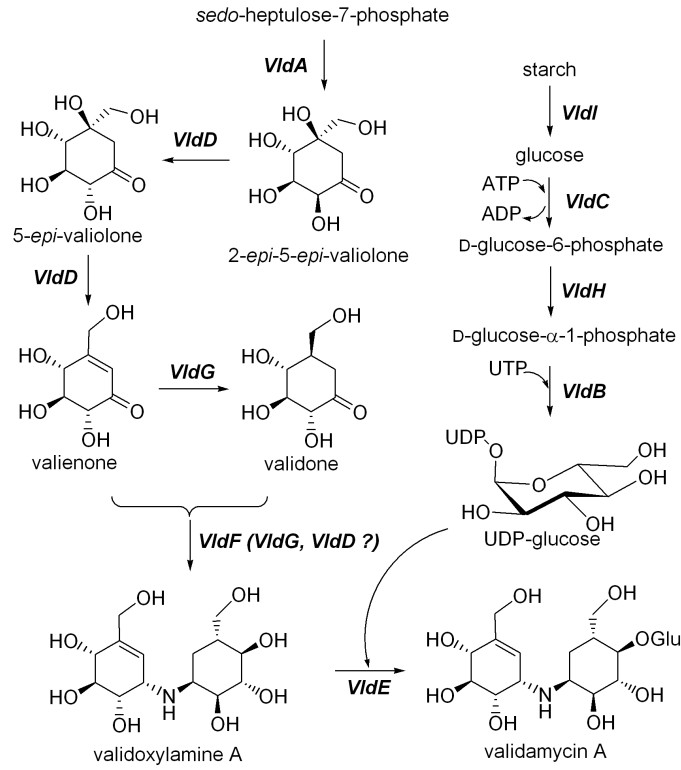
Streptomyces 내의 이중 발현을 위하여서는 *ermE* promoter (*ermEp*)가 장착된 pWHM3를 사용하였다. pBluescript-SK에 cloning된 6.8-kb *vldADEF*G 단편을 *Xba*I-*Hind*III fragment로 취한 후 pWHM3에서 *ermEp* 하단에 장착하였다 (pWHM3-*ermEp*:*vldADEF*G). *vldB*의 동시 발현 벡터 구축을 위하여서는 pLithmus28 clone에서 *vldB* 단편을 *Bgl*III-*Xba*I fragment로 취한 후 pWHM3-*ermEp*:*vldADEF*G에서 *ermEp* 하단에 장착하였다 (pWHM3-*ermEp*:*vldB-vldADEF*G).

pWHM3-*ermEp*:*vldB-vldADEF*G를 *Streptomyces lividans*에 도입한 후 *Rhizoctonia solani*에 대한 저해활성의 생산을 조사하였다. 다음 그림에 보여지듯이 형질전환체에서 *Rhizoctonia solani*에 성장 저해에 대한 positive한 결과를 관찰하였다.



3-8. 발리다마이신 생합성 경로 수립

이상의 실험 결과들과 bioinformatics를 통한 유전자 기능 분석을 통하여 발리다마이신 생합성 경로를 확립할 수 있었다.



*Streptomyces hygroscopicus var. limoneus*에서 발리다마이신의 생합성 경로

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제는 발리다마이신 및 발리엔아민 생산에 대한 기반 기술로서 유전자 활용 기술을 수립하고자 하였으며, 실용화 기술로서는 산업화가 가능한 생산 공정의 수립을 목표로 하였다.

산업화 기술의 경우 발리다마이신 고생산 균주 (8 g/L)를 성공적으로 개발 완료하였으며, 해당 기술의 상용화 가능성을 확인하였다. 구체적으로 발리다마이신 제품을 저가에 생산하여 국내 농업 분야에 항세균 및 항진균 농약 원제로서 공급할 수 있는 점과 제약 산업에 보글리보즈 생산 원료를 공급할 수 있는 있게 되었다. 이는 국내 발효 산업 및 무공해 농약 생산 분야의 발전에 현격한 기여를 하게 될 성과로 평가된다.

