

발간 등록번호
11-1541000-001502-01

보완과제( ), 일반과제( 0 )

과제번호 307014-5

가축사료용 항생제 대체물질 산업화 기술개발  
(국내 토양 세균이 생산하는 발효물을 이용한  
사료첨가제 개발)

Commercialization of alternative animal feed  
antibiotics

(Development of animal feed additives using  
fermentation products of Korean soil bacteria)

조선대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “가축사료용 항생제 대체물질 산업화 기술개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “국내 토양 세균이 생산하는 발효물을 이용한 사료 첨가제 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012 년 5 월 29 일

주관연구기관명 : 조선대학교

주관연구책임자 : 유 진 철

세부연구책임자 : 김 성 준

세부연구책임자 : 홍 준 희

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 김 종 춘

협동연구기관명 : (주)진캠

협동연구책임자 : 우 진 석

협동연구기관명 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 백 인 기



# 요 약 문

## I. 제 목

가축사료용 항생제 대체물질 산업화 기술개발에 관한 연구  
(국내 토양 세균이 생산하는 발효물을 생산하는 발효물을 이용한 사료 첨가제 개발에 관한 연구)

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라는 미국, 일본, 유럽 등의 국가들과 비교하여 항생제 사용량이 월등히 많은 것으로 나타나고 있으며, 이러한 항생제 등의 동물약품의 오남용은 항생제 잔류와 내성균의 출현을 야기하여 동물 건강을 위협하고 있는 실정임

항생제는 인체에 흡수될 경우 약리효과를 발휘함과 동시에 부작용과 함께 세균의 화합물에 대한 적응성이 강화되어 내성이 생기는 악순환이 반복됨. 이로 인해 최근 사용되고는 강력한 항균제에도 효과가 없는 일명 슈퍼박테리아의 출현 빈도가 높아지고 있음.

이런 부작용들로 인하여 우리나라는 2005년 5월부터 44종이던 사료첨가용 항생제를 28종으로 줄였으며, 2009년 1월부터는 추가로 7종에 대한 사료첨가를 금지 시킨데 이어 2011년 7월부터는 나머지 엔라마이신, 타이로신, 바지니아마이신, 바시트라신메칠렌디살리실레이트, 밤버마이신, 티아무린, 아프라마이신, 이빌라마이신 등 항세균제와 항균제인 설파치아졸 등 모든 사료첨가용 항세균성, 항진균성 항생제의 사용을 전면적으로 금지시켰음

이처럼 2011년 7월부터 사료첨가용 항생제 사용이 전면적으로 금지된 가운데 사료첨가용 이외의 질병예방 및 치료 등의 목적으로 사용하는 동물용 항생제의 사용 금지도 세계적으로 확산되고 있음

따라서 우리나라가 보유하고 있는 동물, 식물, 미생물자원을 이용한 가축사료용 항생물질 대체제 개발에 대하여는 지속적인 국내 축산산업 발전을 위해서 뿐 아니라

세계시장 개척을 위해서도 국가적 차원의 종합적 연구가 절실히 필요함.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

독자적으로 분리한 신규 토양세균을 이용, 가축사료에 첨가하는 항생제 대체물질을 개발하여 차세대의 가축 질병예방, 치료 및 사료효율 개선제로의 산업화

#### 1. *Nocardia* sp. CS682의 최적 발효조건 및 CS682 분리공정 개발

- CS682의 대량생산 공정 개발 : Inoculum size, aeration, agitation, 배양기간 pH에 따른 유효 물질 생산 변화 시험

#### 2. 고효율의 대량 분리정제 공정 개발

- 최적 분리 공정 : 용매 이행성 시험 및 용매추출, 컬럼크로마토그래피(박층컬럼, sephadex LH-20, Silica, TLC), 결정화를 통한 순수물질 정제

#### 3. CS382, 유도체, CS382 발효액, 부분 정제물의 생물학적 활성 검증

- 항균, 면역 증강, 동물 성장 촉진, 세포분화 유도, 화학감작, 항산화 등의 생물학적 활성 평가 및 기전 규명

- CS682의 세포분화 유도 효과 및 경로 탐색 : NBT 분석법을 이용한 분화된 세포의 비율 측정, 세포형광분석법을 이용한 세포표면 항원 발현 여부 확인, western blotting을 이용한 세포내 단백질 발현정도 탐색

- 항산화 효능 검증 및 기작 규명 : DPPH radical 소거능 평가, NBT/XO(Superoxide 소거 작용) 측정, 총 페놀 화합물 측정, 아질산염 소거능, Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

- 항암억제 및 효능기전 연구 : 세포독성 확인, western blot을 이용한 세포 내 관련인자의 발현 여부 확인

#### 4. 신규 CS682 유도체 확보

- 발효 화합물의 유도체 합성을 위한 선택적 보호반응, 축합반응, 탈보호 반응, ester화 반응의 연구 및 CS682의 monosilation & esterification

- CS682의 2-deoxy 배당체, glucose 배당체, fluorosugar 배당체 합성
- CS682의 C-9, C-11, C-12, 5-membered heterocycle의 합성 및 핵산 배당체 합성
- 측쇄를 가진 핵산 유도체의 합성과 CS682와의 축합
- CS682의 C-9, C-11, C-12에 single, double, triple 방식으로 5-membered heterocycles의 합성 및 CS682의 핵산 배당체 합성

5. 돌연변이와 생합성 유전자 조절을 통한 균주 개량

- *Nocardia* sp. 형질전환 set-up
- *Nocardia* sp. multi-ventor 시스템 개발
- 생합성 유전자를 탐침에 의한 CS682의 클론 전략
- 일차 대사 생합성 유전자 확보

6. 가축(닭, 돼지, 소)을 이용한 소규모 농장 수준의 임상 시험(사양시험)

- CS682 발효물의 육계 기능성 검증 및 급성 독성 평가
- 이유자돈에 대한 기능성 검증 및 적정용량 산출
- 육성돈에 대한 기능성 검증 및 적정용량 산출
- 아급성 독성 시험을 수행하여 제품의 등록자료 및 안전성 확보
- 산란계, 육계, 자돈의 사양시험을 통한 생산성 및 품질 검증

7. 대량 생산 체계 확립 및 품질관리방안 검토

8. 시제품제작 및 참여기업이나 관련 기업으로의 기술이전 등을 통한 사업화

## IV. 연구개발결과

독자적으로 분리한 신규 토양세균을 이용, 가축사료에 첨가하는 항생제 대체물질을 개발하여 차세대의 가축 질병예방, 치료 및 사료효율 개선제로의 산업화를 목표로 사업을 진행한 결과는 다음과 같음.

### 1. *Nocardia* sp. CS682의 최적 발효조건 및 CS682 분리공정 개발

1L flask에서의 실험결과, 탄소원으로는 maltose, glucose 가 가장 적합한 것으로 확인되었으며, 질소원으로는 soybean meal (3.5%)일 때가 최적의 조건임을 확인되었음.

7 L Fermentor에 inoculum size를 4%(v/v)로 하여 접종하고 산소공급은 1 vvm 공급하면서 배양시간별 발효정도를 조사하였음. CS682는 3일 배양 시 최고조에 이르렀으며 그 후는 점차적으로 감소함을 확인함.

500 L Fermentor에서는 Maltose 0.5%, Oatmeal 0.25%, Soybean meal 0.25%, Yeast ex 0.25%, Calcium carbonate 0.05% 배지에서 28℃, 0.5vvm, 150rpm의 조건으로 배양 하였으며 Nargenicin의 생산량은 20시간에 증가하기 시작하였으며 50시간부터는 활성이 일정하였음. pH는 약 7에서 시작하여 9.05까지 배양기간동안 서서히 증가하였음.

5톤 Fermentor에서는 Maltose 0.5%, Oatmeal 0.25%, Soybean meal 0.25%, Yeast ex 0.25%, Calcium carbonate 0.05% 배지에 28℃, 0.5vvm, 75rpm 조건으로 배양 함. 배양에 접종한 seed는 50L 발효기에서 30L의 발효액을 96시간 배양 후 500L발효기로 접종하였으며 접종 후 온도, 용존산소량, 산소공급 및 교반속도를 유지하며 배양함. 약 3일 배양 후 발효액을 5톤 발효조로 이동시키고 5톤 발효조건하에서 배양 기간동안 24시간에 1-2회 배양액을 채취하여 생산된 Nargenicin의 항 MRSA 활성을 측정하고 작동조건 및 pH변화를 모니터링한 결과 48~60시간 배양시 항균 활성이 좋음을 확인하였음.

### 2. 고효율의 대량 분리정제 공정 개발

*Nocardia* sp CS682 균주를 OSYM 액체배지에서 배양하여 원심분리하고 배양여액

을 회수한 뒤 filtration 하였음. 배양여액 20 L를 50% Dichloromethane으로 2회 추출하여 얻은 추출액을 감압 농축하고 약 20 ml의 MeOH로 녹여 이 시료를 MeOH 로 평형시킨 sephadex LH-20 gel로 충전된 column(2.5×110 cm)에 적하하여 chromatography를 실시하였음 (용출속도: 50 ml/h, 분획 용량: 10 ml, 용출용매: MeOH). Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 항 MRSA 활성이 1 peak로 나타났으며, 활성을 보이는 분획물을 모아 농축건조시켰음. 농축건조시료를 소량의 ethylacetate에 녹인 후 기존의 prep-TLC 대신에 Silica gel column chromatography 를 실시하여 (용출 용매, hexane: ethylacetate=2.5:1) CS682의 회수율을 기존방법보다 1.5배 향상시켰음.

### 3. CS382, 유도체, CS382 발효액, 부분 정제물의 생물학적 활성 검증

- CS682는 분화를 유도하고 또한, 분화 유도제인 ATRA나 1,25-(OH)2D3와 병행하여 처리하였을 때 분화유도의 증강에 효과적임.

→1,25-(OH)2D3와 함께 처리하면 monocyte/macrophage로 ATRA와 함께 처리하면 granulocyte로 백혈병 세포가 분화함

- CS682는 소교세포의 활성을 증가시키는 LPS에 의한 손상 (NO와 NO생성관 관련된 iNOS 발현, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성 감소)을 억제시킴

- CS682는 항산화 활성을 나타내지 않음.

- CS682는 대부분의 세포주에서는 항암활성을 나타내지 않았지만 폐암세포주에서 항암활성을 나타냄.

- CS682는 proinflammatory cytokine인 Th-1 type cytokine (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ )의 분비를 증가시켜 세포매개성면역반응 촉진, anti-inflammatory cytokine인 Th-2 cytokine (IL-6, IL8)의 분비를 억제시켜 체액성 면역반응을 억제시킴.

- CS682는 산화적 스트레스에 의한 간세포 손상에 대해 보호 효과(ALT, LDH 분비량 감소 활성산소 생성 감소 및 HO-1의 발현량 증가)를 나타냄

#### 4. 신규 CS682 유도체 확보

- 상업적으로 구입 가능한 D-mannitol과 acetol을 대상으로 가장 문제시 되는 선택적인 보호반응, 축합반응, 탈보호반응 ester화 반응을 함을 통해 확인 하였으며, 위의 반응 조건을 적용하여 CS682를 대상으로 selective monosilylation esterification이 성공적으로 이루어짐을 확인
- 2-deoxy당을 실험실적으로 합성한 후 CS382와 축합
- 축합전 glucose의 수산기를 보호, 축합반응 진행함
- 당에 불소를 도입한 후 CS682에 축합

#### 5. 돌연변이와 생합성 유전자 조절을 통한 균주 개량

- 생합성 유전자집단의 안정적 발현을 위해서 먼저 방선균에서 사용되고 있는 여러 가지 벡터를 사용하여, Nocardia에서의 안정적 발현을 위해 벡터 개발
- E.coli에서 대부분의 유전자 조작 후 Nocardia로 transform 할 수 있도록 E.coli의 replication origin으로 구성된 E.coli-Nocardia shuttle vector를 고안하여 개발
- CS682을 클론하기 위한 proline synthase 유전자 확보
- CS682는 polyketide를 back bone으로 하고 있기 때문에 acetyl-CoA, malonyl-CoA가 전구체로 사용됨. 따라서 이러한 전구체의 생합성 유전자를 생산성 향상에 도움을 줄 수 있어 target 유전자로서 PanK 유전자 PDH 및 ACC 유전자를 확보
- metK 및 asfR(조절기작 유전자), metK 및 asfR malonyl-CoA(ACC), metK 및 asfR malonyl-CoA(PCC) 발현벡터 제작

#### 6. 가축(닭, 돼지, 소)을 이용한 소규모 농장 수준의 임상 시험(사양시험)

- 육계를 이용한 CS682의 기능성 검증 : 초생추에서 CS682의 사료첨가는 생체대사에 영향을 미치지 않고, 소화기 이상 증상을 유발하지도 않으면서 사료효율을 효과적으로 증가시키는 것으로 확인됨.

- 랫드를 이용한 CS682의 경구투여 급성독성시험 : 랫드에 CS682의 단회경구투여는 10 ml/kg 이하의 용량에서 어떠한 부작용도 초래하지 않으며, 최소치사량은 암수 모두 10 ml/kg을 상회하는 것으로 나타남. CS682가 매우 안전한 물질이라는 것을 보여주며, 사료첨가제로써 개발가능성을 제시해 주고 있음.
- 이유자돈을 이용한 CS682의 기능성 검증 : CS682의 급여군은 대조군에 비해 체중이 다소 증가하였고, 사료효율도 개선된 것으로 확인.
- 랫드를 이용한 CS682의 경구투여 아급성독성시험 : 1,000 mg/kg/day 이하의 용량으로 CS682의 반복 경구투여는 랫드의 일반증상과 체중, 사료섭취량, 안 및 요소견, 혈액, 혈청생화학, 부검소견, 장기중량 및 주요 장기의 조직병리에 어떠한 독성영향도 나타내지 않았음. 시험결과는 CS682가 독성이 없는 안전한 물질이라는 것을 암시해주며, 사료첨가제로서의 개발가능성을 제시.
- 육성돈을 이용한 CS682의 기능성 검증 : 육성기에 CS682의 단독 사료첨가는 폐사율과 도태율을 감소시키고 사료효율을 높였으며, 비육기에도 폐사율과 도태율을 감소시켰고, 출하 시에 도체성적을 높이는 효과를 나타내었음.
- 랫드를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 급성독성시험 : 랫드에 CS682 순물질의 단회경구투여는 2,000 mg/kg 용량에서 일시적인 침울과 체중증가량의 억제를 유발하나 회복성이 인정되었으며, 800 mg/kg 이하에서는 어떠한 부작용도 초래하지 않았음.
- 마우스를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 아급성독성시험 : CS682 순물질은 마우스에서 독성이 없는 안전한 물질임을 확인
- 마우스를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 급성독성시험 : CS682 순물질의 단회경구투여는 2000 mg/kg 이상의 용량에서 사망을 초래하였으며, 800 mg/kg 투여용량에서 투여당일에 일시적으로 미약한 운동성 감소를 유발하였으나 특이적인 독성영향은 나타내지 않았음. 본 시험조건하에서 마우스에 대한 CS682 순물질의 반수치사량은 800 mg/kg과 2000 mg/kg 사이로 확인.

## 7. 시제품제작 및 참여기업이나 관련 기업으로의 기술이전 등을 통한 사업화

- CS682의 대량생산 후 동결건조작업하여 얻은 원료 분말은 시제품 “DCS682”의 생산에 사용하였으며 CS682의 발효는 한국생명공학 연구원에서 DCS682시제품 생산은 대한뉴팜(주) 생산라인에서 수행하였음.

- CS682 는 함량균일성을 고려하여 배산법을 이용하여 혼합하였으며 혼합 후 얻은 제품은 1kg 씩 차광기밀포장하였음.

- CS682의 물성, 유동성은 양호하였으며 부원료 및 부형제와 배산 혼합 시 문제는 없었으며 함량균일성도 일정하였음.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 국/내외 학술지 61편 게재

- 특허 출원 14건, 특허 등록 6건

- 학술 대회 발표 62편, 언론 홍보 3건

- “새로운 노카르디아 속 균주 및 이의 메티실린 내성 포도상구균 균주에 유효한 화합물을 포함하는 가축사료 첨가제”에 대한 기술이전 (2008.3.1.-2028.2.28.)

- 나르제니신을 사료첨가용 항생제 대체제로 **제품화** (상품명 : DCS682)

- 2008년 서울발명 진흥회 “동물면역제어 소재개발” 금상, 2008년 교육과학기술부장관상 “농어민 소득증대 표창장” 수상

- 현재 사료용 항생제 대체제의 폭발적인 수요증가에 부응하여 CS682 및 유도체, 발효물 등을 동물사료 첨가제로 개발하는 것은 독점적 경쟁력을 가지고 있기 때문에 가격 경쟁력을 갖추고 있으며, 동물약품의 방대한 시장규모와 기존 제품들이 갖고 있는 문제점에 비추어 볼 때 국가 차원의 커다란 수입을 창출할 수 있을 것이라 예상



# SUMMARY

## I . Title

Commercialization of alternative animal feed antibiotics (Development of animal feed additives using fermentation products of Korean soil bacteria)

## II . Purpose

Current use of antibiotic feed additive are banned because animal feed containing antibiotics possess various side effects. There is a urgent need to develop substitutes for feed antibiotics using microbial resources in our country.

## III. Methods & Research Content

- Purification and Identification of antimicrobial compounds from korean soil bacteria
- large scale fermentation, purification of antimicrobial compounds, development of CS682 derivatives
- biological activity test of CS682 broth, CS682 derivatives, CS682 purified compound
- strain mutation and development of biosynthesis genes
- feeding experiment of CS682
- examination of quality control manner

## IV. Result

establishment of large scale fermentation and purification, synthesis of CS682 derivatives, development of multi-vector system and biosynthesis genes, stability confirmed with feed additives, technology transfer on company

## **V. Utilization and application of research results**

The large scale fermentation and purification technology of CS682 will be transferred to livestock raisers and feed additives company.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	20
Section 1. Background .....	20
Section 2. Demands and Importance.....	21
1) Legal regulation of using antibiotics .....	21
2) Antibiotic replacement in the domestic market .....	21
3) Requirement for antibiotic replacement .....	23
4) Natural resources as antibiotic replacement .....	23
Chapter 2. Current state of antibiotic replacement development .....	25
Section 1. Changes in the relevant areas .....	25
Section 2. Current usages of international antibiotic replacements	
1) Domestic use of statistics .....	28
2) International usage statistics .....	32
3) International developing state of art .....	35
Chapter 3. Research contents and results .....	36
Section 1.	
1. General identification.....	36
2. Genetic identification .....	39
3. Result of identification .....	40
4. Optimized fermentation condition for <i>Nocardia</i> sp.CS682 .....	45
5. Improvement of separation process of <i>Nocardia</i> sp.CS682.....	48
6. Scale-up .....	49
7. Concentration and lyophilization of broth .....	53
8. Stability test of lyophilization .....	58
9. Purification process of nargenicin from CS682 broth .....	59
10. Cultivation at 5 tone fermentor .....	66
11. Foam decreasing study at small fermentor .....	67
12. Conformity Assessment of optimized medium for mass production .....	70
13. Establishing production standard and quality assurance	

method of <i>Nocardia</i> sp.CS682 .....	77
14. Production of prototype DCS682 .....	82
Section 2.	
1. Research process .....	89
1) Antioxidant activity test .....	89
2) Cell culture .....	91
3) Cell viability assay by MTT assay .....	91
4) Cytotoxicity assay LDH assay/ALT assay .....	91
5) Nucleus observation by Hoechst 33324 staining .....	91
6) Mitochondrial membrane potential assay by rhodamine 123.....	92
7) Western blot .....	92
8) Nitric Oxide assay .....	92
9) Cytokine assay by ELISA .....	93
10) Reactive oxygen species assay .....	93
2. Research result .....	93
1) Inducing cell differentiation .....	93
2) In vitro antioxidant effect .....	106
3) Antitumor effect .....	109
4) Reinforce effect of immune system .....	113
5) Liver cell protection effect .....	119
Section 3.	
1. Model study .....	124
2. 4-lipophilic pocket-2,3-dideoxycarbasugar의 synthesis and CS682 coupling .....	130
3. Synthesis of glucose-CS682 glycoside .....	138
4. Synthesis of fluorosugar-CS682 glycoside .....	141
5. Coupling of CS682 with 5-membered heterocycles .....	145
6. Coupling of CS682 with single, double and triple 5-mem bered heterocycles .....	150
7. MTT assay of 5 nargenicin derivatives .....	165
8. Anti-inflammatory effect of 5 nargenicin derivatives.....	167
9. Western blot of the anti-inflammatory protein of each 5	

nargenicin derivatives .....	169
Section 4.	
1. Functional verification of CS682 on broilers .....	172
2. Acute oral toxicity test of CS682 on rats .....	172
3. Functional verification of CS682 on postweaning pigs .....	173
4. Subacute oral toxicity test of CS682 on rats .....	174
5. Functional verification of CS682 on pigs .....	174
6. Acute oral toxicity test of purified CS682 compound on rats .....	174
7. Functional verification of CS682 on pigs .....	175
8. Subacute oral toxicity test of CS682 on mice .....	176
9. Functional verification of purified CS682 compound broth on broilers .....	176
10. Subacute oral toxicity test of purified CS682 compound broth on mice .....	182
Section 5.	
1. Cloning and biosynthesis of nargenicin biosynthetic genes .....	187
2. Strain improvement for enhanced production of Nargenicin .....	
3. Production of isonargenicin by proline feeding .....	187
4. Cloning of nargenicin biosynthetic genes .....	189
5. Enhancement of nargenicin production through metabolic engineering .....	200
Section 6.	
1. layer chicken 1 <sup>st</sup> feeding experiments .....	215
2. Broilers 1 <sup>st</sup> feeding experiments .....	223
3. layer chicken 2nd feeding experiments .....	229
4. Broilers 2nd feeding experiments .....	235
Chapter 4. Accomplishments and contribution .....	240
Section 1. Accomplishments .....	240
Section 2. Contribution .....	245

Chapter 5. Utilization and application of research results .....	247
Section 1. Accomplishments .....	247
1. Papers .....	247
2. Patent applications .....	259
3. Patent registrations .....	260
4. Poster presentation at the conferences .....	261
5. Other accomplishments .....	267
Section 2. Utilization and application .....	268
 Chapter 6. Acquired overseas information during research .....	 272
 Chapter 7. Reference .....	 278
 Appendix 1. Papers .....	 282
Appendix 2. Patents .....	327
Appendix 3. Poster presentation at the conferences .....	351
Appendix 4. Donation certificate of <i>Nocardia</i> sp.CS682 .....	387
Appendix 5. Technology transfer .....	388
Appendix 6. Awards .....	389
Appendix 7. Sales status of DCS682 .....	391
Appendix 8. Media exposure of DCS682 .....	392

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	20
	제1절 연구배경 .....	20
	제2절 연구개발 목적 및 중요성 .....	21
	1. 국내/국의 항생제 사용의 법적규제 .....	21
	2. 국내 항생제 시장과 항생제 대체물질 .....	21
	3. 항생제 대체 물질의 요건 .....	23
	4. 항생제 대체물질의 개발과 천연자원 .....	23
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	25
	제1절 국내외 관련분야 환경변화 .....	25
	제2절 항생제 대체제의 국내/외 현황 파악 .....	28
	1. 국내 항생제 대체제 사용현황 .....	28
	2. 국외 항생제 대체제 사용현황 .....	32
	3. 국내/외 항생제 대체제 관련 주요 기술연구 현황 .....	35
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	36
	제1절 제1세부과제-발효화합물의 대량생산 및 항미생물 활성 연구	36
	1. 균주동정(일반적 특성 분석) .....	36
	2. 균주동정(유전적 특성 분석) .....	39
	3. 균주동정결과 .....	40
	4. <i>Nocardia</i> sp.CS682 최적발효조건 .....	45
	5. CS682의 분리공정 개선 .....	48
	6. Scale-up .....	49
	7. 배양액의 농축 및 동결건조 .....	53
	8. 안정성 시험 .....	58
	9. CS682 배양액에서 nargenicin 분리정제 공정 .....	59
	10. 5톤 발효조 배양 .....	66
	11. 소형발효조에서 foam 생성 감소에 관한 연구 .....	67
	12. 대량 생산용 최적 배지의 적합성 평가 .....	70
	13. CS682 제품의 기준 및 시험 방법 .....	77

14. DCS682 시제품 생산	82
제2절 제2세부과제-발효세균의 항암 및 면역활성 연구	89
1. 연구방법	89
1) 항산화 활성 평가	89
2) 세포배양	91
3) MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정	91
4) LDH assay/ALT assay에 의한 세포독성 확인	91
5) Hoechst 33324 staining에 의한 세포핵의 형태 관찰	91
6) Rhodamine 123을 이용한 mitochondria membrane potential 변화 측정	92
7) western blot	92
8) Nitric oxide(NO) 생성량 측정	92
9) cytokine 농도변화 측정(ELISA)	93
10) 활성 산소종 측정	93
2. 연구결과	93
1) CS682의 세포분화 유도 효과 검증	93
2) in vitro 항산화 효능 평가	106
3) 항암효능 검증	109
4) 면역증강 효과 검증	113
5) 간세포 보호효과 검증	119
제3절 제3세부과제-발효화합물의 유도체 합성	124
1. Model study	124
2. 4-lipophilic pocket-2,3-dideoxycarbasugar의 합성 및 CS682와의 coupling	130
3. Glucose와 CS682와의 배당체 합성	138
4. Fluorosugar와 CS682와의 배당체 합성	141
5. Coupling of CS682 with 5-membered heterocycles	145
6. Coupling of CS682 with single, double and triple 5-membered heterocycles	150
7. Nargenicin 유도체 5종의 MTT assay	165
8. Nargenicin 유도체 5종의 항염효과 측정	167
9. Nargenicin 유도체 5종의 항염증 단백질 western blot	169
제4절 제1협동과제-CS682 발효물의 기능성 검증 및 임상독성 평가	172



1. 육계를 이용한 CS682의 기능성 검증 .....	172
2. 랫드를 이용한 CS682의 경구투여 급성독성 시험 .....	172
3. 이유자돈을 이용한 CS682의 기능성 검증 .....	173
4. 랫드를 이용한 CS682의 경구투여 아급성 독성 시험 .....	174
5. 육성돈을 이용한 CS682의 기능성 검증 .....	174
6. 랫드를 이용한 CS682의 순물질의 경구투여 급성독성시험	174
7. 육성돈을 이용한 CS682의 기능성 검증 .....	175
8. 마우스를 이용한 CS682의 순물질의 경구투여 아급성 독성시험 .....	176
9. 육계를 이용한 CS682 순물질의 기능성 검증 .....	176
10. 마우스를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 급성독성시험	182
제5절 제2협동과제-CS682 고생산균주 개발 및 사업화 .....	187
1. Nargenicin의 생합성 유전자의 클론 및 생합성 .....	187
2. Nargenicin의 고생산성 균주 개량 .....	187
3. Proline feeding에 의한 isonargenicin의 생산 .....	189
4. Nargenicin의 생합성 유전자의 클론 .....	189
5. 대사공학에 의한 nargenicin 생산성 증가 .....	200
제6절 제3협동과제-CS682 발효물의 사양시험 .....	215
1. 산란계 1차 사양시험 .....	215
2. 육계 1차 사양시험 .....	223
3. 산란계 2차 사양시험 .....	229
4. 육계 2차 사양시험 .....	235
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	240
제1절 목표 달성도 .....	240
제2절 관련 분야에의 기여도 .....	245
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	247
제1절 연구개발 성과 .....	247
1. 논문 실적 .....	247
2. 특허 출원 .....	259
3. 특허 등록 .....	260
4. 학술대회 발표 .....	261

5. 기타 실적 .....	267
제2절 성과 활용 계획 .....	268
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	272
제 7 장 참고문헌 .....	278
부록 1. 논문 실적 .....	282
부록 2. 특허 .....	327
부록 3. 학술대회 발표 .....	351
부록 4. 분리동정한 균주 기탁증 .....	387
부록 5. 기술이전 .....	388
부록 6. 수상 실적 .....	389
부록 7. DCS682 판매관련 자료 .....	391
부록 8. 언론 홍보 자료 .....	392

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구 배경

동물약품은 치료나 예방을 목적으로 하는 일반약품과 사료첨가제, 원료시장 및 기타 의약부외품, 의료용구 등으로 분류됨. 근래의 판매실적에 의하면 주문용을 포함한 사료첨가제 시장이 전체동물약품시장의 30-40%를 차지하고 있음. 사료첨가제는 영양제, 화학요법제, 항콕시딕제, 기타효소/생균제로 나누어지며, 매출규모에 있어 매년 동물성장촉진목적의 영양제가 1,200억원, 항생제가 460억원, 항콕시딕제가 100억 원 정도를 차지하며 향 후 해마다 5-10% 이상의 매출증가가 기대됨.(그림 1) 특히 현재 국내에서 소비되는 항생제나 항생제 대체제는 거의 전량 수입되고 있기 때문에 국내 자체적으로 경쟁력 있는 항생제나 항생제 대체물질을 개발하여 동물사료 첨가제의 수입을 대체하고 국내바이오시장 활성화를 촉진시킬 수 있도록 관련 과제의 발굴 및 정책적인 지원이 필요함.

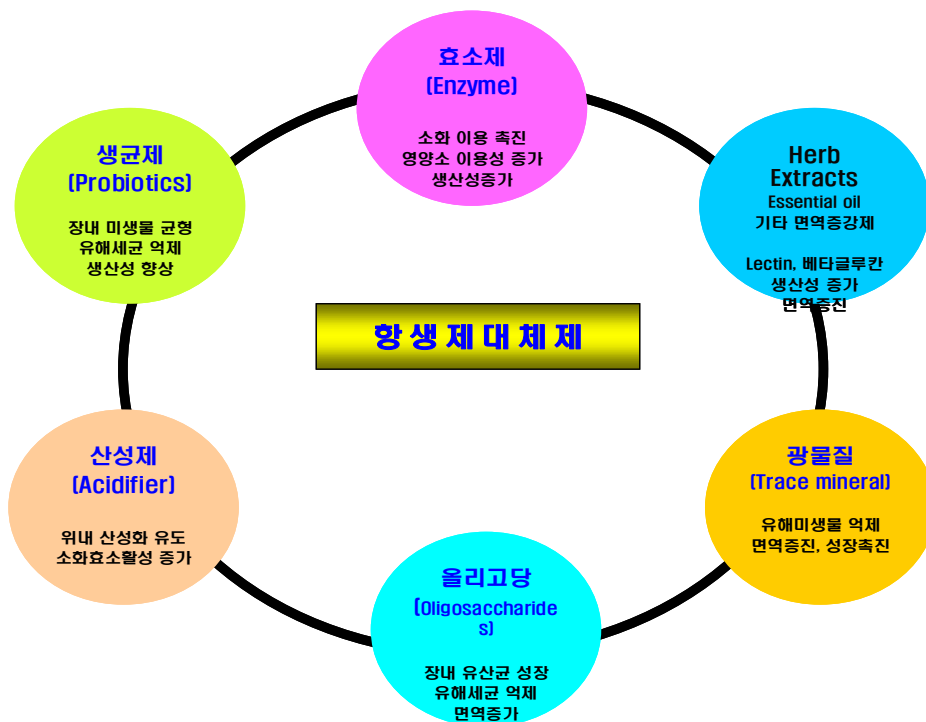


그림 1. 항생제 대체제의 분류

## 제 2절 연구개발 목적 및 중요성

### 1. 국내/국의 항생제 사용의 법적 규제

일반적으로, 가축의 성장을 촉진하고 질병을 예방치료의 목적으로 항생제가 널리 사용되고 있음. 항생제의 장기간 사용은 동물이 항생제에 대한 내성을 가지게 할 수 있음. 또한 동물의 체내에 항생제가 잔류함으로써 잔류된 항생제는 농축되어 동물을 섭취하는 인간에게까지 영향을 미칠 수 있음.

최근 유럽일부국가에서는 항생제의 사용을 제한하고 자연친화적인 대체물질을 적극 활용하도록 유도하고 있음. 우리나라는 그동안 가축 사육 시 미국이나 영국 등 축산선진국에 비하여 항생제를 많이 사용하는 것으로 알려져 왔으며 이에 따라 농림수산식품부에서는 2004년 사료관리법을 개정하면서 “유해사료의 범위와 기준 고시”에 따라 2006년부터 배합사료 첨사 가능 항생제를 53종에서 25종으로 감축시킨바 있으며, 2009년 1월 1일부터 사람과 동물이 함께 쓰는 항생제 7종에 대하여 동물사료에 첨가하지 못하도록 하고 있음. 농식품부는 2011년 9종으로 항생제의 배합사료 첨가를 제한시키고 잠정적으로 모든 항생제의 배합사료첨가를 제한하려는 계획임.

또한 친환경농업육성법의 시행과 함께 2007년도에 유기축산물 인증농가는 99호, 무항생제축산물 인증농가는 664호로 친환경축산물 인증농가는 급격히 증가하면서 농가단위에서 항생제를 사용하지 않는 사육방법에 대한 다양한 방법 들을 모색하였으나 과학적 검증이 미흡하여 사용에 어려움이 많음.

**현재 많은 축산농가가 무항생제 축산을 하려고 하는 상황에서 성장촉진물질 및 항생물질을 대체할 물질의 개발은 중요함.**

### 2. 국내 항생제시장과 항생제대체물질

국내 항생제 시장현황은 '06년 기준으로 연간 1,440톤의 항생제가 가축의 질병치료, 예방, 성장촉진 목적으로 과다하게 사용되고 있으며, 배합사료에 첨가하는 항생제의 사용량은 가축에 사용되고 있는 항생제의 50%이상인 700톤 이상이고, 폐지에 사용된 것이 약 57%를 차지하고 있음.(그림 2 및 표 1참고)

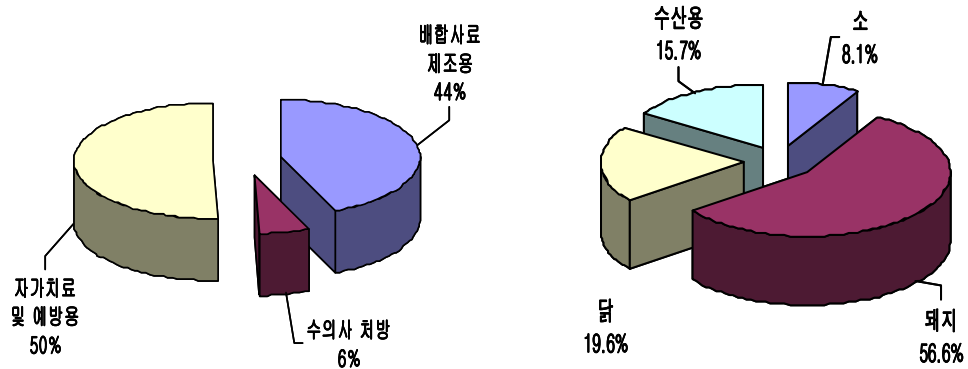


그림 2. 국내 항생제 사용현황 (한국동물약품협회, 2006)

표 1. 국내 항생제 사용현황표(한국동물약품협회, 2006,단위,kg )

	소	돼지	닭	수산물	총계
<b>배합사료 제조</b>	47,465	430,547	148,357		<b>626,369</b>
<b>수의사 처방</b>	7,569	38,557	13,453	26,776	<b>86,356</b>
<b>자가치료 및 예방용</b>	61,873	346,205	119,723	198,761	<b>726,563</b>
<b>총계</b>	116,908	815,309	281,533	225,537	<b>1,439,288</b>

성장촉진제인 항생제 사용에 대한 법적인 규제로 '10년 이후 항생제 사용량은 뚜렷하게 감소될 것으로 추정되며 이는 결국 효과적인 항생제 대체제를 사용함으로써 항생제에 대한 효과를 대체할 수 있음. (그림 3)

또한 항생제에 대한 법적 규제로써 기업체에서도 항생제대체제품개발에 대한 연구가 시급함. 이를 극복하기 위해 풍부한 연구 인프라를 축적하고 있는 연구소 및 대학과 기업의 연계를 통해 산업화를 진행하는 것이 바람직함.

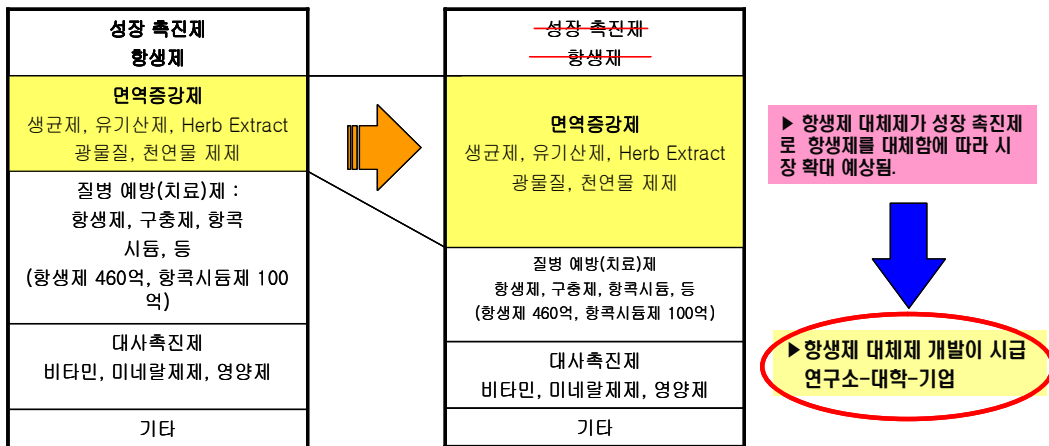


그림 3.

### 3. 항생제 대체 물질의 요건

항생제 대체 물질의 요건으로는

- 동물의 건강이 증가하는 확실한 생리활성을 가져야 함.
- 낮은 독성을 가지고 있으며 체내축적이 없어야 함.
- 동물의 성장을 뚜렷이 촉진시켜야 함.

등을 들 수 있으며 국내에서 사용이 가능한 대체제로써는 유, 무기산제, 생균제, Probiotics, Herb Extracts, 광물질, 면역촉진제, 펩타이드제제 등을 들 수 있음

항생물질 사용 규제로 인하여 항생제 대체제를 점차 사용해야 하지만 사실상 항생제와 동등 혹은 월등하게 가축에 효과가 입증된 제품은 없는 실정임.

### 4. 항생제대체물질의 개발과 천연자원

동물의약품관련 산업은 기술집약적 산업으로, 국내 농·축산업의 동물수의약품 산업에 대한 의존도가 매우 높은 현시점에서 주요한 농산업의 기반기술임. 그럼에도 불구하고 현재 국내에서 사용되고 있는 동물용 항생제 및 항생제 대체물질은 국외에서 개발되어 산업화된 것으로 국내 농산업 기반산업의 국외기술에 대한 종속을 심화시키고 있음.

우리나라가 보유하고 있는 동물, 식물, 미생물자원을 이용한 가축사료용 항생물질 대체제 개발에 대하여는 지속적인 국내 축산산업 발전을 위해서 뿐 아니라 세계시장 개척을 위해서도 국가적 차원의 종합적 연구가 절실히 필요함.

생물자원 특히 미생물의 대사과정에서 창출되는 여러 천연화학물질들은 그들의 생리조절 효과가 뚜렷이 밝혀진 물질들이 아직까지 많지 않으므로 이러한 천연화학물질의 자원을 우리가 이용하고 생리조절 효과를 탐색하여 사료첨가용 항생물질 대체제로 개발하는 과제는 고부가가치의 생물화학 산업으로 무한한 국부를 창출할 수 있음.

생물산업의 시대인 21세기에 들어 세계적으로 특허 및 자원 확보 경쟁이 치열해지고 있으며 자국의 생물 다양성 및 보전의 중요성에 대한 인식이 높아짐에 따라 선진국들은 생물 관련 유전자 은행을 통해 생물 및 유전자원 보존시스템을 구축하고 있음. 따라서 국익차원에서 생물다양성의 파악과 보전에 장기적이고도 지속적인 투자가 필요하며, 특히 미생물은 특허의 대상이 되면서 대량으로 유용물질을 얻을 수 있는 점 때문에 국익에 기여할 수 있는 매우 중요한 생물산업의 자원으로 인식하고 있음.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내외 관련분야 환경변화

일반적으로, 가축의 성장을 촉진하고 질병을 예방치료의 목적으로 항생제가 널리 사용되고 있음. 항생제의 장기간 사용은 동물이 항생제에 대한 내성을 가지게 할 수 있음. 또한 동물의 체내에 항생제가 잔류함으로써 잔류된 항생제는 농축되어 동물을 섭취하는 인간에게까지 영향을 미칠 수 있음.

최근 유럽일부국가에서는 항생제의 사용을 제한하고 자연 친화적인 대체물질을 적극 활용하도록 유도하고 있음. 우리나라는 그동안 가축 사육 시 미국이나 영국 등 축산선진국에 비하여 항생제를 많이 사용하는 것으로 알려져 왔으며 이에 따라 농림수산식품부에서는 2004년 사료관리법을 개정하면서 “유해사료의 범위와 기준 고시“에 따라 2006년부터 배합사료 첨사 가능 항생제를 53종에서 25종으로 감축시킨 바 있으며, 2009년 1월 1일부터 사람과 동물이 함께 쓰는 항생제 7종에 대하여 동물사료에 첨가하지 못하도록 하고 있음. 농식품부는 2011년 9종으로 항생제의 배합사료 첨가를 제한시키고 잠정적으로 모든 항생제의 배합사료첨가를 제한하려는 계획임.

#### 사료내 혼합 가능한 동물용의약품 감축 내용

2009.1.1		2011 하반기	
분류	품목명	분류	품목명
항생제(8종)	엔라마이신	항생제 (삭제)	<삭제>
	타이로신		<삭제>
	버지니아마이신		<삭제>
	바시트라신메칠렌디 살리실레이트		<삭제>
	밤버마이신		<삭제>
	티아무린		<삭제>
	아프라마이신		<삭제>
	아빌라마이신		<삭제>
항균제	설파치아졸	항균제(1종)	<삭제>
항콕시들편제(8종)	살리노마이신	항콕시들편제(8종)	살리노마이신



	모넨신나트륨		모넨신나트륨
	라살로시드나트륨		라살로시드나트륨
	나라신		나라신
	마두라마이신암모늄		마두라마이신암모늄
	샘두라마이신		샘두라마이신
	크로피톨		크로피톨
	디클라주틸		디클라주틸
구충제(1종)	펜벤다졸	구충제(1종)	펜벤다졸
계	18종	계	9종

\* 분류사항

- 항콕시든펜제 : 콕시든펜증 예방 및 치료제
- 항생제 : 미생물에 의해 생성되는 화학물질로 세균의 성장억제 및 사멸시키는 제제 (천연항생제의 유도체인 반합성 항생제 포함)
- 항균제 : 화학적으로 합성된 물질로 세균의 성장억제 및 사멸시키는 제제
- 구충제 : 내·외부 기생충 구제제

또한 친환경농업육성법의 시행과 함께 2007년도에 유기축산물 인증농가는 99호, 무항생제축산물 인증농가는 664호로 친환경축산물 인증농가는 급격히 증가하면서 농가단위에서 항생제를 사용하지 않는 사육방법에 대한 다양한 방법 들을 모색하였으나 과학적 검증이 미흡하여 사용에 어려움이 많음.

현재 많은 축산농가가 무항생제 축산을 하려고 하는 상황에서 성장촉진물질 및 항생물질을 대체할 물질의 개발은 중요함.

국내 항생제 시장현황은 '09년 기준으로 연간 998,167kg의 항생제가 가축의 질병 치료, 예방, 성장촉진 목적으로 과다하게 사용되고 있으며, 배합사료에 첨가하는 항생제의 사용량은 돼지와 소에 약 50% 이상을 차지하고 있음. (표 1, 2 참고)

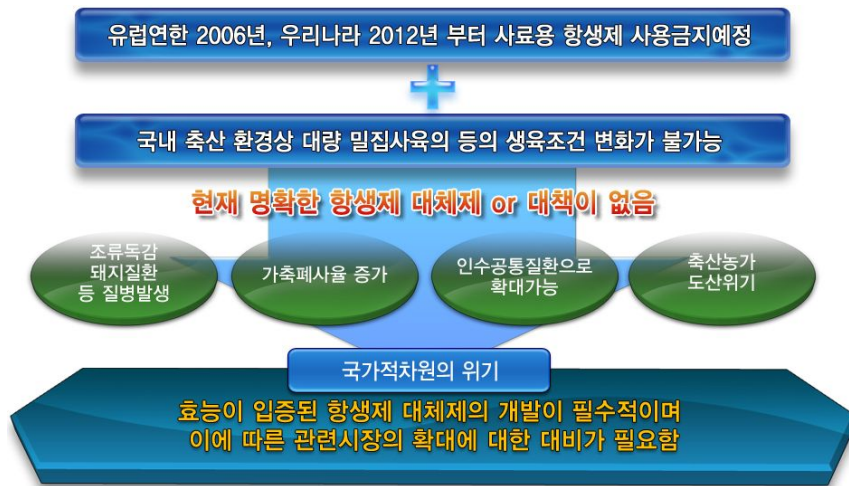
표 1. 국내 축종별 항생제 사용현황 (국립수의과학검역원, 2010)

구분	연도별 항생제 판매실적 (kg)						
	2009년도	2008년도	2007년도	2006년도	2005년도	2003년도	2001년도
소	63,066	99,291	121,254	118,889	111,974	107,588	91,921
돼지	551,109	661,530	874,305	835,825	831,319	818,358	917,842
닭	205,622	256,272	280,499	281,797	334,937	347,538	358,825
수산용	178,370	193,523	250,655	221,297	275,252	165,049	226,375
계	998,167	1,210,616	1,526,713	1,457,808	1,553,482	1,438,533	1,594,963

표 2. 국내 항생제 사용현황표 (국립수의과학검역원, 2010,단위,kg )

구 분	연도별 항생제 판매실적(Kg)						
	2009년도	2008년도	2007년도	2006년도	2005년도	2003년도	2001년도
배합사료 제조용	236,534	447,047	603,688	627,323	682,607	680,619	766,411
수의사처방용	92,817	89,822	84,447	83,875	94,634	109,721	116,530
자가치료및 예방용	668,816	673,747	838,578	746,610	776,241	658,193	712,022
계	998,167	1,210,616	1,526,713	1,457,808	1,553,482	1,438,533	1,594,963

배합사료내 항생제 사용금지가 2011년 7월 1일부터 본격 시행됨으로 인해 항생제 사용량은 뚜렷하게 감소될 것으로 추정됨. 농림수산물식품부는 지난해 7월 23일 유해사료의 범위와 기준 고시 개정(안)행정 예고를 한데 이어 지난해 12월 31일 확정고시를 마치고 예정대로는 7월 1일부터는 사료용 항생제 첨가를 전면 금지하겠다고 밝혔음. 사료 첨가용 항생제는 종전 44종에서 05년 5월 16종, 09년 1월 9종, 11년 7월 0종으로 항생제의 사용을 전면 금지하기로 하였음. 이를 통해 국내산 축산물에 대한 안전성 관리를 강화하겠다는 계획임.



이번 조치로 불특정 다수 가축을 대상으로 한 사료효율개선과 성장촉진용 항생제인 엔라마이신, 타이로신, 버지니아마이신, 바시트라신메칠렌디살리실레이트, 밤버마이신, 티아무린,아프라마이신, 아빌라마이신 등 항생제 8종과 항균제인 설파치아졸 등 9종은 배합사료 내 사용이 금지됨.

그러나 국내 농장에 100% 상재질병을 막는 항콕시딕제와 농가에서 필연적으로 쓰는 구충제에 대해서는 배합사료 중 착유용, 산란용, 큰소비육후기용, 비육돈 출하용, 육계 출하용에 한해서는 미검출돼야 한다는 조건으로 배합사료 내 혼합이 가능하며, 항콕시딕제는 살리노마이신, 모넨신나트륨, 라살로시드나트륨, 나라신, 마두라마이신암모늄, 샘두라마이신, 크로피돌, 디클라주릴 등 8종이며 구충제는 펜벤다졸임.

배합사료 내 항생제 사용에 대한 법적인 규제로 항생제 사용량은 뚜렷하게 감소될 것으로 추정되며 이는 결국 효과적인 항생제 대체제를 사용함으로써 항생제에 대한 효과를 대체할 수 있음.