이와 같은 '발리다마이신의 공급'에 그치지 않고 발리다마이신 고생산 균주를 바이오컨트롤 제제로 개발할 수 있는 가능성을 확인하여 농업 관련 연구소 및 기업과 기술 협약을 체결하여 그 실용화를 진행하고 있다. 또한 본 과제에서 생산된 발리다마이신을 활용하여 발리엔아민을 생산하는 공정을 자체 수립하였으며, 이를 참여 기업이 기존에 보유한 보글리보즈 생산 공정에 적용하는 연구가 완료된다면 국내 독자 기술로서 보글리보즈를 생산하여 판매하는 것이 가능해 질 것이다.

이와 같은 단기성 기술 확보 이외에도 친환경 녹색 촉매 기술의 개발의 일환으로서 발리다마이신 생합성 유전자원을 활용한 다양한 부가가치 창출 기술의 개발을 달성하였다. 연간 100억 원이 넘게 수입되고 있는 발리다마이신은 주로 중국에서 생산되고 있는데, 최근 중국 정부가 올림픽 대회 개최이후, 환경규제를 대폭 강화하여 수입가격이 상승하고 있는 추세이다. 또한, 발리다마이신 생산 원가에서 분리정제 비용이 60%이상 차지하고 있는 점 등을 착안하여 이를 절감할 수 있도록 국내에서 대량 발효 생산하여 친환경 미생물제제로 이용하는 방안이 정부기관, 영농법인, 기업 등에서 주목하게 되었으며 이에 따라 각 기관 및 기업들과 본 연구에서 성공적으로 개발된 고생산 균주 및 기술의 이용 계약 및 협약을 성공적으로 체결하고 실용화에 박차를 가하고 있다. 그 일례로 화학농약을 사용하지 않는 '동부하이텍'의 친환경 유리온실 식물공장(새만금에 15만평 규모로 건설중임)에 실질적인 적용을 수행할 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구과제 수행을 통하여 **발리다마이신 고생산 산업 균주**를 개발하였다. 최종 연구목표인 5g/L를 성공적인 대량발효 수행을 통하여 발리다마이신을 8g/L인 세계 최고 수준까지 생산할 수 있다. 이와 같은 경제적 발리다마이신 생산 기술을 바탕으로 참여 기업체는 **발리다마이신의 산 가수분해를 통하여 발리엔아민을 생산하는 공정**을 수립하였다. 해당 공정의 경제적 타당성을 추산하여 발리엔아민을 제품화하는 방안을 모색하고 있으며, 보글리보즈 자체 생산 기술의 경제성을 확보하는 연구를 지속적으로 추진하고자 한다.

발리다마이신은 활용성이 높은 항진균 천연물 농약이다. 따라서 본 연구팀이 확보한 발리다마이신 생산 기술을 산업화하여 대량 생산하고 상품화하여 농업 현장에 적용이 가능하도록 하고자 한다. 이러한 노력의 일환으로 양평군 농업기술센터, 새아침 영농법인과 **기술실시협약을 체결**하여 발리다마이신 생산 균주를 이용한 **친환경 작물 보호제 실용화** 연구를 추진하고 있으며, (주) 동부하이텍과도 공동 연구를 통한 실용화 추진에 관한 계약을 체결한 바 있다. 구체적인 실용화 추진 내용을 다음과 같다.

1. 해당 고생산 균주(8g/L) 및 발효공정 기술을 **경기도 양평군 농업기술센터에 이전하여 농가에 생균제제로 살포**하는 실용화 실험을 진행 중이며, 향후 5년간 농민에게 혜택을 주는 목적으로 무상으로 실시하는 협약서를 체결하였다.
2. 1년간 동부하이텍과 **“발리다마이신이 생산균주 및 작물 보호제로 미생물 평가시험”**을 건설 중인 15만평 친환경 유리온실에서 실행할 계약을 체결하였다.
3. 경상북도 상주시 공검면 새아침 영농법인과 5년간 **“발리다마이신 생산 균주를 이용한 친환경 작물 보호제”**실시 협약서를 체결하였다. 정액실시료는 본 연구가 국가연구비로 지원되어 농민 및 농업법인에게 혜택을 주도록 한 목적을 달성하기 위하여 자체적으로 생산하여 사용하는 것은 무상으로 하였다. 단, 사업화여 판매가 되면 매출액의 5%를 경상실시료로 납부하는 것으로 협약되었다.