## 제2절 항생제 대체제의 국내/외 현황 파악

### 1. 국내 항생제 대체제 사용 현황

우리나라는 미국, 일본, 유럽 등의 국가들과 비교하여 항생제 사용량이 월등히 많은 것으로 나타나고 있으며, 이러한 항생제 등의 동물약품의 오남용은 항생제 잔류와 내성균의 출현을 야기하여 동물 건강을 위협하고 있는 실정임

2009년 전체 축산물 항생제 사용량은 998톤으로 2008년 1211톤 보다는 18%, 2001년 1595톤보다는 37%가량이 감소함. 용도별로는 **배합사료제조용이 23.7%인 236.5톤**, 수의사처방용리 9.3톤, 자가 치료 및 예방용이 668.8톤 사용됨. 축종별로는 돼지가 가장 많은 551톤, 닭이 205.6톤, 수산용이 178.4톤, 소가 63톤이 사용됨. 매년 항생제 사용이 줄고 있으나 여전히 우리나라는 타 국가와 비교해 항생제 사용량이 많고 내성이 높음. 실제 육류 1톤당 항생제 사용량을 보면 우리나라는 0.44kg(2009년)인데 비해 미국은 0.3kg(2007년), 덴마크는 0.05kg(2008년), 일본은 0.4kg(2004년)에 불과함. 국내 육류 항생제 잔류 위반율도 2009년 0.15%으로 미국 0.82%, 영국 0.25%에 비해 높음. 배합 사료 내 항생제 사용금지가 2011년 7월 1일부터 본격 시행됨으로 인해 동물용 항생제 시장과 사용량은 뚜렷하게 감소될 것으로 추정됨. 이처럼 배합 사료 내 항생제 사용에 대한 법적인 규제로 항생제 사용량은 뚜렷하게 감소될 것으로 예상됨

국내에서도, 기존의 사료첨가용 항생제를 대체하기 위한 많은 연구가 수행되어 왔

으나 실제 성공한 사례가 거의 없으며, 대부분 외국 수입제품의 효능 비교 수준을 벗어나지 못하고 있음

국내에서도, 기존의 사료첨가용 항생제를 대체하기 위한 많은 연구가 수행되어 왔으나 실제 성공한 사례가 거의 없으며, 대부분 외국 수입제품의 효능 비교 수준을 벗어나지 못하고 있음

따라서, 우리나라가 보유하고 있는 동물, 식물, 미생물자원을 이용한 가축 사료용 항생물질 대체제 개발에 대해서는 지속적인 국내 축산산업 발전을 위해서 뿐 아니라 세계시장 개척을 위해서도 국가적 차원의 종합적 연구가 필요함

국내 항생제 대체제 사료첨가제 현황

(단위 : 천원)

	약효	업체	품명	매출액		약효	업체	품명	매출액
소화 기계	Saccharomyces	신한바이오	다이아몬드	8,094,362 (건위제)	면역 촉진	코리넨박테리아	버박코리아	울트라콘	634,394 (세균-바이러스)
	Selenium Yeast	대한뉴팜	이스트셀			유산균화학처리물	우성양행	주락물레프	
	Streptococcus	유한양행	엘비씨			포도상구균화학추출물	대성미생물	이뮤노스티	
	Bacillus	코미팜, 중앙바이오	락토바이오 슈퍼 CYC			프로피오닉박테리움	민우	인모듈렌 주	
	Lactobacillus	이와팜텍	주락-큐				1,557,349		
	유산균 발효복합제	대호	바이올락플러스	2,625,994 (소화제)	광물질	철푸로틴네이트	고려비엔피	아미질 250	1,461,377 (철)
	Xylase esterase	CTC-Bio	포자임 9302			엑스트라질	바이엘	프로통갈 주	
	Protease, Cellulase 등	한동	도리세라제-1			철메치오닌	진우약품	메트아이론	
	Chymotrypsin	코미팜	키로렙신			클렘토페론	대성미생물	대성펄림	
	산화마그네슘, 등	화성동물	옥시만산	10,141 (정장)		아연프로틴네이트	이와팜텍	모아징크	787,321 (아연)
	대황, 등 정장제	서삼	해파베트	452,743 (지사제)		아연메치오닌	신한바이오	진프로40	
	베라베린, 지사제	화성동물	베루파린-주	3,301,417 (복합소화기)		아연프로피온산	대호	바이오진	1,265,424 (미네랄)
	효소, 미생물배양체	대한뉴팜 유니바이오	라바자임 유비-락			셀레늄	중앙바이오 제일바이오	셀믹스 울가셀	
	탄산나트륨, 등	삼동무역	다이아푸루프		14,484,657		크롬트리피콜린산	삼조	
효모, 효소, 마그네슘	ELT	disxptmxks			황산동, 황산아연	동우TMC	캄트레이스		
					유황	삼동무역	데미잘		
면역 촉진	IgG, $\gamma$ -globulin, 등	ELT	이뮤노콘 F	922,955 (면역글로블린)	▶ 소계 : 18,768,807천원				
		삼동무역	바이오글로스트						
		대성미생물	액상감마주						
		대동신약	아이디원						
								2,726,801	

위 도표는 동물약품시장 중 사료첨가제의 국내 시장비중에 관한 도표임. 각 제제 중 면역촉진제는 고가의 IgG, 면역글로블린시장과, 중저가의 박테리아/추출물시장으로 나누어 볼 수 있음. 사료첨가용 항생제 대체제로 유.무기산제, 생균제, 프리바이오틱스, 식물추출물, 광물질 등도 (시장 규모 표기) 의 규모로 사용되고 있음. 그러나 대부분이 수입되어 사용되는 단점을 가지고 있음

사료첨가용 항생제 대체소재를 국내에서 개발하고자, 한방생약제 등을 이용한 항생물질의 추출이나 이의 활용을 통한 항생제 대체에 대한 연구가 진행된 바 있으나, 아직까지는 항생제 대체제로 산업화 할 만한 소재는 성공적으로 개발하지 못하고 있음

이지바이오, 씨티씨바이오, 대한뉴팜, 유한양행 동물약품사업부 등의 많은 국내 동물사료 회사들이 항생제를 대체할 수 있는 물질로 유.무기산제, 생균제, 프리바이오틱, 식물추출물, 광물질 등을 판매하고 있으나 이들의 대부분은 외국산이며, 일부 국내 한방생약제등을 이용한 항생물질의 추출이나 이의 활용을 통한 동물사료용 항생제 대체제에 대한 연구가 진행된 바 있으나, 기존의 항생제를 대체할 수 있는 물질을 개발되지 못하고 있음

2010년에 CJ 제일제당에서 병원성 세균만 골라 잡아먹는 미생물인 박테리오파아지를 활용해 인체에 해를 끼치지 않도록 한 항생제 대체물질인 바이오텍터를 출시하였지만 시장성은 불확실함

축산업이 비약적으로 발전했으나 대량 사육방식으로 변하면서 동물의 스트레스 증가와 면역력 저하, 질병발생 위험이 높아짐. 결국 항생제 사용이 높아지면서 가축에게는 항생제에 대한 내성이 생기게 됐고 항생제 잔류 문제가 발생함

이에 EU는 2006년부터 사료에 모든 성장촉진용 항생제의 사용을 금지했으며, 덴마크도 1995년부터는 육성돈, 2000년부터는 자돈에 대한 사료첨가용 항생제를 전면 사용금지함. 우리나라도 2005년부터 사료 내 항생제 첨가 금지를 단계적으로 추진해 옴

2005년 5월부터 44종이던 사료첨가용 항생제를 28종으로 줄였으며, 2009년 1월부터는 추가로 7종에 대한 사료첨가를 금지 시킨데 이어 2011년 7월부터는 나머지 엔라마이신, 타이로신, 바지니아마이신, 바시트라신 메칠렌디살리실레이트, 밤버마이신, 티아무린, 아프라마이신, 이빌라마이신 등 항세균제와 항균제인 설파치아졸 등 모든 사료첨가용 항세균성, 항진균성 항생제의 사용을 전면적으로 금지시켰음

이처럼 2011년 7월부터 사료첨가용 항생제 사용이 전면적으로 금지된 가운데 사료

첨가용 이외의 질병예방 및 치료 등의 목적으로 사용하는 동물용 항생제의 사용 금지도 세계적으로 확산되고 있음

닭, 돼지, 소 등의 식육에서 항생제 내성과 잔류라는 문제의 해결과, 수입에 의존하는 많은 양의 국내 소비용 항생제 대체제의 현황을 고려하면 국내 자체적으로 경쟁력이 있는 신규 동물 사료용 항생제 대체제를 개발하여 동물용 사료첨가제의 수입을 대체하고 국내바이오시장 활성화를 촉진시킬 수 있는 국가의 정책적 지원이 필요함

또한 친환경농업육성법의 시행과 함께 2007년도에 유기축산물 인증농가는 99호, 무항생제축산물 인증농가는 664호로 친환경축산물 인증농가는 급격히 증가하면서 농가단위에서 항생제를 사용하지 않는 사육방법에 대한 다양한 방법 들을 모색하였으나 과학적 검증이 미흡하여 사용에 어려움이 많음

우리나라의 경우 동물용 의약품의 사용이 선진국에 비해 월등히 높은 수준임(주요 국별 육류생산량 대비 항생제 사용 지수: 덴마크 0.05, 미국 0.25, 프랑스 0.29, 일본 0.36, 한국 0.92)

2010년 11월말에 경북 안동에서 발생하여 전국적으로 많은 피해를 줌 FMD로 인해 많은 농장들이 피해를 입고, 사육되고 있는 가축중이 많은 스트레스를 받고 있는 상황에서 사료용 항생제의 사용을 금지하는 것은 위험부담임

유기산제, 면역증강제, 생균제, 생균활성제, 효소제 및 식물성제제 등과 같은 천연 성장 촉진제는 내성균 잔류 및 세균 내성 문제에 대한 위험성이 발생하지 않으므로, 이를 이용한 소재개발 및 실용적 이용 방법의 확립이 필요함

항생제를 대체할 수 있는 물질로는 항균성 또는 항산화 활성이 우수한 식물추출물, 소화기관의 미생물이 정상적으로 공존 할 수 있는 미생물, 면역력을 강화할 수 있는 물질, 축산물의 품질을 향상 시킬 수 있는 물질, 사료의 소화작용을 증진시켜 이용성을 개선하는 효소제 및 이러한 물질들을 이용한 가장 이상적인 급여 기술 등이 있음. 하지만, 천연물은 항생제의 대체 가능성은 지니고 있지만, 효율이 항생제에 비해 낮거나 검정이 되지 않았으므로 기전구명을 통한 효율 향상연구가 보완되어야

함

## 2. 국외 항생제 대체제 사용 현황

최근 세계 사료산업은 제품의 안정성과 품질에 관한 심각한 도전에 직면해 있는데, 유럽에서는 살모넬라, 광우병, 다이옥신, 지하수 오염과 같은 사료와 관련된 질병이나 오염에 대한 우려가 10년 전보다 더 커지고 있으며, 사료업계는 HACCP (위해 분석중점관리제도)를 도입하여 청정육류를 생산하기 위한 기초를 확립하고 축산폐수 및 악취제거를 위한 친환경사료 제조에 초점을 맞추고 있음

따라서 사료용 기능성첨가제 산업 역시 이러한 구조변화에 점진적으로 대응하고 있는 상황으로 천연물 소재 개발 및 생산 활동이 아직은 축산업계 일각에서 이루어지고 있을 뿐 대량 생산체제를 갖추어 화학제품을 전면적으로 대체하기에는 효능과 생산기술면에서 개선할 여지가 많이 남아 있음. 현재 선진국에서 성숙기에 있는 축산업과 사료산업에 축산물의 고품질화 및 환경 친화적 생산방식 도입이 점차 늘어나고 있는데, 이와 같은 축산업의 질적 구조변화가 필연적이라 해도 그 속도는 경제성의 문제를 감안할 때 점진적으로 이루어질 전망이다

지난 수십 년 동안의 항생제 오남용으로 이미 해외에서는 VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*), MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)등이 발생되어 피해를 끼치고 있음. 이러한 피해를 줄이고자 하는 노력을 전세계적으로 항생제 사용이 가장 많은 동물 사료 첨가용 항생제 사용을 줄이기 위한 노력과 관련 법률이 제정되고 있음

유럽에서는 1998년부터 사용량을 줄여왔으며 최근 2006년에는 의사처방 없이 항생제가 거의 사용되지 않고 있음. 하지만 우리나라는 2006년부터 사용 가능한 항생제 품목이 50개에서 25개로 줄어들면서 축산업 전체에서의 항생제 사용이 점점 줄어들고 있으나 치료용 항생제(자가 치료용, 수의사 처방) 등의 사용량은 아직도 상당 수준임.

(단위:1000kg,톤)

구분	미국	일본	덴마크	한국	뉴질랜드	스웨덴
축산물 생산량	39,821,515	3,045,510	2,150,318	1,690,879	1,324,205	547,850
항생제 사용량	5,799	1,084	94	1,541	53	17

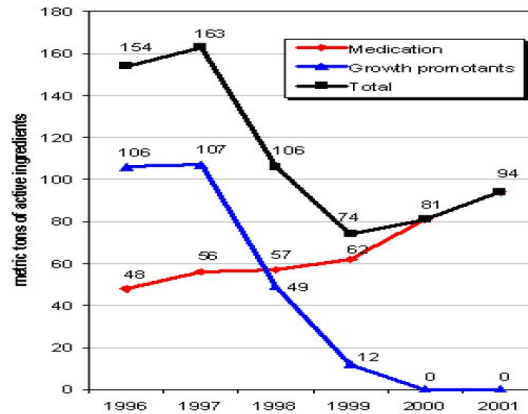
2006년 양돈신문

유럽의 규제는 사료 내 첨가하는 동물용 성장 촉진 목적의 미생물억제제의 사용을 금지하는 것임. 사용 중이었던 아빌라마이신, 밤버마이신, 살리로마이신과 모넨신의 사료 내 첨가를 2006년을 기점으로 중단함. 또한 항생제 대체물질에 관한 연구를 활발히 진행하고 있으며 최근 지방산 성분을 이용한 항생물질 대체, 이유자돈에 대한 구연산과 초산의 급이를 통한 항생제 대체 효과에 진일보한 것으로 알려지고 있음

덴마크 정부는 1998년 양돈 산업 단계 중 비육돈 단계에서 사용하는 성장 촉진용 항생제의 사용을 자발적으로 금지하는 제도를 만들었음. 2000년 1월 1일부터 덴마크는 이유 자돈 단계까지 포함하여 항생제 사용을 중단하였음. 이런 항생제 사용 중단이 효과가 어느 정도의 가치인지를 평가하는 좋은 시장을 제공하고 있음. 수출 중심의 시장 구조에 의한 생산 시스템을 갖고 있기 때문이며 또한 생산비 및 항생제 사용에 대한 기록이 매우 철저한 시스템을 보유함. DANMAP(덴마크 항생제 내성 감시 및 연구 프로그램)을 통해 동물에서 분리된 박테리아의 내성을 추적해 수의사별, 농장별, 항생제별 처방 상황을 모니터링 할 수 있음

1996년에 양돈 사업에서 사용된 항생제 총량은 active ingredient로 154톤이었음. 이중 성장 촉진용으로 사용된 양이 106톤, 치료용으로 사용된 양이 48톤임. 1998년부터 비육돈 단계에 사용되었던 항생제가 줄어들기 시작하여 총 사용량은 106톤으로 감소함. 즉 성장 촉진용으로 사용되던 항생제가 107톤에서 49톤으로 약 50%가 감소하게 되었고, 치료용 항생제는 큰 변화 없이 유지됨. 1999년에는 총 사용량이 74톤으로 크게 감소함





\* 퓨리나 기술연구소

<덴마크 항생제 총 소요량 변화>

항생제의 총 사용량은 1999년 74톤에서 2000년 81톤, 2001년에는 94톤으로 증가하기 시작함. 이런 증가에도 불구하고, 2001년 항생제 총 사용량은 비육 단계에서의 금지 전인 1996년 대비하였을 때, 약 60% 수준에 그친 것으로 조사됨

일본의 경우 사료용 생균제를 항생제 대체제의 하나로 사료원료로 이미 사용하고 있으며, 유럽연합(EU) 역시 항생제 대체제로 생균제 등록을 시작하고 있음

미국의 경우, 1997년에 미국 농무부(USDA)에서 유기농으로 생산된 식육의 표시제한을 개선하면서부터 무항생제 유기축산이 폭발적으로 확대되어 6개주의 관계기관과 26개의 개인 인증기관에서 2001년부터 인증서비스를 시작하였음

FDA에서는 가축의 항생제 사용의 제한을 권고함. 미국 FDA는 가축과 인간 모두의 항생제 내성을 방지하기 위해 가축 생산 및 사료첨가제에 있어서 항생제 사용의 제한과 식품으로 생산되는 가축은 항생제를 보다 신중하게 사용할 것과 항생제 내성을 방지하기 위한 조치들을 공식 권고하였음. 또한 가축과 인간의 건강을 보호하는 한편 항생제의 남용을 피하기 위한 전략을 개발, 협력을 위한 가축 건강 커뮤니티와 공중 보건 커뮤니티의 필요성을 강조하였고, FDA 권고안대로 가축사육이 이루어지면 미국 축산물에 대한 이미지 제고 효과로 국내 소비 및 수출에 긍정적 효과를 기대함 (CNN 보도자료(2010.06.28.) 주요 내용)

호주의 경우, 호주 유기쇠고기를 대표하는 것을 1995년에 31개 생산자가 공동으로 조직한 OBE 회사로서 항생제나 화학물질을 사용하지 않고 자연의 들풀이나 약초를

사료로 이용하여 육성하고 있음

### 3. 국내/외 항생제 대체제 관련 주요 기술연구 현황

국내외적으로 항생제사용규제로 인해 다양한 소재를 활용하여 대체제로 개발하고자 하는 노력이 지속적으로 이루어지고 있음. 국내 국외 주요 기술 연구 현황은 아래표와 같음

국내 기술현황
1. 락토페린 발현용 재조합 곰팡이 균주 및 이로부터 얻은 재조합 2. 천연항생제 콜레스틴 3. 게르마늄 흑운모를 항생제 대체 4. 감귤박 발효를 통한 바실러스 유래 항생제 대체제 생산 5. 프리믹스처 사료, 종균 사료 등이 판매, 개발되어지고 있음
국외 기술현황
1. 호주 CSIRO의 축산산업연구팀 Cytokine 치리로 대체 연구 진행중 2. 현재 항생물질 대체를 위해 유기산, mannan, transgalacto, fructooligosaccharide등의 투여가 주로 이용

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1절. 제1세부 과제

(발효 화합물의 대량 생산 및 항 미생물 활성 연구)

연구 책임자 : 유 진 철

#### 1. 균주 동정 (일반적 특성분석)

58개의 단위 형질에 대하여 Williams 등(1983, J. Gen. Microbiol. 129: 1743~1813)의 방법에 따라 실시. 탄소원으로부터 산 생성, 질소원 이용, 유기산 이용 등은 막여과지(직경: 0.45  $\mu\text{m}$ ) 위에 자란 균사체를 접종원으로 이용하였으며 나머지 실험은 glycerol 현탁액을 접종원으로 이용. 항생물질 생성 시험, 분해능 및 항생물질 내성 시험, 멜라닌 생성, 증식 및 영양요구성 시험 등은 평판배지를 사용하였으며, 다점접종기 (multipoint inoculator)를 이용하여 접종. 질산염환원, 황화수소( $\text{H}_2\text{S}$ ) 생성, hippurate 가수분해 시험은 test tube를 사용하였다. 당으로부터의 산 생성과 유기산 이용의 시험은 microwell plate를 사용하여 각 균주간의 간섭을 방지하였다. 접종된 배지는 28°C에서 일정기간 배양하여 결과를 관찰.

#### 1) 형태적 특성

ISP4 배지에서 14일간 (혹은 21일 간) 30°C에서 배양한 후 현미경과 육안으로 spore chain morphology, spore mass color, substrate mycelium color를 관찰. Diffusible pigmentation (ISP5 배지), 멜라닌 색소 생성은 PIA(Peptide Iron Agar : ISP medium 6)배지와 Tyrosine Agar(ISP medium 7)에서 시험 방선균을 3주간 배양한 후 melanine 생성 여부를 육안으로 관찰.

#### 2) 효소 생성 및 분해능

##### (1) Lipolysis

Egg-yolk medium에 6일간 배양한 후 colony 주위에 덜 불투명한 creamy-yellow 색의 침전 (주위가 깨끗하지 않음)이 생기는지 확인.

##### (2) Nitrate reduction

GYE 배지에 0.1%  $\text{KNO}_3$ , 0.17% agar(Skerman, 1967)를 첨가하여 균을 접종하고 3주간 배양 후 test A reagent(100 ml 5 N acetic acid에 0.8 g sulphanilic acid를

녹인 것) 3방울과 test B reagent(100 ml 5 N acetic acid에 dimethyl- $\alpha$ -naphthylamine을 녹인 것) 3방울을 떨어뜨렸을 때 장미빛/적색이 생기면 nitrate reductase양성으로 기록.

### (3) Hippurate hydrolysis

Hippurate broth(Gordon et al., 1974)에 시험균주를 접종하여 배양 3주 후 상등액 1 ml을 산성 FeCl<sub>3</sub>용액 1.5 ml과 섞어 실온에서 4시간 정치한 후 산 혼합물에 crystal 결정이 생기면 hippurate hydrolysis로 간주함.

### (4) H<sub>2</sub>S 생성

SIM medium을 test tube에 분주하여 균을 접종한 후 시험관 끝부분에 lead acetate filter paper strip(BDH)을 tube 목 부분에 두었다. 배양 2주 후에 strip의 색깔이 갈색이나 흑색으로 이 바뀌었으면 H<sub>2</sub>S생성의 양성으로 기록.

### (5) Starch degradation

GYEA 배지에 soluble starch(1%, w/v)을 첨가하여 배지에 균을 접종한 후 배양 3주 후 요오드 용액을 흘렸을 때 증식균 주위에 투명환이 형성되는 것을 양성으로 판정.

### (6) Elastine, xanthine, guanine, xylan degradation

Elastine, xanthine, guanine, xylan을 각각 0.1% 첨가한 GYEA배지에 시험균주를 접종한 후 3주간 배양한 후 관찰하여 종식한 균체 주위와 균체 아래의 배지가 투명하게 된 경우(clear zone)를 양성으로 판정.

### (7) Arbutine degradation

21일 배양한 후 control 배지와 비교하여 brown-black pigment 생성 (control에서 소량의 melanin이 생성될 수 있음)을 관찰.

### (8) Urea degradation

Urea 분해능은 phenol red(0.04%, w/v)이 첨가된 Gordon's 액체배지에 여과 멸균한 urea(15%, w/v)를 가하고 균을 접종한 후 28일간 배양한 후 배지가 오렌지색이나 황색에서 핑크빛이나 적색 혹은 자주색으로 변하면 양성으로 기록하였다. 28일간 28°C에서 배양 후 alkaline reaction 에서 red를 양성으로 확인.

### 3) 생장 시험

MBA에 접종한 후 10℃와 45℃에서 14일간 배양한 후 생장 여부를 관찰. MBA에 각각 NaCl (3% w/v), NaCl (7% w/v), NaN<sub>3</sub> (0.01% w/v), phenol (0.1% w/v), potassium tellurite (0.001% w/v), thallos acetate (0.001% w/v)을 첨가하여 균을 접종하고 30℃에서 14일간 배양하여 생장여부를 관찰하.

### 4) 항생물질에 대한 내성

Neomycin, rifampicin, oleandomycin, penicillin G가 첨가된 MBA 배지에 접종하고 1, 2, 3, 7일간 배양한 후에 억제환의 생성여부를 관찰.

### 5) 질소원 이용

기본 배지에 3회 간헐 별균한 DL- $\alpha$ -amino-n-butyric acid, L-threonine, L-cysteine, L-valine, L-phenylalanine을 각각 0.1% 되게 첨가하여 배지를 만듬. 균을 접종하여 14, 21일간 배양한 후 positive control, negative control과 비교하여 생장정도를 관찰.

### 6) 탄소원 이용

최소배지(peptone, 2 g ; NaCl, 5 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g ; agar 3 g, D.W. 1 ℓ)에 16 종류의 당(D-galactose, sucrose, meso-inositol, mannitol, L-rhamnose, raffinose, D-melezitose, adonitol, D-melibiose, dextran, xylitol, L-arabinose, D-xylose, D-fructose, D-lactose, salicin) 15%용액 각각을 최종농도가 1% 되게 첨가하여 사용. 이 각각의 배지에 indicator로 bromocresol purple(0.04% w/v) 15 ml를 첨가. 시험 균주를 배양 한 후 탄소원으로 제공된 당을 이용한 균주들에 의해 배지내 pH가 하강함으로써 배지 내 색이 청자색에서 황색으로 변하였을 때 양성으로 판정.

### 7) 유기산 이용

4종류의 유기산(최종농도 각각 0.1%의 sodium acetate, sodium citrate, sodium propionate, sodium pyruvate)을 각각 2 g/ℓ씩 첨가한 최소배지(Koser, 1924)에 indicator로 phenol red(0.04% sol. of phenol red, 20 ml)를 첨가. 시험 균주를 접종, 배양한 후 적변 여부를 관찰.

## 2. 균주동정(유전적 특성 분석)

### 1) DNA 추출

DNA 추출법 (Chun, J., and M. Goodfellow, 1995. Int. J. Syst. Bact. 45 : 240-245)을 이용하여 실험 균으로부터 chromosomal DNA를 분리하. 동결건조 균체에 lysozyme solution 100  $\mu$ l (50 mg/ml)를 첨가하고 37°C에서 overnight 한 후, RNase 10  $\mu$ l (10 mg/ml)를 첨가하고 37°C에서 1시간, proteinase K 11  $\mu$ l (20 mg/ml)를 첨가하고 45°C에서 30분, guanine- sarcosyl solution 500  $\mu$ l 첨가하고 37°C에서 10분 처리한 후 5분 동안 냉각. 차가운 ammonium acetate 250  $\mu$ l (7.5 M)을 넣고 10분 동안 냉각한 후 phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1의 용액 450  $\mu$ l를 첨가하고 13000 rpm에서 5분간 원심 분리. 상등액에 chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1의 용액 450  $\mu$ l를 첨가한 후 13000 rpm에서 1분 동안 원심 분리 하여 상등액에 다시 차가운 isopropanol 250  $\mu$ l를 첨가하고, 6,000 rpm으로 20초 동안 원심분리. 얻어진 침전물을 70% ethanol로 세척하고 6,000 rpm에서 20초 동안 원심분리 하였다. 위의 두 과정을 반복하고, pellet을 충분히 건조한 후, DNA는 멸균 증류수 30  $\mu$ l에 다시 녹여 사용.

### 2) 16S rDNA의 증폭 및 염기서열분석

16S rDNA는 capillary rapid cycler (Idaho Techonlogy)로 증폭하였으며 primer로는 27 F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCT-3') 1492 R (5'-AAGGAGGTGWTCARCC - 3'). 증폭조건은 변성은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분, 신장은 72°C에서 1분간 총 30회 반복.

증폭된 DNA는 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)와 oilgonucleotide primers를 이용해 직접 서열을 확인.

### 3) 계통분석(Phylogenic analysis)

얻어진 16S rDNA 염기서열은 AL16S program을 이용해 Ribosomal Database Project 와 EMBL/GenBank database로부터 얻어진 actinomycetes의 16S rDNA sequence와 비교 분석 (Chun, J., 1995. Computer-assisted classification and identification of actinomycetes. PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne).

### 3. 균주동정 결과

- 제1세부 과제팀에서 확보하고 있는 국내 토양에서 분리한 700여종의 세균을 대상으로 선택적인 항균성, 특히 다약제 내성균인 MRSA(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) 균주에 선택적으로 작용하는 항생물질을 분비하는 토양세균을 검색하여 후보 미생물로 **CS.682 균주**를 선별하였음
- CS682 균주는 OSYM(oatmeal, soytone, yeast extract, malt extract) 배지상에서 회백색의 포자를 형성하고 멜라닌 색소를 배지 중에 분비하는 **방선균류**에 속하였으며, 16S rDNA 염기서열을 분석하였음.
- 이상의 morphology 와 16s rDNA 서열분석을 토대로 Strain CS684가 ***Nocardia*** 속에 속함을 알 수 있었으며, *Nocardia* spp DSM 43395와 가장 유사함을 알 수 있었음. 본 균주를 ***Nocardia* sp CS682** 라 명명하였음.
- 이상의 연구에 의해 분리동정 되어진 *Nocardia* sp CS682 를 한국생명공학연구원 생물자원센터 균주기탁은행(KCTC)에 기탁하였음.

Table 1. Characteristics that differentiate strain CS682

Characteristics	CS682
Mycelium and spore formation	+
Mycelial pigment color	grey
Diffusible pigment	+
Diffusible pigment color	brown
Melanin formation	-
Growth at:	
NaN <sub>3</sub> (0.01% w/v)	+
Phenol (0.1% w/v)	+
Potassium tellurite (0.001% w/v)	+
Thallos acetate (0.001% w/v)	+
Crytal violet (0.0001% w/v)	+
Temperature (°C) (Optimum)	15-40 (35)
NaCl (%) (Optimum)	0-4 (0)
pH (Optimum)	6-9 (7)
Hydrolysis of Hippurate	-
Lipolysis	-
Nitrate reduction	-
H <sub>2</sub> S production	-
Decomposition of:	
Elastine	+
Xanthine	+
Guanine	+
Xylan	+
Arbutine	+
Allantoin	+
Urea	+
Carbon sources utilized:	
D-galactose	+
Sucrose	+
meso-Inositol	+
Mannitol	+
L-Ramnose	+
Raffinose	+
D-melezitose	+



Characteristic	CS682
Carbon sources utilized:	
Adonitol	+
D-melibiose	+
Dextran	+
Xylitol	+
L-arabinose	+
D-xylose	+
D-fructose	+
D-lactose	+
Salicin	+
Sodium acetate	+
Sodium citrate	+
Sodium propionate	+
Sodium pyruvate	+
Nitrogen sources utilized:	
DL- $\alpha$ -amino-n-butyric acid	+
L-threonine	+
L-cysteine	+
L-valine	+
L-phenylalanine	+
L-histidine	+
L-hydroxyproline	+
Potassium nitrate	+
Antibiotic test ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	+
Polymyxin B (300)	S*
Kanamycin (30)	S*
Amikacin (30)	R*
Chloramphenicol (30)	R*
Penicillin (10U)	S*
Streptomycin (10)	S*
Nalidixic acid (30)	R*
Erythromycin (15)	S*
Vancomycin (30)	R*
Gentamicin (10)	R*
Ampicillin (10)	S*
Tetracycline (30)	R*

Characteristic	CS682
Antimicrobial activity:	
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Micrococcus luteus</i>	+
<i>Candida albicans</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+
<i>Streptomyces murinus</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	-
<i>Escherichia coil</i>	-
G+C%	63.6%

\*S: Sensitivity R: Resistance

Table 2. 분석된 Strain CS682 의 total 16S rDNA 서열분석

1,414 bp

GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTC  
GGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTCG  
CACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCATG  
GGATGCATGTTTCGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCCCCGCG  
GCCTATCAGCTTGTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGACGGGTA  
GCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG  
ATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTT  
TCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCC  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGG  
AATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTCTGTGCGCTCTTCTGTGAA  
AACTTGGGGCTCAACCTTAAGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTAGAGTA  
CTTCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC  
AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGAAGTAACTGACGCTG  
AGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
GCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGC  
CGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTA  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGAT  
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAA  
ACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGG  
CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGA  
CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC  
CCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCT  
GCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT  
CGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA  
TCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  
CACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTG  
GGAGGGAGCCGT

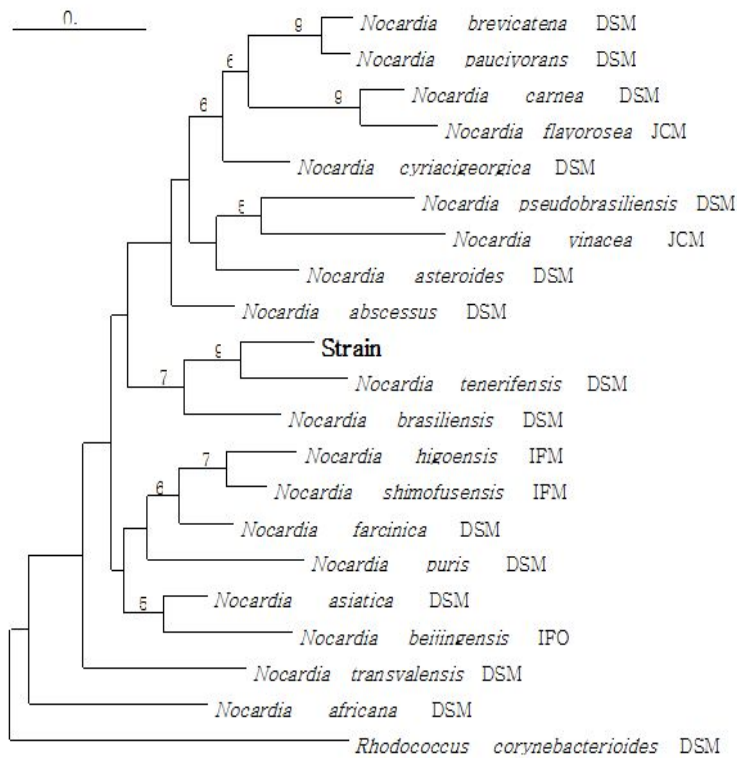


Fig.1. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences showing relationships between strains CS682 and related members of the family *Nocardiaceae*. The percentage numbers at the nodes are the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. The sequence of *Rhodococcus corynebacterioides* DSM 20151<sup>T</sup> (AF430066) was used as an outgroup. Bar, 0.01 nucleotide substitution per position.

#### 4. *Nocardia* sp. CS682의 최적발효 조건

: 1L 플라스크의 배지조성에 따른 발효

- 균주배양, 균체량의 측정 및 *Nocardia* sp. CS682가 생산한 cs682의 항 MRSA 활성 측정은 국내 병원에서 분리한 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* 693E 균주를 시험균주로 사용하여 억제환(inhibition zone)의 크기를 조사하였음.

- 먼저 flask 배양을 위하여 최적 배지성분의 검토를 위하여 CS682의 생산능이 우수

한 탄소원의 선정은 기본배지에 각종의 탄소원(D-(-)Fructose, Glucose, Lactose, D-(+)-Maltose, Mannitol, Soluble starch, D-Sorbitol, Sucrose, Glycerol)을 1%(w/v)씩 첨가하고 항 MRSA 활성을 측정하여 선정하며, 질소원은 각종의 유기 질소원과 무기질소원으로 부터 평균활성을 측정하여 선정하였음.

- 또한 선정된 배지 조성 중 높은 활성을 나타내는 배지의 질소원들을 일정한 비율로 조절하여 활성을 측정하여 가장 우수한 성분을 선정하며, 금속염에 영향을 알아보기 위해서 각종 금속염(CaCO<sub>3</sub>, NaCl, KCl, CuSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>)에 0.1%(w/v)이 되도록 첨가하여 저해물질의 생산에 미치는 영향을 조사하였음.

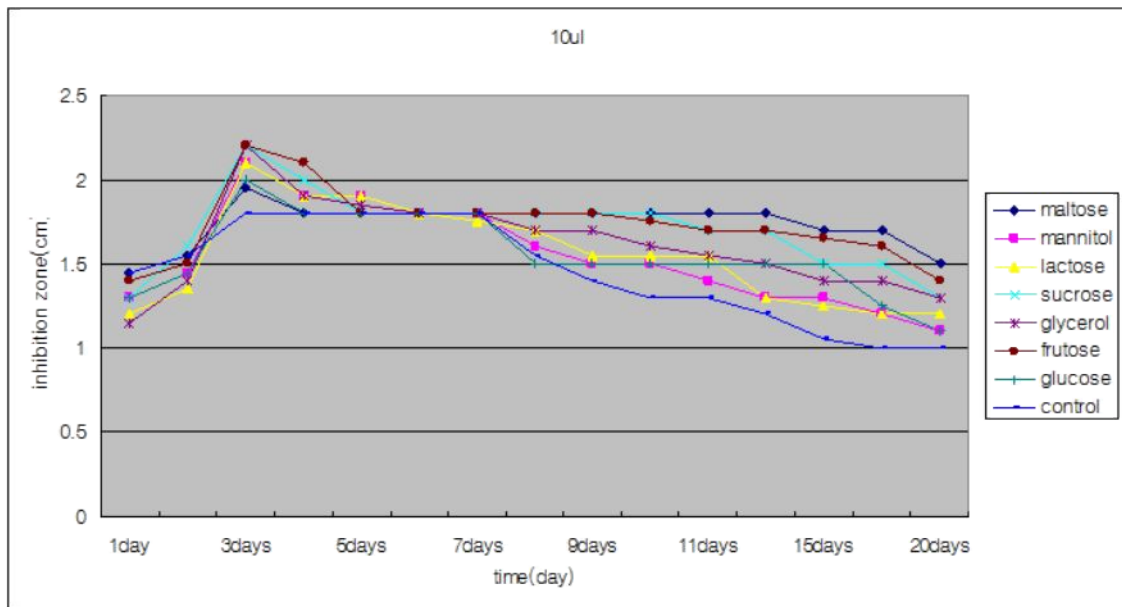


Fig.2. 다양한 carbon source 가 1L flask 기본배지에서 CS682 활성에 미치는 영향

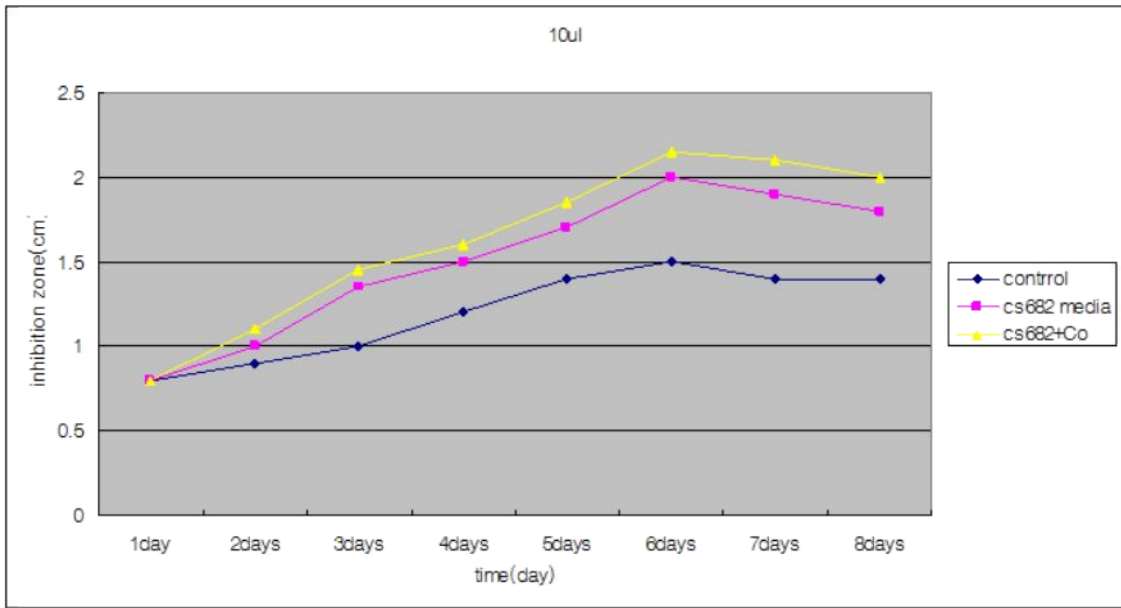


Fig. 3. 금속염이 발효배지 미치는 영향

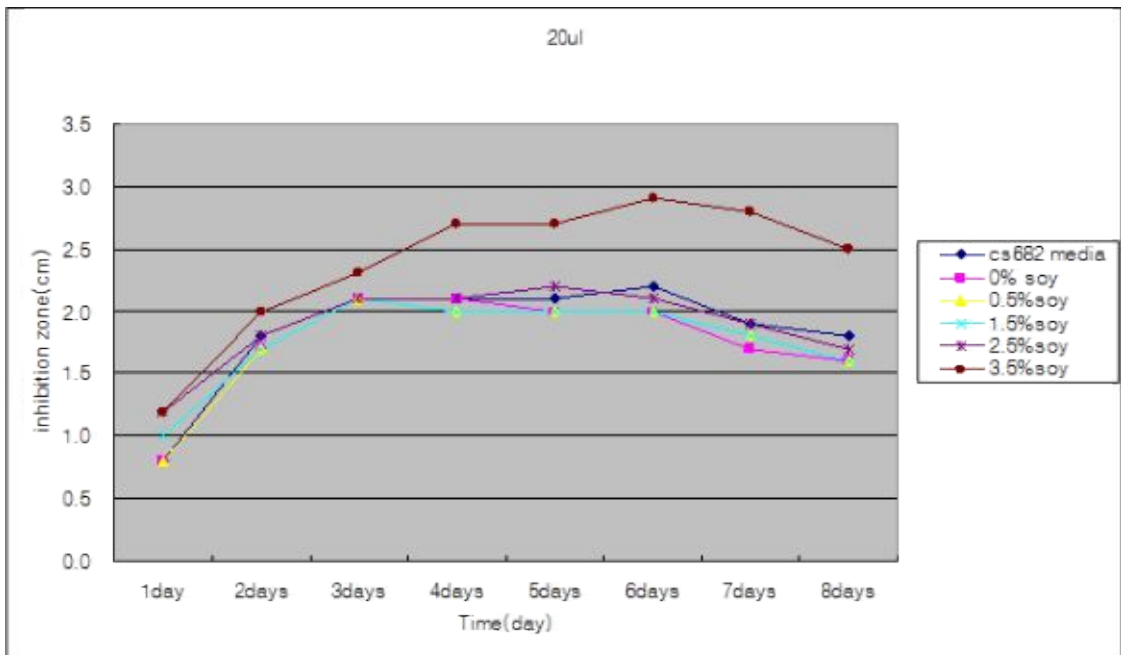


Fig.4. 발효배지에서 soy bean 첨가량에 따른 활성효과

○ 배지조성은 아래와 같음.

- New media : glucose 2.5%, yeast extract 0.2%, CaCO<sub>3</sub> 0.4% +soybean
- CS682 media : maltose: 1%, oat meal: 0.3%, soy bean: 0.3%, yeast extract: 0.3%, CaCO<sub>3</sub>: 0.1%

- 이상의 1L flask에서의 실험결과를 토대로, 탄소원으로는 maltose, glucose 가 가장 적합한 것으로 확인되었으며, 질소원으로는 soybean meal (3.5%)일 때가 최적의 조건임을 확인되었음.

**: 7 L 발효조에서의 CS682 생산 최적화**

- 250 ml baffled flask 및 1 L baffled flask에서의 결정된 최적발효 조건을 바탕으로 산업적인 규모의 배양을 위해 7 L fermentor 에서 최적 생산조건을 조사하였음. Inoculum size와 Aeration을 조정하여 세포의 성장과 항생물질의 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며 결과를 바탕으로 퍼멘터에서의 최적발효조건을 결정하였음. 7 L Fermentor에 inoculum size를 4%(v/v)로 하여 접종하고 산소공급은 1 vvm 공급하면서 배양시간별 발효정도를 조사하였다. 아래그림에서와 같이 3일 배양 시 최고조에 이르렀으며 그 후는 점차적으로 감소하였음.

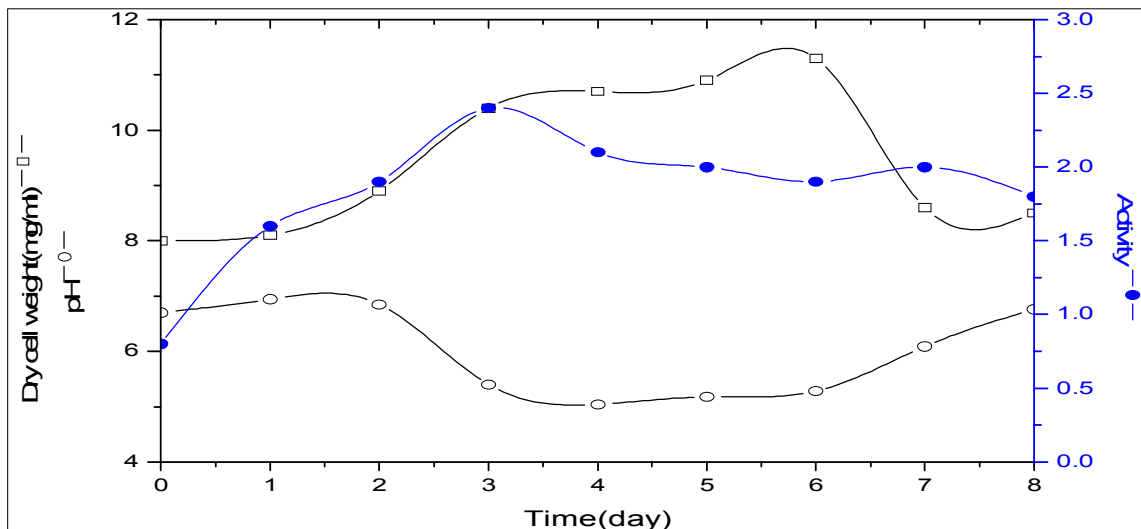


Fig. 5. Profiles of the cell growth and the CS682 production at optimal medium by *Nocardia* sp. CS682 in 7 L-fermentor.

**5. CS682의 분리공정개선**

- *Nocardia* sp CS682 균주를 OSYM 액체배지에서 배양하여 원심분리하고 배양

여액을 회수한 뒤 filtration 하였음. 배양여액 20 L를 50% Dichloromethane으로 2회 추출하여 얻은 추출액을 감압 농축하고 약 20 ml의 MeOH로 녹여 이 시료를 MeOH로 평형시킨 sephadex LH-20 gel로 충전된 column(2.5×110 cm)에 적하하여 chromatography를 실시하였음(용출속도: 50 ml/h, 분획 용량: 10 ml, 용출용매: MeOH). Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 항 MRSA 활성이 1 peak로 나타났으며, 활성을 보이는 분획물을 모아 농축건조시킴. 농축건조시료를 소량의 ethylacetate에 녹인 후 기존의 prep-TLC 대신에 Silica gel column chromatography를 실시하여 (용출 용매, hexane: ethylacetate=2.5:1) CS682의 회수율을 기존방법보다 1.5배 향상시켰음.

## 6. scale-up process

제품의 대량 생산을 위해 두 종류의 발효조 (50L, 500L)를 선정하였으며 발효조는 한국생명공학연구원 정읍분원의 생산기기를 사용하였음.

최적생산을 위한 균주, 발효용 배지의 조건 및 발효조 작동조건은 아래와 같음.

Strain: *Nocardia* sp. CS682

Media: Maltose 0.5%

Oatmeal 0.25%

Soybean meal 0.25%

Yeast ex 0.25%

Calcium carbonate 0.05%

Seedculture: 30L(50L fermenter)

Mainculture: 350L(500L fermenter)

Condition: 28°C, 0.5vvm, 150rpm

### 1) 50L 발효조 배양

배양에 사용된 균주, 배지 및 배양조건은 아래와 같다.

Strain: *Nocardia* sp. CS682

Media: Maltose 0.5%



Oatmeal 0.25%  
 Soybean meal 0.25%  
 Yeast ex 0.25%  
 Calcium carbonate 0.05% / **30L**

Condition: 28°C, 0.5vvm, 150rpm

배양에 접종한 seed는 4.0% inoculum으로 접종하였으며 접종 후 온도, 용존산소량, 산소공급 및 교반속도가 일정하도록 모니터링 하였으며 배양 기간동안 24시간에 1회 배양액을 채취하여 생산된 Nargenicin의 항 MRSA활성을 측정하였음. 50L 배양기에서 시간에 따른 Nargenicin의 활성은 아래와 같음.(표 3)

Table 3. 시간에 따른 항MRSA활성변화

시간	Assay(20ul)	Assay(40ul)
0	0	0
24	0	0
48	0	0
72	0	1.3
96	1.3	1.7

2) 500L 발효조 배양

배양에 사용된 균주, 배지 및 배양조건은 아래와 같음.

**Strain:** *Nocardia* sp. CS682

**Media:** Maltose 0.5%

Oatmeal 0.25%  
 Soybean meal 0.25%  
 Yeast ex 0.25%  
 Calcium carbonate 0.05% / **350L**

**Condition:** 28°C, 0.5vvm, 150rpm

배양에 접종한 seed는 50L 발효기에서 30L의 발효액을 96시간 배양 후 500L발효기로 접종하였으며 접종 후 온도, 용존산소량, 산소공급 및 교반속도가 일정하도록 모니터링 하였으며 배양 기간동안 24시간에 1회 배양액을 채취하여 생산된 Nargenicin의 항 MRSA활성을 측정하였음.