친환경 생물공정 기술 개발을 위한 유전자 재조합 연구를 다수의 신기술을 확보하였다. 이는 발리다마이신 생합성 유전자를 활용하여 발리다마이신을 분해하여 발리엔아민을 생산하는 균주 개발과 발리엔아민 자체를 생산하는 균주의 개발을 포함한다. 또한 발리다마이신 생합성 유전자를 타 산업 균주에 도입할 수 있는 기술의 수립 및 기존에 밝혀지지 않은 새로운 발리다마이신 생합성 유전자원의 확보 등이 해당 연구의 성과일 것이다. 이러한 친환경 기술들이 산업화 기술로 활용되고 있으며, 특히, 화학농약을 전혀 사용하지 않는 ‘동부하이텍’의 친환경 유리온실 식물공장(새만금에 15만평 규모로 건설중임)등에 실질 현장 평가를 통해 전국의 유리온실 시설농업에 실질적인 적용되고 향 후 그 사용처 및 용도가 더욱 확대될 것으로 기대된다.

토마토 풋마름병에 대한 약효 조사(동부한농)



왼쪽부터 무처리(+), 시료x10, 시료x50, 시료x100, 용마루x667

결과: 시료x100과 용마루x667이 동일한 농도로 가정했지만 실제로는 시료x10와 용마루x667이 비슷한 약효를 보임

해석: 장기보관을 위해 산도를 낮추어서 발리다마이신이 분해된 것으로 예상됨

벼잎집무늬마름병에 대한 방제 실험(양평)

-7월중순부터 발병하여 실험 진행 중-



발병초기



발병중기

병해명	조사항목	발병조사	규모	약효표시법
벼잎집무늬마름병	이병주율	처리후 7일간격	처리구,대조구 3반복 각각 100평 이상	이병주율(%)= (이병주수/조사주수)*100

발리다마이신 A 배양액을 이용한 모잘록병 방제시험

가. 시험자재 : 발리다마이신A

나. 시험작물: 벼(추청벼); 병원균: *Rhizoctonia solani*

다. 시험기간 : 4월 하순 ~ 5월하순

라. 시험방법 : 배양액 처리; 농약 처리; 무처리

(1) 처리내용

처리내용	희석배수	처리시기 및 방법
배양액 처리	미생물배양액 300배	파종후 15일부터 2일간격 처리
경농농약(대비구)	경농농약 100배	파종후 15일부터 2일간격 처리
관행재배	-	무처리



병해명	조사항목	발병조사	규모	약효표시법
벼모잘록병	이병주율	처리후 2일간격	처리구, 대비구 3반복	이병주율(%) = (이병주수/조사주수)*100

결과: 발효액 300배 희석액과 비슷한 농도의 발리다마이신 A를 함유된 농약을 처리했을 때 이병주율이 동일하게 30%로 나타났음.

해석: 발효액을 정제하지 않고 직접적으로 처리해도 방제효과 있음을 증명함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

국가	출원번호	출원일	출원년도	제목
US	2006-988660	2006-07-13	2006	Fungicide mixtures based on 1-methyl-pyrazol-4-ylcarboxanilides
US	2006-988141	2006-06-29	2006	Fungicidal Mixtures Based on 3,5-Disubstituted N-Biphenyl-Pyrazolcarboxamides
US	2006-922567	2006-06-28	2006	Fungicidal Mixtures Based on 2,5-Disubstituted N-Biphenylpyrazolcarboxamides
EP	06113166	2006-04-26	2006	Composition comprising a glucan or a glucan derivative and a pesticide and methods for improving plant health
EP	07112460	2007-07-13	2007	Active compound combinations
EP	93911196	1993-05-14	1993	FUNGICIDAL IMIDAZOLINONES
EP	06012017	2001-03-20	2001	Insecticidal anthranilamides
JP	1981-119324	1981-07-31	1981	FUNGICIDE FOR AGRICULTURAL AND HORTICULTURAL PURPOSE
JP	1981-011579	1981-01-30	1981	AGRICULTURAL AND HORTICULTURAL GERMICIDE
JP	1979-056627	1979-05-08	1979	FUNGICIDE COMPOSITION FOR RICE CROP
JP	1979-056107	1979-05-07	1979	FUNGICIDE COMPOSITION FOR RICE CROP
JP	1979-056106	1979-05-07	1979	FUNGICIDE COMPOSITION FOR RICE CROP
US	2006-909991	2006-04-06	2006	Pesticidal Mixtures
US	2005-576719	2005-10-06	2005	Synergistic Fungicidal Compositions
US	2005-573277	2005-08-11	2005	Fungicidal Compositions
JP	1982-034923	1982-03-04	1982	PRODUCTION OF VALIENAMINE AND VALIDAMINE
US	1976-710238	1976-07-30	1976	Antibiotic compositions containing validamycin compounds
US	1972-245135	1972-04-18	1972	Validamycin C, D, E and F antibiotics
JP	1995-287613	1995-11-06	1995	GRANULATED WATER DISPERSIBLE POWDER
JP	1994-088846	1994-04-26	1994	WATER-SOLUBLE GRANULAR AGROCHEMICAL
JP	1994-088845	1994-04-26	1994	WATER-SOLUBLE GRANULAR AGROCHEMICAL
JP	1993-262122	1993-10-20	1993	COMPOSITION FOR CONTROLLING SOIL DISEASE DAMAGE
JP	1993-210157	1993-08-25	1993	GRANULAR WETTABLE POWDER COMPOSITION FOR AGRICULTURE AND IT PRODUCTION
JP	1993-103282	1993-04-28	1993	BENSULTAP SOLID PREPARATION
JP	1990-173812	1990-06-29	1990	POWDER FOR AGRICULTURAL CHEMICAL
JP	1990-148109	1990-06-05	1990	PRODUCTION OF TREHALOSE
JP	1989-234115	1989-09-08	1989	SOLID AGRICULTURAL CHEMICAL PREPARATION HAVING FLOATING AND ACCUMULATING CHARACTER ON WATER SURFACE
JP	1988-078573	1988-03-30	1988	VALIDAMYCIN DUST
JP	1985-145308	1985-07-01	1985	VALIDAMYCIN PREPARATION
JP	1985-145307	1985-07-01	1985	VALIDAMYCIN PREPARATION

JP	1984-082593	1984-04-23	1984	STABLE FUNGICIDAL COMPOSITION FOR AGRICULTURE AND HORTICULTURE
JP	1980-136500	1980-09-29	1980	ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITOR
JP	1980-128157	1980-09-16	1980	PREPARATION OF VALIENAMINE
JP	1979-094644	1979-07-24	1979	VALIDAMYCIN A DERIVATIVE, AND AGRICULTURAL AND HORTICULTURAL FUNGICIDE CONTAINING SAID DERIVATIVE
US	1999-280454	1999-03-30	1999	Valiolone, a method of preparing it, and its use to prepare acarbose and voglibose
US	1994-352858	1994-12-02	1994	Fungicidal compositions and methods of use employing pyrimidine derivatives
JP	2004-200143	2004-07-07	2004	바리다마이신을 바리에나민 및 바리다민에 변환하는 신규 미생물
JP	2004-102489	2004-03-31	2004	바리다마이신을 바리에나민 및 바리다민에 변환하는 신규 미생물
US	2002-494651	2002-11-06	2002	Method for selecting genetically transformed cells
JP	1998-195648	1998-07-10	1998	물벼룩 살균 조성물 및 방제 방법
JP	1995-095148	1995-04-20	1995	살충 살균 조성물
JP	1995-010775	1995-01-26	1995	토양병해 방제제
JP	1994-161978	1994-07-14	1994	살균제 조성물
JP	1993-288284	1993-11-17	1993	당카르복실산의 제조법 및 신규당 카르복실산
JP	1993-285179	1993-11-15	1993	농원 예용 살균 조성 물
JP	1991-043684	1991-03-08	1991	농약 분제
JP	1990-325190	1990-11-29	1990	안정화되어 지는 동 함유 바리다마이신 제제
JP	1990-084530	1990-03-29	1990	농원예용 살균제
JP	1989-180872	1989-07-13	1989	농원예용 살충 살균 조성물
JP	1988-078572	1988-03-30	1988	주식 기초 방제용 농약 분제
JP	1986-300008	1986-12-18	1986	농원예용의 살충 살균 조성물
JP	1986-222682	1986-09-19	1986	바리에나민 및 바리다민의 제조법
JP	1986-166839	1986-07-17	1986	농원예용 살균 조성물
JP	1985-145385	1985-07-02	1985	살균 조성물