500L 배양기에서 시간에 따른 배양조건의 모니터링 및 Nargenicin의 활성은 아래와 같음.(표 4)

Table 4. 500L 발효조에서의 *Norcadia* sp. CS682발효 모니터링 결과

Time (Hour)	p H	D O	relative activity(%)	Temperature(°C)	AIRFLOW (L/min)	Pressure (bar)	Agitation (rpm)
1	7.04	99.1	0	28.2	55	0.18	72
6	7.37	100.0	0	28.2	175	0.20	150
12	7.49	100.0	0	28.2	175	0.20	150
18	7.74	100.0	0	28.2	175	0.20	150
24	8.34	98.9	0	28.2	175	0.20	150
36	8.74	100.0	48	28.2	175	0.20	150
48	8.76	99.9	72	28.2	175	0.20	151
60	8.86	100.0	80	28.2	175	0.20	150
72	8.98	100.0	84	28.2	175	0.20	150
96	9.05	100.00	100	35.6	28.2	0	0.00

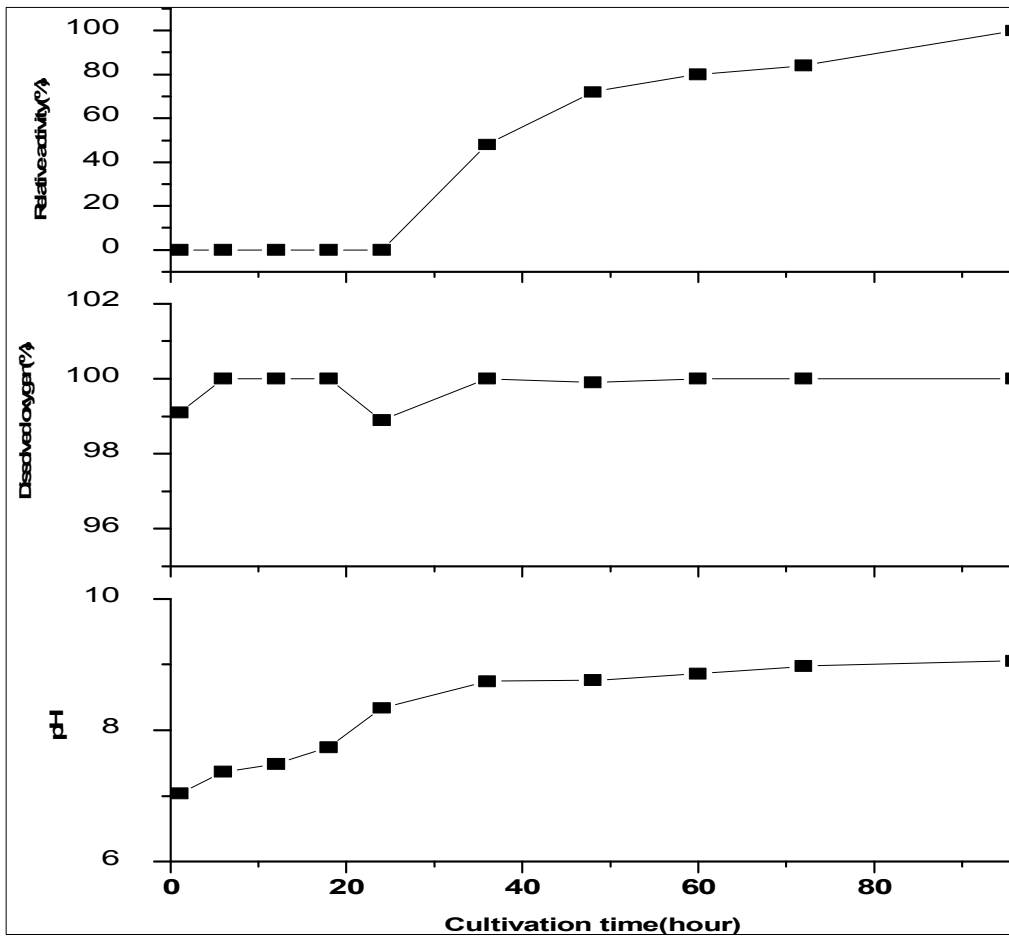


Fig. 6. 500L 발효조에서의 *Norcadia* sp. CS682 발효 모니터링 결과

Nargenicin의 생산량은 20시간에 증가하기 시작하였으며 50시간부터 활성이 일정하였음. pH그래프와 같이 pH는 약 7에서 시작하여 9.05까지 배양 기간 동안 서서히 증가하였음. 배양 기간 동안 pH는 배양기 오염의 지표로 활용될 수 있으며 오염이 되지 않는 경우는 pH가 배양일에 따라 증가하며 발효조의 오염 시 pH는 감소경향을 띠는 것을 확인함.(data not shown)

### 결과

50, 500L 발효조를 이용하여 대량생산을 수행함. 발효 후 얻은 발효액은 균사체 분리, 농축, 동결건조를 통해 제품으로 생산하였음.

50, 500L 발효 시 발효과정 중 발생한 문제는 아래와 같았으며 본 연구진은 이를 해결하여 500L규모의 발효조까지 안정적으로 발효, 제품생산조건을 확립하였음.

- 실험실내의 발효조의 최대 배양은 약 5L에서 이루어지는데 50L, 500L로 약 10배 내지는 100배로 규모가 증가하게 되는 경우 1) 배지준비 시 멸균문제, 2) 배양 시 배양액에서 form의 형성, 3) form형성에 따른 antifoam의 사용문제가 생김.

배지내용물 중 oatmeal과 soy bean meal의 경우 bacillus sp.의 내생포자를 많이 함유하여 배지 준비 후 bacillus 오염문제를 종종 일으킴. 특히 발효조 규모가 증가할 수록 bacillus오염문제는 더욱 심각해짐을 알 수 있었으며 본 연구진은 bacillus sp. 오염을 방지하기 위해 공 멸균, 및 부분멸균을 통해 오염문제를 해결하였음.

또한 oat meal과 soy bean meal은 영양원으로써 CS682의 배양에 필수요소인 동시에 대량 배양 시 form을 일으키는 주원인이 되었음. form은 이차적으로 물리적으로 균체를 배양액 밖으로 밀어내어 균체를 배양기의 벽면에 지속적으로 붙게하여 결과적으로 활성물질의 생산량을 저해함. 50L, 500L의 배양기내의 문제해결 방안으로 1) antifoam을 첨가하거나 2) 발효조의 임펠라의 rpm을 조절하여 물리적으로 제거할 수 있었다. 그러나 5000L이상의 발효조에서 scale up을 수행할 경우 antifoam공급과 물리적 제거도 한계를 가질 것으로 예상되므로 다음연도 연구 수행 시 새로운 대량 배양용 배지확립에 관한 실험을 추가 수행해야 할 것임.

## 7. 배양액의 농축 및 동결건조

### 1) 배양액의 농축

500L 발효조 2기를 사용하여 *Nocardia* sp. CS682를 배양하여 얻은 배양액을 먼저 연속식원심분리기를 이용하여 균사체와 배양 상등액을 분리하였음. 균사체는 제거하였으며 배양 상등액은 약 660L을 회수하였음. 회수한 상등액은 약 60-65℃에서 감압 농축하여 100L수준으로 농축한 후 2%에 해당하는 옥수수전분을 첨가한 후 동결건조를 수행하였음. 동결건조 후 7.3kg의 분말을 얻었으며, 동결건조 후 성상, 물성개선 및 제품함량을 고려하여 옥수수전분 3.7kg을 첨가하여 완제동결건조 제품 11kg을 만들었음.

배양상의 농축 시 열안정성을 확보하기 위해 안정성시험을 실시함.

배양액을 소량(50ml)취하여 conical tube에 넣고, 90℃ water bath에서 수욕상 가열을 하였음. 수욕상 가열을 하면서 0,4,6,12시간에 샘플링을 하여 MRSA균주를 도말한 배지에 paper disk를 올려놓고 40ul씩 투입하여 bioassay를 실시함. 안정성 시험 결과는 아래와 같음.(표 4)

Table 4. CS682배양액의 온도안정성 시험

Assay(40ul)	0	4	6	12
환의크기(cm)	2.2	2.2	2.0	1.9

위의 결과로 미루어 볼때 최소 12시간이내에 90℃이내의 농축과정에서는 Nargenicin의 활성이 실효되지 않을 것이라고 예측할 수 있음.

## 2) 동결건조조건 확립에 관한 연구

*Nocardia* sp cs682를 배양하고 원심분리 후 얻은 배양액을 농축, 동결건조하여 분말제품으로 생산하고자 동결건조 조건을 달리하여 안정한 분말이 얻어지는 조건을 알아 보았음.

FD-1과 2는 30L 발효기에서 배양 후 얻은 배양액 15L 중 7.5L씩 나누어 동결건조 후 얻은 분말이며, FD-3는 500L 발효기(2기)에서 배양 후 얻은 배양액 660L를 농축, 동결건조 후 얻은 분말임.

각 동결건조 후 FD-1 , FD-2 , FD-3 분말은 냉장보관하며 사용하였음.

각 샘플의 동결건조 실험과정 및 결과는 아래와 같음.

FD-1은 -70℃에서 시료를 얼린 다음 진공을 걸기 시작하였음. 진공을 건 상태에서 20℃까지 72시간에 걸쳐 온도를 증가시켜 주었으며 그 후 약 24시간은 20℃를 유지한 후 동결건조를 완료함. 완료 후 제품의 색상 및 기본적인 물성을 관찰.

동결건조분말의 색은 연한갈색의 입도가 불균일한 분말이었으며 공기중에 30분간 방치시 빠르게 흡습하여 끈적해짐을 알 수 있었음. 동결건조 후 흡습문제를 해결키 위해 후 활성에 영향을 주지않는 범위에서 부형제를 후 혼합을 하였으며 부형제로 쓰는 corn starch를 사용하였으며 동결건조분말 중량의 2%를 혼합하였음. 후 혼합 후에도 동결건조분말은 끈적해지는 현상은 줄어들었으나 하루정도 방치 시 단단하게 붙어버리는 현상이 관찰되었음.

FD-2는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 시료를 얼린 다음 진공을 걸기 시작하였음. 진공을 건 상태에서  $30^{\circ}\text{C}$ 까지 48시간에 걸쳐 온도를 증가시켜 주었으며 그 후 약 24시간은  $30^{\circ}\text{C}$ 를 유지한 후 동결건조를 완료하였음. 완료 후 제품의 색상 및 기본적인 물성을 관찰하였음. FD-2의 색은 갈색을 나타냄. 공기 중에 약 30분간 방치 시 흡습하였으며 피부에 닿는 경우 끈적해짐을 알 수 있었음. FD-2의 경우도 동일하게 활성에 영향을 주지 않는 범위에서 부형제를 후 혼합을 하였으며 부형제로써는 corn starch를 사용하였으며 동결건조분말 중량의 2%를 혼합하였음. 후 혼합 후에도 동결건조분말은 끈적해지는 현상은 줄어들었으나 하루정도 방치 시 단단하게 붙어버리는 현상이 관찰되었음.

FD-3는 2% 수준으로 corn starch를 첨가한 후 균일하게 혼합하고,  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 시료를 얼린 다음 진공을 걸기 시작하였음. 진공을 건 상태에서  $40^{\circ}\text{C}$ 까지 24시간에 걸쳐 온도를 증가시켜 주었으며 그 후 약 24시간은  $40^{\circ}\text{C}$ 를 유지한 후 동결건조를 완료하였음. 완료 후 제품의 색상 및 기본적인 물성을 관찰하였음. FD-3의 색은 연한 갈색을 나타냄. 공기 중에 약 30분간 방치 시 FD-1, 2와 같은 흡습은 보이지 않았음. 피부에 닿는 경우 약간끈적해짐을 알 수 있었음. 결과적으로 FD-1,2에 비해 흡습하는 성질이 감소함으로 분말의 안정성이 개선되었다고 판단됨. FD-3에 추가로 흡습 및 분말의 외관, 유동성, 함량을 고려하여 부형제를 후 혼합을 하였으며 부형제로써는 corn starch를 사용하였으며 동결건조제품의 함량을 고려하여 적절히 혼합함. 후 혼합 후 동결건조분말이 흡습하는 현상이나 성상의 변화는 없었으며 함량 변화도 없었음.

동결건조분말 FD-1, FD-2, FD-3는 추후 색상, 함량등의 조사를 위해 실온, 차광, 밀폐용기하에서 보관하며 일정기간 간격으로 관찰하였음.(안정성 시험)

동결건조조건 및 조건에 따른 제품의 성상은 아래와 같음. (그림 6, 그림 7)

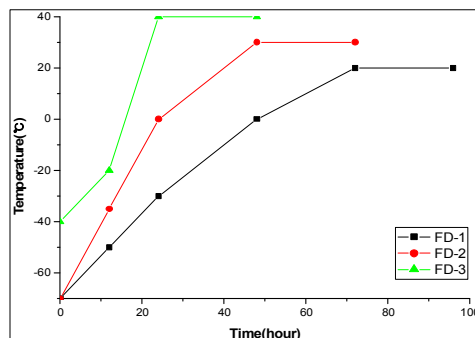


Fig. 6. FD-1, 2, 3의 동결건조 프로파일



Fig. 7. 동결건조 후 얻은 FD-1,2,3의 제품성상

### 3) 입도분석

동결건조 후 얻은 분말 FD-1,2 및 3는 동결건조 직후 입자가 불균일한 형태를 띠고 있으므로 가축사료첨가제에 첨가 시 불균일한 함량분포를 보일 수 있음. 함량균일성을 얻기 위해 동결건조 분말을 일정량을 취하여 40 메쉬체를 이용하여 체질을 하여 통과한 입자들의 입도분포를 관찰함. (표 5, 그림 8,9,10)

Table 5. 동결건조 후 얻은 cs682의 입도분포

Praticle size distribution (%)				
Mesh	단위( $\mu\text{m}$ )	FD-1	FD-2	FD-3
60이상	250이상	42.9	22.42	0
60-70	212-250	8.8	4.78	96
70-120	125-212	31.2	14.2	4
120이하	125이하	17	15.5	0

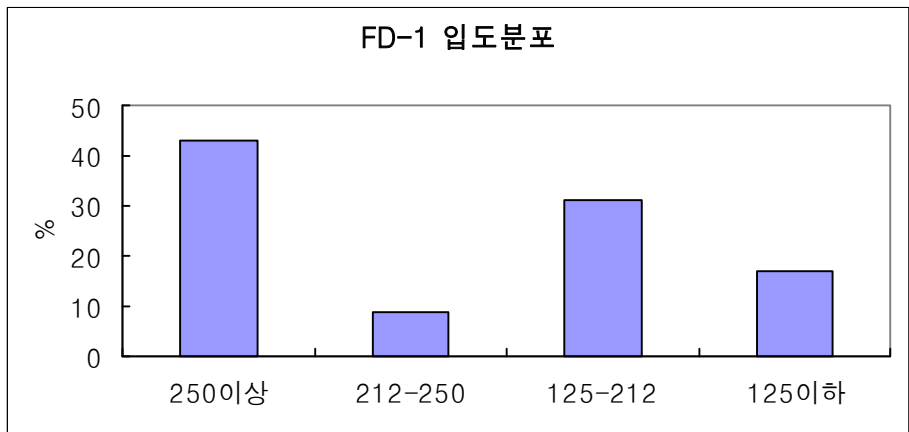


Fig. 8. CS682 FD-1의 입도분포

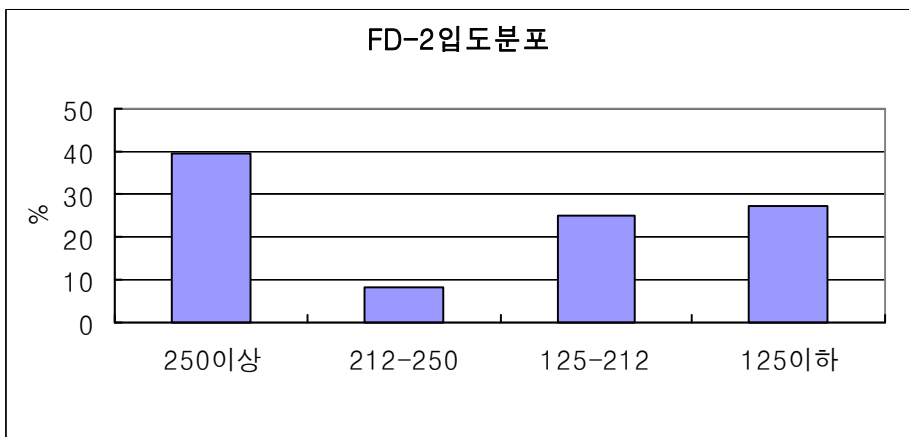


Fig. 9. CS682 FD-2의 입도분포

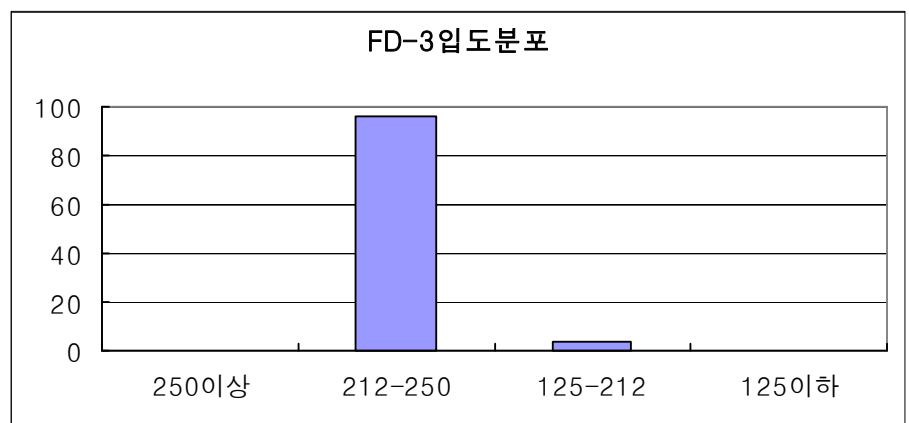


Fig. 10. CS682 FD-3의 입도분포



8. 안정성 시험

동결건조분말 FD-1, FD-2, FD-3는 3개월 단위로 실험실 내에서 안정성 시험을 수행하였음. 보관조건은 실온, 차광, 밀폐용기에서 수행하였으며 성상, 물성, 함량(bioassay)를 측정함.(표 6)

Table 6. CS682의 안정성 시험(실온, 차광)

제조번호	시험항목	기준	제조일	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	30개월
DCS682-FD1		실시에정일	2008-06-24	2008-09-24	2008-12-24	2009-03-24	2009-06-24	2009-12-24	2010-06-24	2010-12-24
		시험일		2008-09-22	2008-12-26	2009-03-25	2009-07-01	2009-12-18	2010-07-1	2010-12-26
	성상	연한황색 또는 황갈색의 가루	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	Bioassay	저지환으로써 1.8cm 이상	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
DCS682-FD2		실시에정일	2008-08-06	2008-11-06	2009-02-06	2009-05-06	2009-08-06	2010-02-06	2010-08-06	2011-02-06
		시험일		2008-11-03	2009-01-29	2009-05-04	2009-08-03	2010-02-10	2010-08-9	2011-02-11
	성상	연한황색 또는 황갈색의 가루	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	Bioassay	저지환으로써 1.8cm 이상	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.85	1.8
DCS682-FD3		실시에정일	2008-09-27	2008-12-27	2009-03-27	2009-06-27	2009-09-27	2010-03-27	2010-09-27	2010-03-27
		시험일		2008-12-26	2009-03-25	2009-07-01	2009-10-03	2010-03-25	2010-10-03	예정
	성상	연한황색 또는 황갈색의 가루	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	
	Bioassay	저지환으로써 1.8cm 이상	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.9	1.8	
DCS682-FD4		실시에정일	2008-10-27	2009-01-27	2009-04-27	2009-07-27	2009-10-27	2010-04-27	2010-10-27	2011-04-27
		시험일		2009-01-29	2009-05-04	2009-08-03	2009-11-10	2010-05-01	2010-10-29	예정
	성상	연한황색 또는 황갈색의 가루	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	
	Bioassay	저지환으로써 1.8cm 이상	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.9	1.9	
DCS682-FD5		실시에정일	2008-12-29	2009-03-29	2009-06-29	2009-09-29	2009-12-29	2010-06-29	2010-12-29	
		시험일		2009-03-31	2009-07-01	2009-10-03	2009-12-18	2010-07-02	2011-01-03	2011-07-03
	성상	연한황색 또는 황갈색의 가루	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	예정
	Bioassay	저지환으로써 1.8cm 이상	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	

본 연구팀이 생산한 DCS682 샘플 Lot FD1, FD2, FD3, FD4, FD5는 제품유효기간을 설정하기 위해 안정성 시험을 수행함. 시험조건은 실온/차광조건에서 수행. 제품안정성을 위해 2년간 제품역가를 모니터링하고 있음. 18개월동안 본 제품이 역가가 떨어지지 않았으며 24개월까지도 안정할 것으로 생각됨. 본 데이터를 바탕으로 DCS682의 유효기간은 최소 2년으로 설정 가능할 것으로 생각됨.

## 9. CS682배양액에서 Nargenicin 분리정제과정

### 1) lab scale에서 nargenicin의 정제

CS682 배양을 7L 발효조에서 수행. 배양 조건은 아래와 같음.

Strain: *Nocardia* sp. CS682

Media: Maltose 0.5%

Oatmeal 0.25%

Soybean meal 0.25%

Yeast ex 0.25%

Calcium carbonate 0.05%/ 5L

antifoam 0.3% (sigma co)

Condition: 28°C, 0.5vvm, 180rpm

위의 조건으로 얻은 배양액은 원심분리기를 사용하여 균사체와 배양여액으로 분리. 배양여액은 약 4L였으며 에틸아세테이트를 사용하여 활성물질분획 추출함. 추출한 분획은 약 3ml(321.3mg)로 농축하여 sephadex LH20 column chromatography(1.6cm X 110cm, methanol, flowrate: 9ml/hr)를 수행. 활성분획을 회수하여 최소한으로 농축(177.5mg)하고 다시 silicagel column chromatography(1 X 12cm)를 수행. silicagel은 hexane 5 bed, hexane: ethylacetate=2.5:1 16bed 용출시 nargenicin이 분리되기 시작함. silica gel 컬럼 후 얻은 활성분획을 모아 농축하고 hexane, ethylacetate를 이용하여 재결정하였으며 흰색의 파우더(88mg)를 얻음. nargenicin분리정제 과정의 요약은 아래와 같음. (그림11, 12)

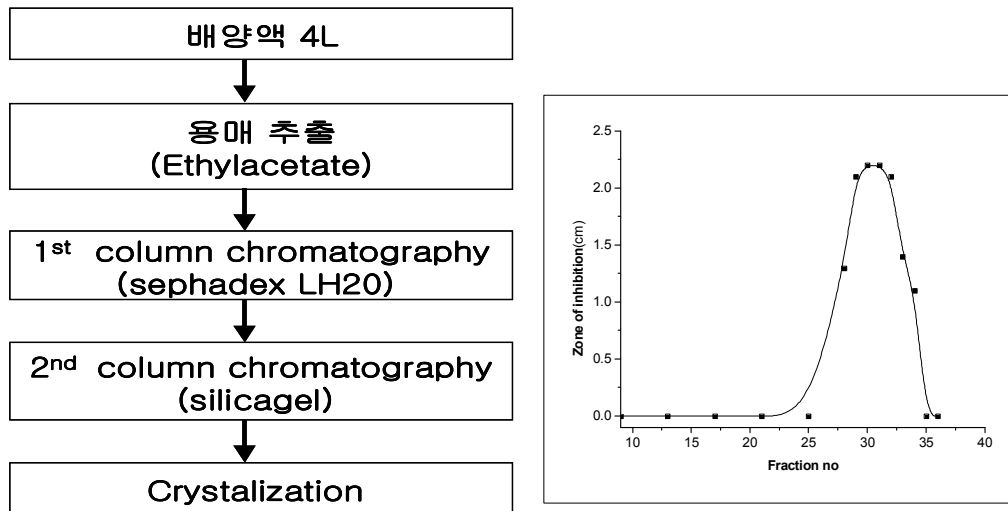


Fig. 11. Sephadex LH-20 column chromatography에서 nargenicin 분리정제

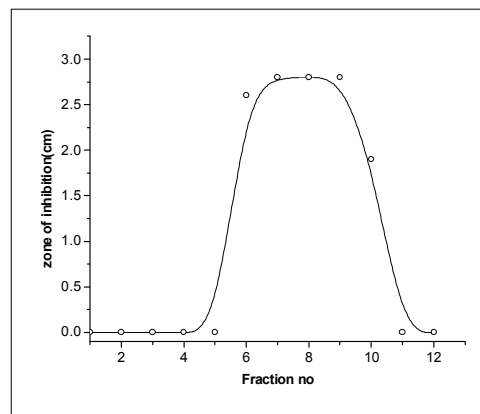


Fig. 12. Silicagel column chromatography에서의 nargenicin분리정제

2) 대형 발효조에서의 배양 및 배양액을 이용한 nargenicin의 정제

CS682 배양을 500L 발효조에서 수행. 배양 조건은 아래와 같음.

Strain: *Nocardia* sp. CS682

Media: Maltose 0.5%

Oatmeal 0.25%

Soybean meal 0.25%

Yeast ex 0.25%

Calcium carbonate 0.05%/ 500L

Seedculture: 30L(50L fermenter)

Mainculture: 350L(500L fermenter)

Condition: 28°C, 0.5vvm, 150rpm

0.3% antifoam(dow chemical, 식품용)

50L 발효조의 배양액을 500L 발효조로 main culture를 수행 하였을 때 다량의 form 이 형성되었으며 form은 균사체를 발효조 벽면으로 밀어내는 문제가 발생함. 균사체의 소실을 막기 위해 간헐적으로 발효조 내 임펠라의 교반속도를 300rpm으로 올렸다 내림으로 물리적으로 균사체가 기벽을 타는 것을 억제하였음.

발효 후 얻은 배양액은 연속식원심분리기를 사용하여 균사체를 제거함. 균사체 제거 후 1톤 농축기에서 70°C, 진공감압하 배양액을 20L로 농축함. 농축한 배양액은 다시 동량의 ethylacetate를 첨가하여 2회 추출하였고 추출 후 용매는 최소량으로 농축함.

농축한 시료에 다량의 antifoam을 제거하기 위하여 대형원심분리기를 이용하여 6,000rpm 30분씩 원심분리를 수회 반복하여 antifoam층을 일부 제거하였음. antifoam이 혼입된 추출시료는 냉장 보관하여 분리정제조건실험에 사용.

ethylacetate 추출물은 sephadex LH20 column chromatography(전개용매: methanol)를 수행하여 활성분획을 모음. 활성분획은 다시 최소량으로 농축 후 silicagel column chromatography(전개용매 : hexane, hexane : ethylacetate = 2.5 : 1, hexane : ethylacetate=2:1)를 수행하였음.

### 3) pilot scale(3톤) 발효후 얻은 배양액을 이용한 nargenicin의 정제-2

목표: 대량배양후 얻은 배양액내에는 antifoam이 들어있어 nargenicin을 분리정제시 antifoam이 정제과정을 방해함. 정제과정내내 antifoam이 지속적으로 용출되어 물질의 순도를 떨어뜨림.

-antifoam 조성

대량배양시 사용하는 antifoam 제품은 다우코닝사에서 생산한 제품이였으며 제품 조성은 아래와 같다.

SiO<sub>2</sub> 30%

Tween 65

솔비톨지방산에스테르

Carboxymethyl cellulose-Na

DW 적량.

위의 조성에서 알 수 있듯이 antifoam내에 계면활성제이면서 난용성물질의 가용화제인 tween 65 및 솔비톨 지방산에스테르가 포함되 있어 CS682의 nargenicin을 가용화시켜 정제의 어려움을 줄 것으로 생각됨.

Sephdex LH20, silicagel column 수행 시 antifoam은 elution시 지속적으로 용출되어 거의 모든 분획에서 나오는 것을 확인하였으며 이를 제거하기 위해 흡착레진을 이용하여 컬럼 크로마토그래피 수행 전 물질 부분정제를 시도함. 레진 중 Non-ionic polymer인 XAD-16을 사용하여 antifoam의 제거여부를 알아보았음.

정제조건

-XAD-16의 capacity  $800\text{m}^2\text{g}^{-1}$  이며 이것을 증류수로 안정화시킨 후 실험에 사용.

-column volume : 6 ml

-Sample load : 600ul(200 mg) dissolve in MeOH (5톤 발효후 얻은 발효액의 ethylacetate 추출물을 먼저 sephadex LH20을 수행하여 활성분획을 농축하여 연구에 사용함.)

-물, 30%, 40%, 50%, 100%메탄올 순으로 물질을 용출시킴. Bioassay후 확인한 활성분획은 먼저 메탄올을 제거한 다음 남은 물층을 ethylacetate를 이용하여 2회 추출하고 농축하여 결정화.



Fig. 13. TLC spotting for loaded sample

Table 7. Elution profile

Eluent	소모한용매 volume(ml)	weight(mg) (수율%)	결정상태
water	78	8.8 (4.4)	흰물질/점도높음
30%MeOH	230	미량	점성물질
40%MeOH	1165	30.9 (15.45)	Pale yellow Oil 상물질
50%MeOH	1010	45 (22.5)	흰색가루
100%MeOH	285	48 (24)	Pale green 가루

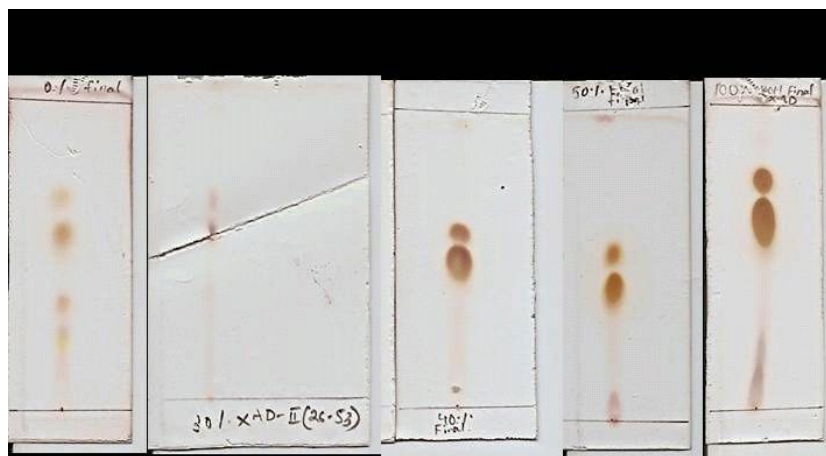


Fig. 14. TLC spot for final products

Water, 30%, 40%, 50%, 100% MeOH

초기시료 200mg를 loading하여 XAD흡착제를 컬럼화하여 실험한 결과 water 분획에서 점성이 높은 흰물질 8.8mg, 40% 메탄올분획에서 노란색 점성물질분획 30.9mg, 50% 메탄올분획에서 흰색가루45mg, 100%메탄올분획에서 아주연한녹색가루 48mg을 얻음.(표 7)

Fig.14에서 보듯이 TLC상에서 샘플모두 nargenicin spot 부근에 불순물을 함유하고 있었음. 50, 100%메탄올 분획에서는 점성물질(antifoam)이 거의 없어 불순물이 있지만 결정화가 가능하였음. 그러나 물 및 40% 메탄올 분획은 점성 물질이 많아 높은 점도를 보이며 결정화에 어려움이 있음.

결과적으로 XAD-16 resin을 이용한 위의 조건에서는 antifoam을 효율적으로 제거할 수가 없었으며 불순물 또한 제거 할 수 없었음.(그림 13, 14)

#### 4) pilot scale(3톤) 발효후 얻은 배양액을 이용한 nargenicin의 정제-3

이전실험에서 레진사용방식을 조금 변형하여 불순물의 제거를 시도함. XAD-16 resin을 컬럼 형식이 아닌 교반방식으로 하여 물질정제를 시도함.

#### 정제조건

-XAD load volume: 2ml

-Sample load volume: 500ul(50mg) (5톤 발효후 얻은 발효액의 ethylacetate 추출물을 먼저 sephadex LH20을 수행하여 활성분획을 농축하여 연구에 사용.)

물로 안정화시킨 XAD-16 2ml에 시료를 흡착시키고 안정화한 다음 물을 약 50ml 투입하여 30분 교반함. (반복하여 4회) 교반 후 상층액은 여과 후 TLC 및 bioassay를 수행. 순차적으로 20%, 50%, 100%을 넣어 교반하며 순차적으로 물질을 용출시켜 TLC 및bioassay로 활성을 확인하였음.

Table 8. Elution profile

Eluent	소모한용매 volume(ml)	weight(mg) (수율%)	결정상태
water	200ml		
20%MeOH	500ml		
50%MeOH	360ml	20mg (40)	Pale yellow 가루
100%MeOH	170ml	17.9mg (35.8)	Oil phase

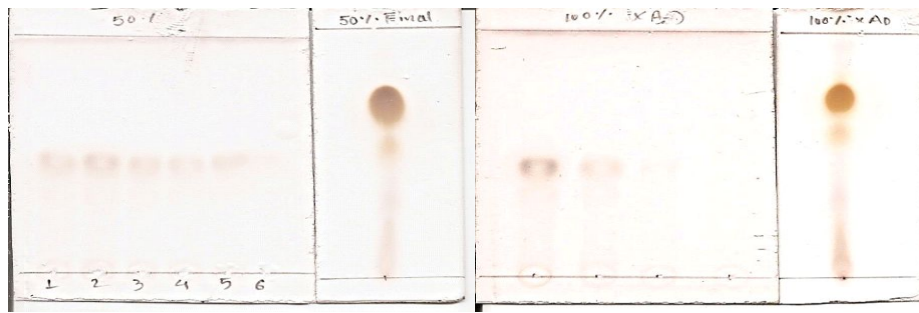


Fig. 15. TLC spotting after XAD

초기시료 50mg를 loading하여 XAD를 교반하며 nargenicin을 용출시킨 결과 50% 메탄올 분획에서 20mg의 연한노랑가루를 100메탄올 분획에서 17.9mg의 oil phase를 얻었음.

Fig 15.에서 보이는 것과 같이 TLC상에서 샘플모두 nargenicin spot 부근에 불순물을 함유하고 있었음.

50% 메탄올 및 100% 메탄올분획 모두 같은 TLC상 패턴을 지니고 있었음. 그러나 50%메탄올 분획은 결정화가 가능하였으며 antifoam성분이 결정화시 일부 정제가 가능하여 연한노랑의 결정으로 만들 수 있었으나 100%메탄올 분획의 경우 진한 oil phase를 보여 결정화를 할 수가 없었음.

또한, XAD-16을 컬럼화하여 사용한 경우 nargenicin main spot 위에 불순물이 보이는 것과 달리 nargenicin spot아래쪽으로 불순물이 끌리는 현상을 두 분획 모두



관찰 할 수 있었음.

결론적으로 XAD-16 resin을 교반방식으로 하여 물질을 정제하는 경우에도 정제도 및 antifoam 제거효율은 완벽히 개선되지 않았음.

#### 10. 5톤 발효조 배양

배양에 사용된 균주, 배지 및 배양조건은 아래와 같음.

Strain: *Nocardia* sp. CS682

Media: Maltose 0.5%

Oatmeal 0.25%

Soybean meal 0.25%

Yeast ex 0.25%

Calcium carbonate 0.05% / 5000L

Condition: 28°C, 0.5vvm, 75rpm

배양에 접종한 seed는 50L 발효기에서 30L의 발효액을 96시간 배양 후 500L 발효기로 접종하였으며 접종 후 온도, 용존산소량, 산소공급 및 교반속도를 유지하며 배양하였음. 약 3일 배양 후 발효액을 5톤 발효조로 이동시키고 5톤 발효조에서 배양 기간동안 24시간에 1-2회 배양액을 채취하여 생산된 Nargenicin의 항 MRSA 활성을 측정하고 작동조건 및 pH변화를 모니터링하였음.

Table 9. 5톤 발효조에서의 *Norcadia* sp. cs682 발효 모니터링 결과

시간	p H-1	p H-2	Activity-1	Activity-2	TEMP	PRESSURE	RPM
0	7.11	8.02	0.80	0.80	27.8	0.50	50
12	7.92	8.94	0.80	0.80	27.9	0.50	50
24	8.18	9.36	1.10	1.20	28.4	0.50	50
36	8.48	9.48	1.20	1.40	28.4	0.50	50
48	7.8	9.60	1.10	1.60	28.4	0.50	50
60	7.4	9.70	1.10	1.60	28.4	0.50	50
72	7	9.74	1.00	1.60	28.4	0.50	50

## 11. 소형발효조에서 foam생성감소에 관한 연구

CS682를 대형발효소에서 발효공정 시 문제점중 하나는 과도한 foam(거품)형성임. foam은 Actinomyces의 발효공정에서 자주 볼 수 있는데 과도하게 생성되는 foam은 물리적으로 대형 발효조 내에서 균사체를 배양액 밖으로 밀어내는데 이는 원료물질 생산효율을 떨어뜨림.

본 연구진은 대형 발효조에서 생산효율을 높이기 위해 foam형성이 적고 생산량이 감소하지 않는 배지조건을 검토하였음. 발효조는 7L 발효조를 사용하였으며 기본 배지는 CS682배양배지를 기본으로 하였음.

Strain: *Nocardia* sp. CS682

Media 1: Maltose 0.5%

Oatmeal 0.15%

Soybean meal 0.15%

Yeast ex 0.15%

Calcium carbonate 0.05%/ 5L

Media 2: Mannitol 0.5%

Oatmeal 0.15%

Soybean meal 0.3%

Yeast ex 0.15%

Calcium carbonate 0.05%/ 5L

Media 3: Maltose 0.1%

Mannitol 0.5%

Oatmeal 0.2%

Soybean meal 0.1%

Yeast ex 0.2%

Media 4:

Mannitol 1.0%

Oatmeal 0.2%  
 Soybean meal 0.1%  
 Yeast ex 0.2%

Condition: 28°C, 0.5vvm, 180rpm  
 0.01% antifoam(Sigma co.)

위의 4가지 조건으로 7L 발효조에서 수행하였으며 pH, foam형성유무, 활성의 변화를 관찰함. (표 10)

Tabel 10. 배지에 따른 pH, foam형성유무, 활성 변화

Time (hour)	Media 1		Media 2		Media 3		Media 4	
	pH	Activity (cm/40µl)	pH	Activity (cm/40µl)	pH	Activity (cm/40µl)	pH	Activity (cm/40µl)
0	7.5	0.8	7.5	0.8	7.5	0.8	7.5	0.8
24	7.93	0.8	7.93	0.8	7.74	0.8	7.57	0.8
48	8.08	1.2	8.03	1.0	8.13	0.8	8.0	0.8
72	8.38	1.5	8.37	1.2	8.33	1.4	8.05	10.
96	8.63	1.5	8.66	1.6	8.42	1.5	8.31	10.
120	8.64	1.7	8.7	1.7	8.52	1.6	8.28	1.1
144	8.64	1.9	8.66	1.8	8.49	1.8	8.31	1.2
168	8.55	1.8	8.66	2.2	8.54	1.9	8.29	1.4

위의 결과에서 soy bean meal은 CS682발효물의 생산에 영향을 주는 중요한 질소원인 것을 알 수 있으며 soy의 투입량이 약 2배 증가 시 CS682의 생산량도 약 2배 증가함을 알 수 있음. 그러나 soy의 투입량이 증가하면 동시에 foam의 양도 급격히 증가하게 되어 상당량의 균사체를 상부로 밀어내는 양상을 보이는데 이로 미루어 5톤 이상의 대형 발효조에서의 soy bean meal을 질소원으로 다량 사용하는 것은 바람직 하지 않을 것으로 생각됨. (그림 16)



Fig. 16. CS682생산양상(Media 1 및 2)

표 10에서 탄소원으로써 maltose의 영향을 살펴보았음. 탄소원으로 0.1%의 maltose의 경우 mannitol 0.5%의 투입보다 CS682의 생산량을 더욱 증가시킴을 알 수 있었으며 이는 media1과 활성이 같음을 알 수 있었음. 추후 연구는 foam형성의 원인인 soy bean meal을 대체 할 수 있는 질소원의 탐색을 7L 발효조 수준에서 시행할 계획임.

#### 결과

500L 발효시 문제점은 foam의 형성이었는데 foam이 다량으로 형성이 되면 foam자체가 균사체를 물리적으로 배양액 밖으로 밀어내어 발효기의 벽면에 쌓이게 됨. 균사체의 소실은 목적물질의 생산량감소로 나타나기 때문에 foam제거는 중요하다고 볼 수 있음. 500L규모의 발효조에서는 임펠라의 교반 속도를 조절하여 물리적으로 기벽에 붙은 균사체를 떼어낼 수 있으나, 5000L이상의 규모를 가진 발효기의 교반기의 특징을 감안한다면 물리적인 방법은 한계를 가질 수 있음. 3차년도 에서는 5000L규모의 발효조에서 foam을 효과적으로 억제하고 발효 시 균사체의 소실을 막을 수 있는 배양조건을 확립.

500L발효기에서 얻은 배양액 농축물은 antifoam을 다량 포함하고 있었으며 antifoam은 농축액의 점도를 높여 분리정제의 효율을 떨어뜨림. antifoam은 ethylacetate 추출 시 ethylacetate층으로 상당량 이행하였으며 sephadex LH20 column chromatography에서도 지속적으로 elution되어 분리되지 않았음. sephadex LH20후 얻은 활성분획은 다시 농축 후 6000rpm에서 원심 분리하여 antifoam을 일부 제거하고 농축액은 다시 silicagel column chromatography를 수행함. silicagel 후 nargenicin 및 다른 물질들이 용출되는데 lab scale에서 얻은 배양액으로 분리정제조건으로 동일하게 실험 시 용출되는 물질의 종류가 더 많고 얻어진 활성분획은 제거되지 않은 antifoam으로 인해 점도가 높아 정제의 어려움이 있음. 3차 년도는

CS682대량 발효 시 생기는 foam을 제거할 수 있는 조건을 설정하여 antifoam의 사용량을 줄여 배양할 수 있는 방법을 찾아야 하는 동시에 nargenicin 분리정제 시 antifoam을 효과적으로 제거할 수 있는 정제공정을 개발.

## 12. 대량생산용 최적배지의 적합성 평가

### 1) 비교예 1: 7L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682 균주의 배양 및 발효

*Nocardia sp.* CS682 균주(KCTC 11297BP, 2008.03.06자로 한국생명공학연구원에 기탁함)를 증류수 1L 당 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가 함유된 고체 배지에 도말하여 28℃에서 3일간 배양함. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 액체 배양 배지에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 진탕 배양함. 액체 배양 배지는 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g을 1L증류수에 녹여 조제함. 배양 배지 250mL을 1L 삼각 플라스크에 준비하여 멸균 후 5% 수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕 배양함. 7L 발효조에서 배양을 위해 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO<sub>3</sub> 0.5g이 되도록 조제하여 5L를 준비하였음. 종배양액 250mL을 준비된 발효조에 접종하고 28℃, 180rpm에서 1vvm의 통기량으로 7일 동안 pH는 조절하지 않고 배양하며 향균 활성 화합물의 생산량과 pH변화를 조사하고 그 결과를 표 11에 나타내었음. 배양 시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였음.

Table 11. 7L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682 균주의 배양 및 발효

배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40μl)	생산량 (mg/L)
0	6.7	0.8	0
24	7.93	0.8	0
48	8.08	1.2	2.24
72	8.38	1.5	5.08
96	8.63	1.5	5.08
120	8.64	1.7	8.06
144	8.65	1.9	12.13
168	8.55	1.9	12.13

위와 같이 7L 발효조에서 5L 규모로 최적 배지 조건에서 약 7일간 배양하며 pH 및 향균 활성 화합물의 생산량을 모니터한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8이 넘어가는 시점부터 향균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었음. pH는 8.6근처에서

유지되는데 pH의 변화가 없는 시점에서 화합물의 생산량도 뚜렷한 증가가 없음을 확인하였음. 이는 항균 활성 화합물의 생산량은 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양액의 pH와 밀접한 관련이 있음을 의미함.

2) 비교예 2: 50L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682 균주의 배양 및 발효

*Nocardia sp.* CS682 균주를 증류수 1L 당 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가 함유된 고체배지에 도말하여 28°C에서 3일간 배양함. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 배양 배지에 접종하여 28°C, 180rpm에서 3일간 진탕배양함. 배양배지는 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, CaCO<sub>3</sub> 0.5g을 1L증류수에 녹여 조제함. 배양배지 250mL을 1L 삼각 플라스크에 준비하여 멸균 후 5%수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕 배양함. 50L 발효조에서 배양을 위해 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO<sub>3</sub> 0.5g이 되도록 조제, 멸균하여 35L를 준비하였음. 종배양액 1.7L을 준비된 발효조에 접종하고 28°C, 180rpm에서 1vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하고 그 결과를 표 4에 나타냄. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였음. (표 12)

Table 12. 50L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682 균주의 배양 및 발효

배양시간(hr)	pH	저지환 (cm/40 $\mu$ l)	생산량 (mg/L)
1	7.53	0.8	0
12	7.93	0.8	0
24	8.32	0.8	0
36	8.69	1.0	1.14
48	8.73	1.3	3
60	8.85	1.5	5.08
72	8.9	1.7	8.06

위와 같이 50L 발효조에서 35L 규모로 최적 배지 조건에서 약 3일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.5가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었음. pH는 8.9에 도달할 때까지 항균 활성 화합물의 생산량이 지속적으로 증가하는 것으로 보아 항균 활성 화합물의 생산량은 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양액의 pH와 밀접한 관련이 있음을 의미함.

3) 실시예 3: 500L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양 및 발효

*Nocardia sp.* CS682균주를 증류수 1L 당 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가 함유된 고체배지에 도말하여 28°C에서 3일간 배양함. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 배양 배지에 접종하여 28°C, 180rpm에서 3일간 진탕 배양함. 배양배지는 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g을 증류수 1L에 녹여 조제함.

배양배지 250mL을 1L 삼각플라스크에 준비하여 멸균 후 5%수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕 배양함. 50L 발효조에서 배양을 위해 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO<sub>3</sub> 0.5g이 되도록 조제, 멸균하여 35L를 준비하였음. 종배양액 1.7L을 준비된 발효조에 접종하고 28°C, 180rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하였음. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였음.

500L 발효를 위해 500L 발효조에 350L의 배양액을 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO<sub>3</sub> 0.5g이 되도록 조제, 멸균하여 준비하였음. 50L 발효조에서 배양한 균체는 무균조작으로 15L를 옮김. 배양조건은 28°C, 150rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH를 조절하지 않고 배양하고 그 결과를 표 5에 나타냄. 배양시 발생하는 거품은 필요시 10배 희석한 소포제(다우코닝사,미국)를 소량 첨가하여 거품생성을 억제하였음.

Table 13. 500L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양 및 발효

배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40 $\mu$ l)	생산량 (mg/L)
1	7.04	0.8	0
12	7.49	0.8	0
24	8.34	0.8	0
36	8.74	1.5	5.08
48	8.76	1.8	9.94
60	8.86	1.9	12.13
72	8.98	2.1	17.53
84	9.02	2.3	24.49
96	9.05	2.5	33.28

위와 같이 500L 발효조에서 350L 규모로 최적 배지 조건에서 약 4일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터링한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.5가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었음. pH는 9.05

에 도달할 때까지 항균 활성 화합물의 생산량이 지속적으로 증가하는 것으로 보아 항균 활성 화합물의 생산량은 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양액의 pH와 밀접한 관련이 있음을 의미함. 실시 예 1 및 2, 3에서 보는 바와 같이 *Nocardia sp.* CS682균주는 본 발명에서 사용된 최적 발효 배지를 이용하여 5, 50, 500L 규모의 발효조에서 발효 시 항균 활성 화합물은 배양액의 pH가 약 8.0 내지 8.5가 되는 시점에서 유의성 있게 생산됨을 알 수 있었음. 이 결과로 볼 때 *Nocardia sp.* CS682 균주 발효 시 발효액의 pH는 항균 활성 화합물 및 면역증강물질 생산양상을 예측할 수 있는 중요한 인자로 볼 수 있으며, 반복적으로 발효물을 생산 시 생산량 및 품질관리의 지표로 정할 수 있음. 또한 위의 결과는 본 발명자들이 결정한 최적 발효 배지가 500L 발효조까지 대량 배양시 유의성 있는 배양 및 항생 화합물 생산을 할 수 있어 5ton 규모의 발효조에서도 기존과 동일한 발효패턴을 예측할 수 있음.

4) 비교예 1: 5L, 50L, 500L 발효조에서 에머슨 배지를 이용한 *Nocardia sp.* CS682균주의 발효

- 5L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양 및 발효

*Nocardia sp.* CS682균주를 증류수 1L 당 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두유 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가 함유된 고체 배지에 도말하여 28°C에서 3일간 배양함. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 에머슨 배지에 접종하여 28°C, 180rpm에서 3일간 진탕배양함. 에머슨배지는 Beef extract 4g, 효모 엑스 1g, 펩톤 4g, 글루코오스 10g, NaCl 2.5g 증류수 1L에 녹여 조제하였음.

에머슨 배지 250mL을 1L 삼각 플라스크에 준비하여 멸균 후 5%수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕배양 하였음.

7L 발효조에서 배양을 위해 에머슨 배지 5L를 준비하였음. 종배양액 250mL을 준비된 발효조에 접종하고 28°C, 180rpm에서 1vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하며 항균 활성 화합물의 생산량과 pH와의 관계를 관찰하였음. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였음.

50L 발효조에서 배양을 위해 에머슨 배지를 35L를 준비하였음. 종배양액 1.7L을 준비된 발효조에 접종하고 28°C, 180rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하였음. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하며 항균 활성 화합물의 생산량과 pH를 관찰하여 그 결과를 표 14에 나타냄.

Table 14. 50L 발효조에서 에머슨 배지를 이용한 *Nocardia sp.* CS682 균주의 발효



배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40 $\mu$ l)	생산량 (mg/L)
1	6.9	0.8	0
24	8.2	1.1	1.62
48	8.2	1.5	5.08
72	8.75	1.8	9.94
96	8.9	2.2	20.8

위와 같이 50L 발효조에서 35L 규모로 에머슨 배지에서 약 4일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.2가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었음. pH는 8.9에 도달할 때까지 항균 활성 화합물의 생산량이 지속적으로 증가하는 것으로 보아 항균 활성 화합물은 pH가 관련이 있음을 알 수 있음.