제 7 장 참고문헌

1. Andreone, T. L., R. L. Printz, S. J. Plikis, M. A. Magnuson, and D. K. Granner. 1989. The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA. *J. Biol. Chem.* **264**: 363-369.
2. Asano, N., T. Yamaguchi, Y. Kameda, and K. Matsui. 1987. Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*. *J. Antibiot.* **40**: 526-532.
3. Beyer, S., G. Mayer, and W. Piepersberg. 1998. The StrQ protein encoded in the gene cluster for 5'-hydroxystreptomycin of *Streptomyces glaucescens* GLA.0 is a α -D-glucose-1-phosphate cytidyltransferase (CDP-D-glucose synthase). *Eur. J. Biochem.* **258**: 1059-1067.
4. Brown, K., F. Pompeo, D. Dixon, D. Mengin-Lecreux, C. Cambillau, and Y. Bourne. 1999. Crystal structure of the bifunctional N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase from *Escherichia coli*: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily. *EMBO J.* **18**: 4906-4107.
5. Dong, H., T. Mahmud, I. Tornus, S. Lee, and H. G. Floss. 2001. Biosynthesis of the validamycins: identification of intermediates in the biosynthesis of validamycin A by *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 2733-2742.
6. Gonzali, S., L. Pistelli, L. De Bellis, and A. Alpi. 2001. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* fructokinases. *Plant Sci.* **160**: 1107-1114.
7. Goward, C. R., R. Hartwell, T. Atkinson, and M. D. Scawen. 1986. The purification and characterization of glucokinase from the thermophile *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J.* **237**: 415-420.
8. Hansen, T., B. Reichstein, R. Schmid, and P. Schönheit. 2002. The first archael ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity. *J. Bacteriol.* **184**: 5955-5965.
9. Hansen, T. and P. Schönheit. 2003. ATP-dependent glucokinase from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* represents an extremely thermophilic ROK glucokinase with high substrate specificity. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**: 405-411.
10. Heppel, L. A., D. R. Harkness, and R. J. Hilmo. 1962. A study of substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **237**: 841-846.
11. Horii, S., Y. Kameda, and K. Kawahara. 1972. Studies on validamycins, new antibiotics. VIII. Isolation and characterization of validamycins, C, D, E and F. *J. Antibiot.* **25**: 48-53.
12. Iwasa, T., H. Yamamoto, and M. Shibata. 1970. Studies on validamycins, new antibiotics. I.

- Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* nov. var., validamycin-producing organism. *J. Antibiot.* **23**: 595-602.
13. Kameda, Y., N. Asano, T. Yamaguchi, and K. Matsui. 1986. Validamycin G and validoxylamine G, new members of the validamycins. *J. Antibiot.* **39**: 1491-1494.
 14. Meyer, D., C. Schneider-Fresenius, R. Horlacher, R. Peist, and W. Boss. 1997. Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**: 1298-1306.
 15. Nioh, T. and S. Mizushima. 1974. Effect of validamycin on the growth and morphology of *Pellicularia saskii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **20**: 373-383.
 16. Robson, G. D., P. J. Kuhn, and A. P. Trinci. 1988. Effects of validamycin A on the morphology, growth and sporulation of *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3187-3194.
 17. Singh, D., M-J. Seo, H-J. Kwon, A. Rajkarnikar, K-R. Kim, S-O. Kim, and J-W. Suh. 2005. Genetic localization and heterologous expression of validamycin biosynthetic gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* KCCM 11405 (IFO 12704). *Gene* (in press).
 18. Suami, T., S. Ogawa, and N. Chida. 1980. The revised structure of validamycin A. *J. Antibiot.* **33**: 98-99.
 19. Yu, Y., L. Bai, K. Minagawa, X. Jian, L. Li, J. Li, S. Chen, E. Cao, T. Mahmud, H. G. Floss, X. Zhou, and Z. Deng. 2005. Gene cluster responsible for validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5066-5076.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.