500L 발효를 위해 500L 발효조에 350L의 에머슨 배양액을 조제, 멸균하여 준비. 50L 발효조에서 에머슨 배지로 28 $^{\circ}$ C, 180rpm, 0.5vvm으로 배양한 균체는 무균조작으로 15L를 500L 발효조로 옮김. 500L 발효조에서 배양조건은 28 $^{\circ}$ C, 150rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH를 조절하지 않고 배양하며 항균 활성 화합물의 생산량과 pH변화를 모니터하고 그 결과를 표 15에 나타냄. 배양시 발생하는 거품은 필요시 10배 희석한 소포제(시그마사, 미국)를 소량 첨가하여 거품생성을 억제하였음.

Table 15. 500L 발효조에서 에머슨 배지를 이용한 *Nocardia sp.* CS682 균주의 발효

배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40 $\mu$ l)	생산량 (mg/L)
1	6.6	0.8	0
24	7.98	0.8	0
48	8.12	1.2	2.24
72	8.3	1.5	5.08
96	7.88	1.7	8.06
120	8.37	1.8	9.94
144	8.52	1.8	9.94
168	8.62	2	14.65

위와 같이 500L 발효조에서 350L 규모로 에머슨 배지에서 약 7일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.12가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었음. 그러나 에머슨배지의 경우 pH는 8.6을 유지하며 항균 활성 화합물의 생산량도 증가하지 않음을 알 수 있음. 에머슨 배지로 500L 규모확대(scale up)시 50L수준의 발효 패턴의 양상

은 보이지 않으며 항균 활성 화합물의 생산량이 최적배지로 발효할 때에 비해 약 절반수준을 보임. 이는 에머슨 배지가 *Nocardia sp.* CS682의 발효시 pH와 항균 활성 화합물의 생산이 밀접함을 보여주지만 발효시간, 생산효율을 고려시 규모 확대를 위한 에머슨 배지의 선택은 적절하지 않음을 알 수 있음.

## 5) 결 론

5-1) 50L 발효조 배양 / 500L 발효조 배양 / 5톤 발효조 배양 / 대량배양시 고효율 생산에 관한 연구

50, 500L 및 5톤 발효조를 이용하여 대량생산을 수행함. 발효 후 얻은 발효액은 균 사체 분리, 농축, 동결건조를 통해 제품으로 생산하는데 사용함.

50, 500L, 5톤 발효시 발효과정중 공통적인 문제는 아래와 같았으며 본 연구진은 이를 거의 해결하여 5톤 규모의 발효조까지 안정적으로 발효, 제품생산조건을 확립 하였음.

- 실험실내의 발효조의 최대 배양은 약 5L에서 이루어지는데 50L, 500L, 5톤 규모로 약 10배 내지는 1000배 이상 규모가 증가하게 되는 경우 1) 배지준비시 멸균문제, 2) 배양시 배양액에서 form의 형성, 3) form형성에 따른 antifoam사용여부 등의 고려해야하는 사항이 발생함.

아래 그림은 5톤 발효 시 다른 미생물에 오염이 일어난 경우와 발효가 성공적으로 진행된 경우 모니터링 결과를 비교한 표 16 및 그림 17임.

Table 16. 미생물 오염 유무에 따른 cs682배양 모니터링

시간	p H-1	p H-2	Activity-1	Activity-2	TEMP	PRESSURE	RPM
0	7.11	8.02	0.80	0.80	27.8	0.50	50
12	7.92	8.94	0.80	0.80	27.9	0.50	50
24	8.18	9.36	1.10	1.20	28.4	0.50	50
36	8.48	9.48	1.20	1.40	28.4	0.50	50
48	7.8	9.60	1.10	1.60	28.4	0.50	50
60	7.4	9.70	1.10	1.60	28.4	0.50	50
72	7	9.74	1.00	1.60	28.4	0.50	50

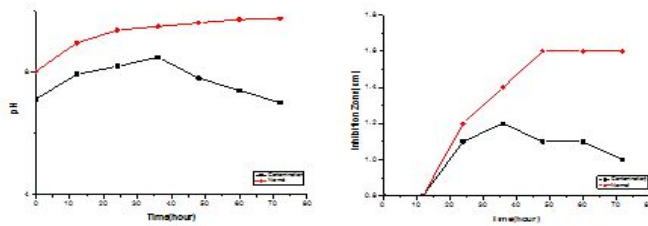


Fig. 17. 미생물 오염 유무에 따른 cs682배양 모니터링

표에서 1번은 발효조가 오염이 됐을 경우 pH, 활성변화를 2번은 정상 발효 시 pH, 활성변화를 보여줌. 대량생산 시 오염이 되면 나르제니신의 생산능력이 저해되는 동시에 타 미생물의 발효로 pH가 역으로 저하되는 경향을 볼 수 있으며 정상발효가 진행되면 점차적으로 pH가 약염기성에 도달하게 되며 나르제니신의 생산도 pH 변화와 동일하게 증가함을 알 수 있음. 오염 발효조에서는 바실러스균이 검출되었는데 바실러스균은 발효시 pH가 시간에 따라 감소함을 보이는데 본 예시에서도 바실러스에 오염되었음을 모니터링데이터에서 확인이 가능함.

배지내용물 중 oatmeal과 soy bean meal의 경우 bacillus sp.의 내생포자를 많이 함유하여 배지 준비 후 bacillus 오염문제를 종종 일으킴. 특히 발효조 규모가 증가할수록 bacillus오염문제는 더욱 심각해짐을 알 수 있었으며 본 연구진은 bacillus sp. 오염을 방지하기 위해 공멸균, 및 부분멸균을 통해 오염문제를 해결하였음.

또한 oatmeal과 soy bean meal은 영양원으로써 cs682의 배양에 필수요소인 동시에 대량 배양 시 form을 일으키는 주 원인이 되었음. form은 이차적으로 물리적으로 균체를 배양액 밖으로 밀어내어 균체를 배양기의 벽면에 지속적으로 붙게하여 결과적으로 활성물질의 생산량을 저해함. 50L, 500L 배양기내의 문제해결 방안으로 1) antifoam을 첨가하거나 2) 발효조의 임펠라의 rpm을 조절하여 물리적으로 제거할 수 있었음. 5톤 발효조에서 scale up을 수행 시 기존결과와 같이 거품이 형성되었으나 5톤 발효조에서의 물리적 배양조건은 통기 0.5vvm, 75rpm으로 500L이하 발효조건보다 완화된 조건으로 거품형성량은 적었으며 배양 중간중간 생기는 거품은 antifoam을 적절히 공급하여 해결하였음. 만약 50톤 이상의 발효조에서는 antifoam 공급과 물리적 제거도 한계를 가질 수 있지만 현재로써 5톤 발효 후 얻은 발효액으로 충분량의 제품을 생산할 수 있어 50톤 발효연구는 고려하지 않음. 그러나 지표물질 정제 연구시 antifoam은 분리정제의 방해요인이므로 다음 연도 연구 수행시

물질대량분리정제를 위해 500L수준에서배양연구를 추가 수행해야 할 것으로 생각 됨.

## 5-2) 대량생산용 최적배지의 적합성 평가

미생물 발효를 통해 scale up시 고려사항은 최적배지가 어느 정도 규모의 발효조까지 적용할 수 있는지임. 연구실 수준에서 최적 배양이라 함은 최대 7L수준정도가 적당하다고 볼 수 있지만 산업화를 위한 규모는 최소 100배 규모이상이므로 연구용 최적배지의 의미와는 다름.

본 연구를 통해 본연구진이 설정한 최적배지가 제품생산 규모에 적합한지를 판단하기 위해 비교배양배지로서 에머슨 배지를 사용하였음. 에머슨 배지는 실험실 규모 (7L이내)에서 노르카디아 속 균주의 생산성을 최대로 보여준 대표배지로서 이 배지와 DCS682 최적배지를 500L 혹은 5톤 까지 단계적으로 배양하며 생산성 및 pH등을 모니터링 하였음. 본 연구에 사용된 최적배지는 500L 및 5톤 수준까지 일정한 패턴을 보여주며 나르제니신의 생산성을 보여준 반면 에머슨 배지의 경우 50L배양까지는 나르제니신 생산능이 양호하나 500L부터 생산이 저하됨을 보여주었음. 이는 최적배지가 scale up에 적합한 배지라는 것을 보여줌.

## 13. CS682 제품의 기준 및 시험방법

발효제품인 CS682을 균일하게 생산하기 위해 기본적인 제품 평가 기준과 지표성분인 Nargenicin의 분석방법을 설정함.

### 1) 함량분석

본 연구실에서 발견한 균주인 *Nocardia* sp. CS682가 생산하는 항-MRSA작용 및 면역증강물질을 포함하는 균주 배양액을 동결건조한 제품의 품질관리 기준을 설정하기 위하여 *Nocardia* sp. CS682의 균주 배양액에 존재하는 nargenicin을 지표성분으로 선정하고 *Nocardia* sp. CS682 균주로부터 분리 정제하여, 그 구조를 확인함. 또한 *Nocardia* sp. CS682 균주에서 nargenicin의 함량 정량방법을 paper disc, HPLC법으로 확립하였으며, 이를 통하여 국내에서 판매할 수 있는 균주 배양액 동

결 건조품의 함량 기준을 설정하고자함.

① HPLC분석

Nargenicin은 HPLC로 분석하였으며 분석조건은 다음과 같음.

Column : Lichrospher 100 RP-18( 4 X 100mm, 5  $\mu$ m, Merck, USA),

Mobile phase: Phosphate buffer(pH 2.4): MeOH= 7:3

Detector:UV 254 nm,

Flow rate :1.0ml/min.

적량곡선의 작성 -정제한 nargenicin 1.0mg을 정밀히 달아 Phosphate buffer(pH 2.4): MeOH=7:3을 가하여 1.0 mg/ml로 하여 stock solution으로 하였음. 이를 일정량씩 취하여 1.0, 0.5, 0.25,0.1, 0.05, 0.01, 0.005 mg/ml 농도의 표준 용액을 조제하였음. 각 표준 용액을 20  $\mu$ l씩 취하여 HPLC의 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 면적을 구함. 회귀직선방정식을 구하기 위한 HPLC는 3회 반복으로 실시하였으며, UV는 254 nm에서 측정하여 peak 면적과 화합물의 양과의 상관관계를 이용하여 적량곡선을 작성하였음. 이때의 HPLC 조건은 다음과 같음.

Column : Lichrospher 100 RP-18( 4 X 100mm, 5  $\mu$ m, Merck,USA),

Mobile phase: Phosphate buffer(pH 2.4): MeOH= 7:3

Detector:UV 254 nm,

Flow rate :1.0ml/min.

Column temperature: 30°C

검액의 조제 - *Nocardia* sp. CS682 균주 배양액을 동결 건조하여 2g 씩 3 lot를 정밀히 달아 각각 플라스크에 넣고 100 ml 멸균증류수를 가한 후 ethyl acetate를 100ml 씩 2회 가하여 추출하였음. 추출용액을 5,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 고형물을 제거하고 70% EtOH을 이용하여 정확히 250 ml로 맞춤. 250 ml 추출 용액으로부터 25 ml을 취하여 건조한 후 HPLC용 MeOH에 녹여 정확히 20 ml로 맞추어 최종 농도 0.5 g 시료/20 ml MeOH로 조절하여 지표성분 분석에 사용하였음.

## ② 분석방법의 검증

HPLC 분석 방법의 검증은 ICH에서 규정한 가이드라인에 맞추어 실시하였음. 정량곡선의 경우 12.5-200ug/ml의 농도 범위에서 6개의 농도를 지정하여 작성하였음. 작성한 정량곡선을 기초로 하여 correlation coefficients( $R^2$ ), 정량한계 및 검출한계를 설정하였음.

정량한계 및 검출한계의 설정은 아래의 식에 의하여 산출함.

$$\text{Limit of detection} = 3.3 * s / b$$

$$\text{Limit of quantitation} = 10 * s / b$$

(s) means standard deviation of a response and (b) means slope of the analytical curve.

위 분석법을 수행하여 얻은 correlation coefficients( $R^2$ )은 0.9998이었으며 정량한계는 0.25ug/ml, 검출한계는 0.083ug/ml임.

또한 가이드라인에 따라 일일, 일간 분석의 정확성 및 정밀성을 확인하였으며 분석조건이 nargenicin의 검출에 적합함을 확인함.

또한 가이드라인에 따라 일일, 일간 분석의 정확성 및 정밀성을 확인하였으며 분석조건이 nargenicin의 검출에 적합함을 확인함.

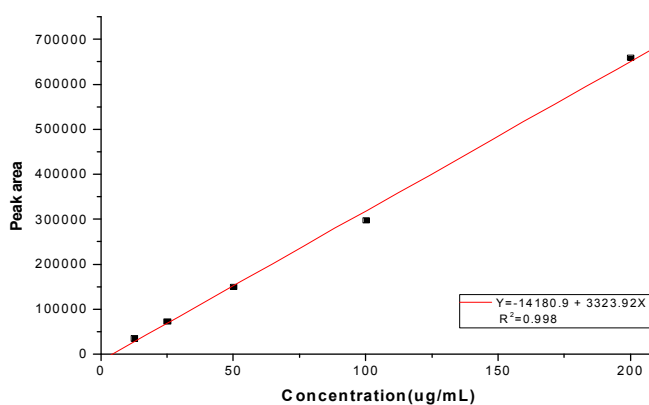


Fig. 18. Linearity of the standard calibration curve of Nargenicin

Table 17. Intra-, Inter day variability of the HPLC method for determination of Nargenicin.

Compound		Intraday (n=3)		
Concentration (ug/mL)	Detected (ug/mL, mean±S.D)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	
<b>Nargenicin</b>				
12.5	12.34 ± 0.033	3.0	98.7	
50	50.26 ± 0.7	1.42	100.52	
100	101.17 ± 1.9	1.90	101.17	
Compound		Interday (n=3)		
Concentration (ug/mL)	Detected (ug/mL, mean±S.D)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	
<b>Nargenicin</b>				
12.5	12.73 ± 0.23	2.07	101.86	
50	51.04 ± 1.17	2.36	102.07	
100	102.35 ± 1.98	1.96	102.35	

Table 18. Validation parameters for Nargenicin assay

PRODUCT	Validation parameters						
	Linearity Regression plot	Repeatability		Accuracy		LOQ (ug/mL)	LOD (ug/mL)
		r	RSD (%)	Mean recovery (%)	RSD (%)		
<b>NARGENICIN</b>	$y=1115.29X-1246.17$	0.9999	0.269	99.72	1.21	0.251	0.083

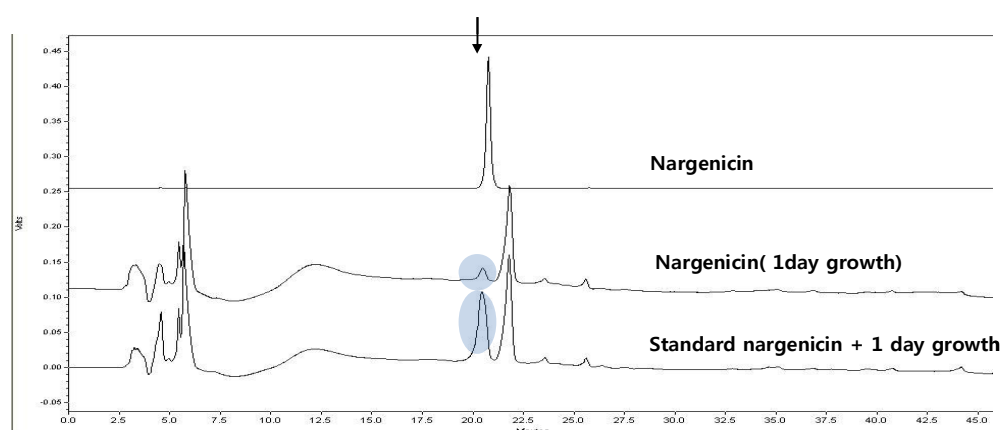
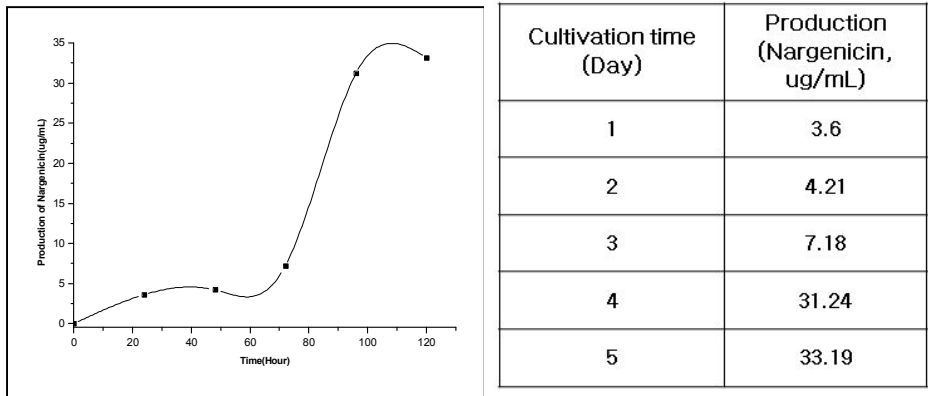


Fig. 19. Typical chromatogram of Nargenicin (top chromatogram), Nargenicin in fermentation broth from *Nocardia* sp. CS682 (middle chromatogram), Nargenicin standard added to fermentation broth from *Nocardia* sp. CS682 (bottom chromatogram)

Table 19. CS682 제품의 함량분석 결과



### ③ CS682 제품 기준

CS682의 균일한 제조를 위해 CS682의 성장과 품질관리를 위한 분석방법을 설정.

성상: 연한황색 혹은 황갈색의 가루

정 량: Paper disk법

- (1) 시험용균 MRSA 693E 혹은 *Staphylococcus aureus* KCTC1928을 시험용 균으로 함.
- (2) 배지 항생물질의 미생물학적 역가시험법에 적합한 배지
- (3) 표준액: 나르제니신 약 10 mg(역가)를 정밀하게 달아 메탄올에 녹이고 최종 농도가 1, 5mg/ml로 하여 표준원액으로 함. 표준원액은 5 ~ 15 °C에 저장하며 30일 이내에 사용. 정량할 때 표준원액 적당량을 정확하게 취하여 0.1 mol/L 인산염완충액(pH 8.0)을 넣고 1 mL 중에 5 µg (역가) 및 10 µg (역가)를 함유하도록 희석하여 표준액으로 함.
- (4) 검액: 시료의 약 150 mg을 정밀하게 달아 0.1 mol/L 인산염완충액(pH 8.0)에 녹이고 정확하게 10mL로 함. 이 액을 가지고 항생물질의 미생물학적 역가시험을 시험.

HPLC분석: 정량할 때 1g에 대하여 나르제니신으로써 49.5~60.5 µg (90~110%)를 함유함.



#### 14. DCS682 시제품 생산

##### 1) DCS 682시험생산

CS682의 대량생산 후 동결건조 작업하여 얻은 원료 분말은 시제품 “DCS682”의 생산에 사용하였음. (그림 20)



Fig. 20. 최종원료 CS682

CS682의 발효는 한국생명공학 연구원에서 DCS682시제품 생산은 대한뉴팜(주) 생산라인에서 수행하였으며 CS682작업공정서, DCS682 생산을 위한 원부원료 분량 및 생산 방법은 아래와 같음.

Table 20. 작업 공정서(CS682)

작업공정(50L, 500L배양)		
STEP	작업공정	기록사항
1	종 배양액을 무균상태에서 50L 발효조에 접종.	Innoculum size: 4%
2	180rpm, 28℃, 0.5vvm의 조건으로 배양.	DO 및 pH를 시간별로 확인.
3	pH가 8.5에 도달하면 50L발효조의 배양액을 500L 발효조로 무균적으로 접종.	거품형성시 소포제를 적량 가함.
4	150rpm, 28℃, 0.5vvm의 조건으로 배양. pH 8.5~9.3의 범위에 도달할 때까지 배양.	DO 및 pH를 시간별로 확인. 거품형성시 소포제를 적량 가함.
5	배양액을 회수하여 농축기에 옮기고 감압 농축.	60-65℃에서 농축한다. 100L이내로 농축한다.
6	농축액을 동결건조.	동결건조시 농축액에 옥수수전분을 적량 첨가 가능. (동결건조 후 원료 끈적임을 막을 있음.)

작업 공정서		
DCS682 배양용배지 조성(50L, 500L발효조)		
원료명	기준량(g)	특이사항
말토오즈(D-maltose)	5	
귀리분(Oatmeal)	2.5	
대두분(Soy bean meal)	2.5	
효모엑스(Yeast EX)	2.5	
탄산칼슘(Calcium carbonate)	0.5	
정제수	적량	
합계	1000mL	
주의 및 점검사항		
배양용 배지성분은 general grade 혹은 생산용 bulk type product로 사용. 배양온도: 28℃ 50L 발효조 배지부피: 30L 500L 발효조 배지부피: 330L 오퍼레이션: 180rpm, 0.5vvm(50L 발효조), 150rpm, 0.5vvm(500L 발효조)		
특기사항		

<p>1) Total volume : 50L approx. (working volume : 35L)</p> <p>2) The ratio of height to diameter (L/D) = 2.5 - 2.6 : 1</p> <p>3) Design pressure : 3kgf/cm<sup>2</sup> (Shell &amp; Jacket)</p> <p>4) Plate jacket for the good efficiency of heat transfer</p> <p>5) material : Vessel(Shell) - STS 316L Jacket - STS304 Insulation cover - STS304</p> <p>6) Three baffle plates</p> <p>7) Stainless steel exhaust condenser</p> <p>8) Impellers size : 47% of Vessel inner diameter.</p> <p>9) Nozzles, ports &amp; Specifications of Upper plate</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Sanitary diaphragm pressure gauge</li> <li>* inoculation port with flame ring</li> <li>* Anti-foam sensor port</li> <li>* Viewing glass for observation of inner vessel</li> </ul> <p>10) Nozzles, ports &amp; Specifications of Vessel side</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Electrode ports ; pH &amp; DO electrode (ingold standard : 25mm)</li> <li>* Temperature(R/B sensor) sensor port</li> <li>* Sampling line</li> <li>* Cooling water in &amp; out (with sight glass)</li> <li>* Air inlet</li> <li>* Exhaust gas line</li> <li>* Illumination glass port</li> </ul> <p>11) AGITATION UNIT &amp; SPEED CONTROL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* output speed : 0 ~ 650 rpm</li> </ul> <p>12) AERATION UNIT</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Sterilizable final filter element (PTFE): 0.02<math>\mu</math>m</li> </ul>	<p>1) Total volume : 500L approx. (working volume : 350L)</p> <p>2)The ratio of height to diameter(L/D)=2.5-2.6:1</p> <p>3)Design pressure: 3kgf/cm<sup>2</sup>(Shell&amp;Jacket)</p> <p>4)Plate jacket for the good efficiency of heatt ransfer</p> <p>5)material : Vessel(Shell)-STS316L Jacket-STS304 Insulationcover-STS304</p> <p>6)Three baffle plates</p> <p>7)Stainless steel exhaust condenser</p> <p>8)Impellers size:4 7% of Vessel inner diameter.</p> <p>9)Nozzles, ports &amp; Specifications of Upper plate</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Sanitary diaphragm pressure gauge</li> <li>*inoculation port with flamering</li> <li>*Anti-foam sensorport</li> <li>*Viewing glass for observation of inner vessel</li> </ul> <p>10)Nozzles ,ports &amp; Specifications of Vesselside</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Electrode ports; pH &amp; DO electrode(ingoldstandard:25mm)</li> <li>*Temperature(R/Bsensor)sensorport</li> <li>*Samplingline</li> <li>*Cooling water in &amp; out(withsightglass)</li> <li>*Airinlet</li> <li>*Exhaust gasline</li> <li>*Illumination glass port</li> </ul> <p>11)Full drainage tank bottom valve (Diaphragmtype)</p> <p>12)AGITATION UNIT&amp;SPEED CONTROL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*outputspeed:350rpm(MAX)</li> </ul> <p>13)AERATION UNIT</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Sterilizable final filter element(PTFE):0.02<math>\mu</math>m</li> </ul>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- 2-1. AUTOMATIC pH CONTROL SYSTEM
- 2-2. AUTOMATIC dO2 MEASURING SYSTEM
- 2-3. AUTOMATIC TEMPERATURE CONTROL SYSTEM
- 2-4. AUTOMATIC ANTI-FOAM CONTROL SYSTEM
- 2-5. AUTOMATIC AIR FLOWRATE CONTROL SYSTEM
- 2-6. AUTOMATIC VESSEL PRESSURE CONTROL SYSTEM
- 2-7. AUTOMATIC STERILIZATION SYSTEM

- 1) Total Volume : 1,000 L
- 2) Working Volume: 700L
- 3) L/D: 1.6:1
- 4) Design Pressure: -1~3.0kg/cm<sup>2</sup> (Shell 외 압)
- 5) Working Pressure: -1~2.0kg/cm<sup>2</sup> (Shell 외 압)
- 6) material: Vessel (Shell) - STS316L  
Jacket - STS304  
Insulation cover - STS304  
Base Frame - STS304
- 7) Impellers size: 47% of Vessel inner diameter.
- 8) Surface treatment: 400# (shell inside)  
320# (outside)
- 9) Top & Bottom Head: 10% Dished bottom head  
: 10% Dished top head
- 10) Jacket: Plate jacket with stiffener ring
- 11) Insulation Cover : STS cover with Urethane foam
- 12) Nozzle & Port: Diaphragm pressure gauge port  
: Rupture Disk  
: Exhaust valve port  
: Pressure transmitter port (1.5S)  
: Vacuum gauge port  
: Light Glass  
: Exhaust valve port  
: Temp. sensor port  
: Steam in / Water out & Safety relief valve
- 13) Agitation Unit:  
\* output speed: 90rpm (fixed)
- 14) Condenser
- 15) Receiver Tank
- 16) Vacuum Pump
- 17) Centrifugal pump

#### 4. 동결건조기 (50kg)

- 1.구성 : 운전실, 건조실, 가열장치, 수분포집부, 냉각장치, 진공장치
- 2.원료의 처리량 : 50Kg/BACH
- 3.냉동방식 : 2원 냉동방식
- 4.시료동결방식 : 자비동결 처리방식
- 5.시료동결시간 : 4HR(-45'C)이하
- 6.사용진공압력 : 0.01Torr ~ 0.5Torr(최대압력 X 10<sup>-3</sup>Torr)
- 8.가열방식 : ELECTRIC HEATER (간접방식)
- 9.수분제거 : 수분포집기 -75'C이하의 Cold trap

1.동결건조기의 크기 : 1450W x 2003D x 2140Hmm

2.운 전 실(Control System) : 컴퓨터 제어방식

2)프로그램 콘트롤

3)ChartRecordingSystem

4)동결 건조 시간 확인 기능

5)TouchScreenControlSystem

6)PLC에 의한 제어방식

3.건 조 실(Insert Chamber) :

1)재 질 : 스테인레스 스틸(SUS304)

2)크 기 : Ø 880 x 930 Lmm x 6 mm

3)건조물의 투입량 : 50Kg 이상일 것.

4)건조물의 보호장치

5)허용내부용기압력

6)개폐기(Door) : Overlap Door 방식

4.가 열 장 치(SHELF) :

2)크 기 : 500W x 800D x 15Hmm

3)가열방법 : 브레인열교환 방식

5)사용온도 : -45℃에서 +70℃

5.수분 포집부(Cold Trap Chamber) :

1)수분 포집실 : 880? x 615Lmm

2)포집기(Cold Trap) :?21.7 x 29m (ICE THICKNESS 15mm)

3)성에제거기(Defrosting System)

6.냉각 장치(Refrigeration System)

1)냉동기(Compressor) : 고용량의 7.5 Hp의 2원 냉동기

2)응축기(Condenser) : 10 Hp의 대기 공냉

7.진공 장치(Vacuum System): 용량 841Liters/Min

1)진공펌프의 최저 도달압력은 10 x 10<sup>-4</sup> Torr 이하

2)진공계이지: 대기압력부터1x10<sup>-3</sup>Torr까지 측정

시제품 생산은 대한뉴팜(주) 생산라인에서 수행하였으며 원부원료 분량 및 생산방법은 아래와 같음.(표 21, 그림 21)

Table 21. 원료의약품 분량

	원 료 명	분 량(kg)
주원료	CS682	1
부원료	효모배양물	100
부원료	비타민 B1	0.1
부형제	말분 외.	적량
T O T A L		1000

CS682 는 함량균일성을 고려하여 배산법을 이용하여 혼합하였음.(제조번호 8001)  
혼합 후 얻은 제품은 1kg 씩 차광기밀포장함.

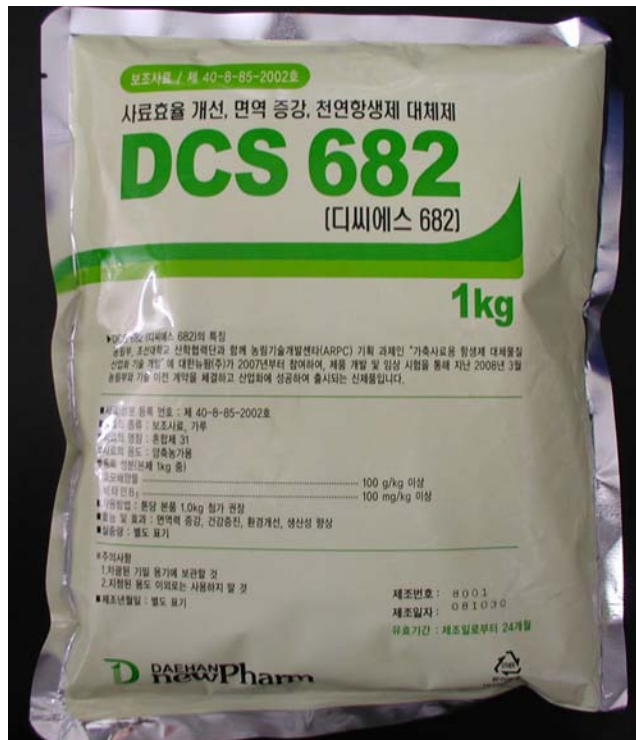


Fig. 21. 시험판매용 제품인 "DCS682"

결론

CS682를 주원료로 하여 공장규모의 시험생산을 수행하였으며(대한뉴팜 생산공장) batch scale은 1톤으로 하여 시제품 1000포를 생산하였음. CS682의 물성, 유동성은

양호하였으며 부원료 및 부형제와 배산 혼합 시 문제는 없었으며 함량균일성도 일정함. 본 품 "DCS682"(lot 8001)은 시판 후 조사를 위해 충남 병천 H 양돈장(2,500두 규모), B 양돈장 (15,000두), 아산 A 양돈장, 그 외 다수의 농장에서 자돈, 육성돈에 DCS 682 1kg/사료1MT 투입 후 질병 발생 여부 등 확인 중에 있으며 충남 아산, 경기 화성, H 육계 농장에서 닭에 투입 나타나는 변화를 관찰 중에 있음. 특히 육성돈의 상태, 소화, 질병 상태 등이 투입전보다 좋아져 농장주들의 좋은 반응을 얻고 있음. 2009년 출시 후 제품매출이 발생하고 있으며 매출 현황 및 향후 예상은 아래와 같음.

#### 실용화 실적

DCS682라는 제품명으로 가축사료첨가제 용도로 대한뉴팜(주)와 함께 사업화에 성공하였으며 2008년 말 기술이전 완료, 2009년 2월 제품판매 실시하여 단기간에 산업화의 결과를 도출하였다. 구체적인 내용은 아래와 같음.

- 제품명: DCS682
- 완제품 제조 및 판매사 : 대한뉴팜(주)
- 판매개시: 2009.2
- 판매누계액(2009년 6월 누계): 98,200,000원
- 3개년 판매 예상액  
2009년: 10억, 2010년: 20억, 2011년: 30억
- 현재 대한뉴팜(주)측에서 3개사와 해외시장 마케팅관련 협의중에 있으며 2011년에 본격적으로 해외시장 마케팅을 목표로 함. 마케팅 제휴 성공시 3년 차에 약 500억 매출달성을 예상.

## 제 2절 : 제2세부과제 (발효세균의 항암 및 면역활성 연구)

연구 책임자 : 김성준

### ○ 연구필요성

- CS682, 유도체, CS682 발효액, 부분 정제물의 생물학적 활성 검증 : 면역증강, 항산화 등의 다양한 생물학적 활성 평가 및 기전연구

### ○ 연구목표

- 세포분화유도 효능 검증
- 항산화효능 검증
- 항암효능 검증
- 면역증강효과검증
- 간세포 보호효과 검증

### ○ 주요 연구방법 및 결과

#### 1. 연구방법

##### 1)항산화 활성평가

##### ㄱ. DPPH radical 소거능 평가

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거능 측정은 안정한 free radical 화합물인 DPPH를 기질로 하여 시료의 항산화 능력을 측정하는 방법임. 517nm에서 광흡수를 나타내는 화합물인 DPPH는 항산화물질에 의해 전자공여 작용으로 탈색이 되어 흡광도가 감소하여 감소된 흡광도를 변화를 통하여 항산화 물질의 활성을 측정. 시료를 100% 메탄올에 녹인 후 희석하여 최종농도가 되도록 함. 각기 다른 농도의 시료 에 0.15mM DPPH 용액 100 $\mu$ l를 가하여 잘 혼합하여 30분 후 517nm에서 흡광도의 변화를 측정. 대조구는 시료대신 메탄올을 가하여 흡광도 변화 정도를 조사하였으며 free radical을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC<sub>50</sub>으로 계산.

$$\text{Free radical 소거능} = (\text{시료의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$$



ㄴ. NBT/XO (Superoxide 소거작용) 측정

0.8mM hypoxanthine, 1mM EDTA, 0.2mM NBT를 함유하는 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 400 $\mu$ l에 시료를 농도별로 10 $\mu$ l씩 가함. 반응은 xanthine oxidase (100mU/ml) 을 100 $\mu$ l 가하면서 시작. 반응 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후 590nm에서 흡광도를 측정.

$$\text{Superoxide 소거능} = (\text{시료의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) * 100$$

ㄷ. 환원력 평가

시료 1ml 에 200mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) 과 10% potassium ferricyanide를 각각 1ml씩 차례로 가한 다음 50 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킴. 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid를 1ml 첨가하여 4000rpm에서 10분간 원심분리. 상층액 1ml에 0.1% ferric chloride 1ml을 가한 후 700nm에서 흡광도를 측정. 흡광도의 증가는 환원력의 증가를 의미함.

ㄹ. 총 페놀 화합물 측정

시료 1ml에 Foline-Ciocalteau reagent 와 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer를 각각 1ml씩 가한 후 실온에서 1시간동안 반응시킨 다음 700nm에서 흡광도를 측정. gallic acid를 서로 다른 농도로 조제하여 시료와 동일한 방법으로 분석하였으며 표준 검량곡선으로부터 시료의 총 페놀 화합물 함량을 측정함.

ㅁ. 아질산염 소거능

1mM NaNO<sub>2</sub> 1ml에 일정 농도의 시료 1ml을 가하고 0.1N HCl (pH 1.2)을 더해준 다음 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응. 반응 후 각 반응액 1ml에 2% acetic acid 5ml 과 Griess 시약 0.4ml (30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전에 제조) 가하여 실온에서 15분간 방치 후 520nm에서 흡광도를 측정.

$$\text{아질산염소거능 (\%)} = (A - C) / B * 100$$

A: 1mM NaNO<sub>2</sub> 과 반응시킨 시료의 흡광도, B: 1mM NaNO<sub>2</sub>의 흡광도, C: 시료의 흡광도

## 2) 세포 배양

세포 배양을 위해 각 세포주는 RPMI1640 medium, DMEM medium에 각각 10% fetal bovine serum (FBS) 및 100unit/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 에서 배양하였음.

## 3) MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

세포 생존율 변화를 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시함. 세포주를  $1 \times 10^5$  cells/ml로 맞추고 96 well plate에 각각 100 µl씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 샘플을 암세포주에 처리. 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5mg/ml) 용액을 10 µl씩 첨가하여 다시 1시간 동안 배양 시킴. Formazan 형성을 확인한 후, 배지를 완전히 제거하고, well 바닥에 형성된 formazan을 녹이기 위해 100 µl의 DMSO를 첨가한 후, microplate reader 를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 조각인 추출물을 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포생존 변화를 나타냄.

## 4) LDH assay/ALT assay 의한 세포독성 확인

세포독성을 측정하기 위한 방법으로 LDH와 ALT release assay를 실시. 세포주를  $1 \times 10^5$  cells/ml로 맞추는 후, 100 µl씩 96 well plate에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 뒤, nargenicin을 세포주에 처리함. 다시 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 새로운 96 well plate에 50 µl 분주하고, 이 배양액에 LDH reagent를 50 µl씩 첨가하여 상온에서 정치시킨 후, 20분 간 반응. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 µl씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정. 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 배양액을 제거한 후, 0.5% Triton X-100용액을 50µl 첨가하여 400 rpm으로 10분 동안 shaking시켜 의도적으로 세포벽을 깨트린 다음, 같은 방법으로 LDH reagent 50 µl를 첨가하여 반응 시키고, 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정. ALT는 LDH와 동일한 방법으로 처리한 후, kit에 제공된 실험방법에 준하여 측정함.

## 5) Hoechst 33324 staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

apoptosis 유발 확인을 위한 핵의 형태적 변화 관찰을 위하여 세포를 12 well plate

에  $2 \times 10^5$  cells/ml로 분주하여 부착시킨 후 nargenicin을 24시간 동안 처리. 처리 후 4% formaldehyde 용액과 상온에서 10분 동안 고정하고 PBS로 3번 씻어줌. Hoechst 33324 용액을 이용하여 암 조건·상온에서 15분간 염색시킨 후, PBS 및 증류수로 DAPI 용액을 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경을 이용하여 100배의 배율로 각 농도에 따른 세포의 핵 형태변화를 관찰.

#### 6) rhodamine 123을 이용한 mitochondria membrane potential 변화 측정

mitochondria membrane potential 변화 확인을 위해 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml로 분주하여 부착시킨 후 nargenicin을 12시간 동안 처리. rhodamine 123 용액을 이용하여 암 조건·상온에서 20분간 염색시킨 후, PBS로 세척한 뒤 480 nm(Ex.) 및 530 nm(Em.)에서 측정.

#### 7) Western blot

배양된 세포를 수거하여 lysis buffer (RIPA buffer 1 ml, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM DTT)로 4°C에서 30분간 용해시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취함. 단백질을 BCA 시약을 이용하여 BSA로 작성한 standard curve에 OD값을 대입시켜서 protein량을 정량. 20  $\mu$ g 단백질과 5 $\times$ sample buffer (1 ml glycerol, 0.5 ml  $\beta$ -mercaptoethanol, 3 ml 10% SDS, 1.25 ml 1M Tris-HCl, 1~2  $\mu$ g bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 9% SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동함. PVDF membrane에 전이시키고 5% non-fat skim milk in TBST로 blocking 시킨 후, primary antibody 를 희석하여 4°C에서 overnight 동안 반응시킴. TBST로 3회 세척한 후, HRP-conjugated secondary antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시킴. TBST로 세척 후 Westzol 용액으로 발색시킨 뒤 X-ray 필름에 감광시켜 발현 여부를 확인함.

#### 8) nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO-생성량 측정을 위해 대식세포를 사용. 배양된 세포를 24 well pate에  $4.5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 넣은 다음, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 하루 동안 배양한 후 시료와 LPS를 처리하여 24시간 동안 세포를 배양. 상등액 50  $\mu$ g을 취하여 동일 부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine

dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정. Nitrite의 표준물질로 sodium nitrite를 사용하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산.

#### 9) Cytokine 농도변화 측정 (ELISA)

RAW 264.7와 PBMC를 48 well plate에  $2 \times 10^5$  cell/well로 분주. 다음에 시료를 각 세포에 처리한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 배양기에서 24시간 동안 배양. 배양 후 배지를 이용하여 배지내로 분비된 interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 의 양을 ELISA를 이용하여 측정. 각 kit의 매뉴얼에 따라 실험을 진행함.

#### 10) 활성산소종 측정

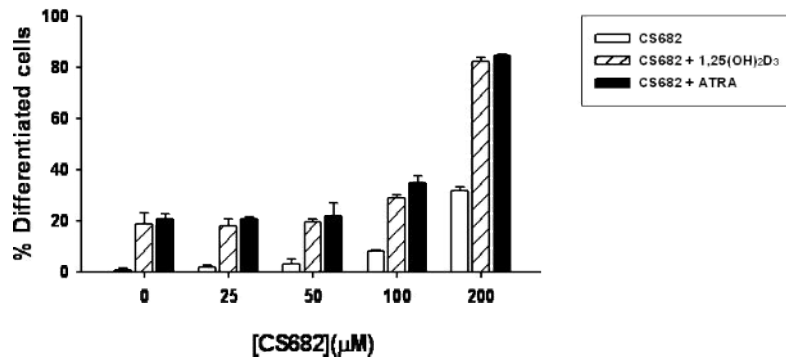
96 well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well로 분주한, 시료를 각 세포에 처리하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 배양기에서 24시간 동안 배양. 배양 후 배지를 제거한 후, 세포에 2',7'-Dichloro-fluorescein diacetate 을 첨가하여 30 분간 반응시킴. PBS로 세척한 뒤 470 nm(Ex.) 및 540 nm(Em.)에서 측정.

## 2. 연구 결과

### 1) CS682의 세포분화 유도효과 검정

#### (1) CS682가 HL-60세포주의 분화에 미치는 영향

HL-60 세포주에 5 nM의 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>나 50 nM의 ATRA를 처리함과 동시에, CS682를 농도별(0~200  $\mu$ M)로 처리하여 3일간 배양한 후, NBT reduction assay를 수행함. CS682는 농도에 따라 단독으로 약 30%의 분화를 유도하고 또한, ATRA나 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 병행하여 처리하였을 때 농도 의존적으로 분화를 유도함.



KV-1 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ■ 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> or ATRA ■

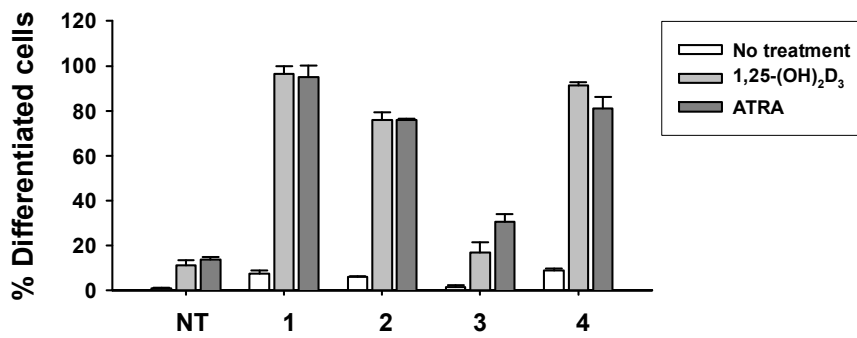


Fig. 1. Differential effect of KV-1 in relation to the timing of treatment on 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/ATRA-induced HL-60 cell differentiation.

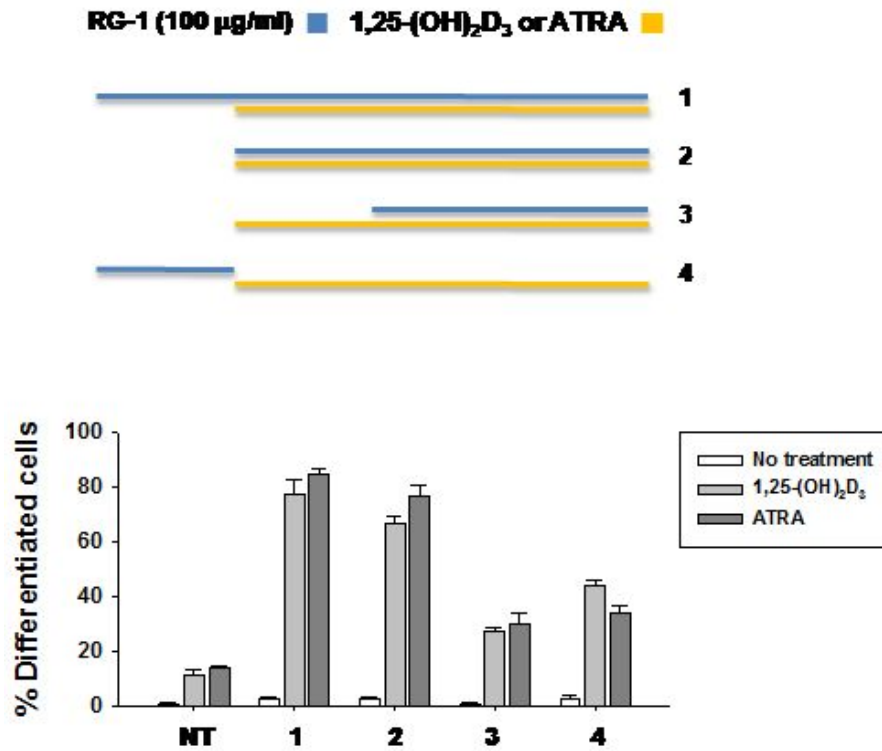


Fig. 2. Differential effect of RG-1 in relation to the timing of treatment on 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/ATRA-induced HL-60 cell differentiation.

(2) CS682 단독 또는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>나 ATRA와 병용처리 하였을 때 HL-60세포주의 형태 분석

HL-60 세포주를 미처리(A), 5 nM 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>단독(B), 50 nM ATRA 단독(C), 200 µM CS682 단독(D), 5 nM 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>+200µM CS682 (E), 또는 ATRA + 200 µM CS682로 처리하여 3일간 배양한 후 Giemsa staining 방법으로 세포의 형태변화를 관찰. 그 결과 CS682와 분화 유도제를 병용처리 하면 핵/세포질의 비율이 감소하며 형태의 변화로 분화함을 확인 할 수 있음.

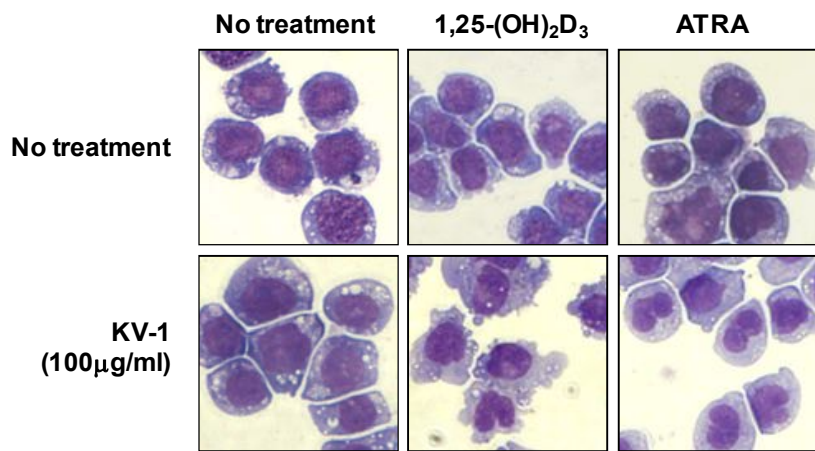
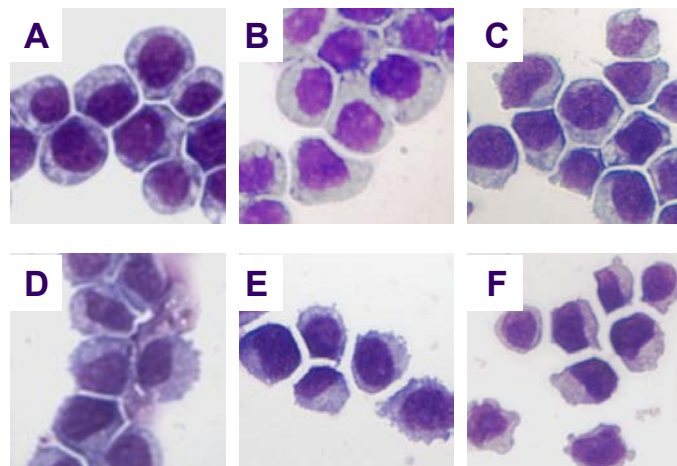


Fig. 3. Morphologic analysis of KV-1-treated HL-60 leukemia cells.

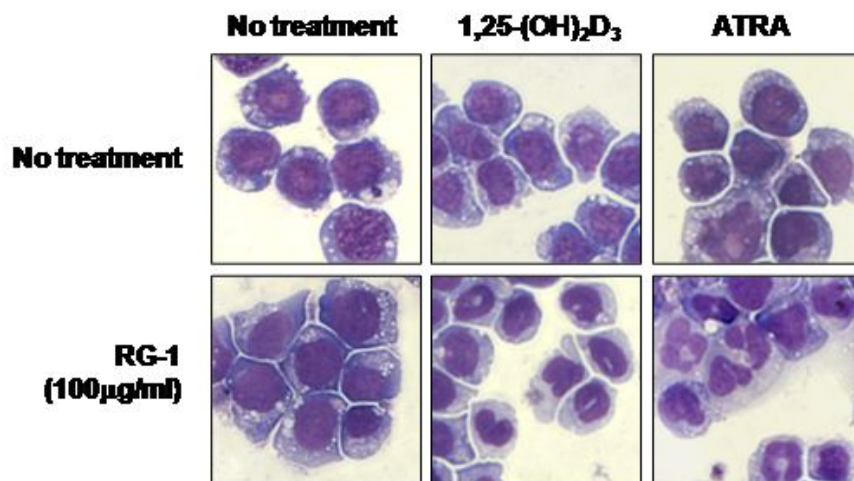
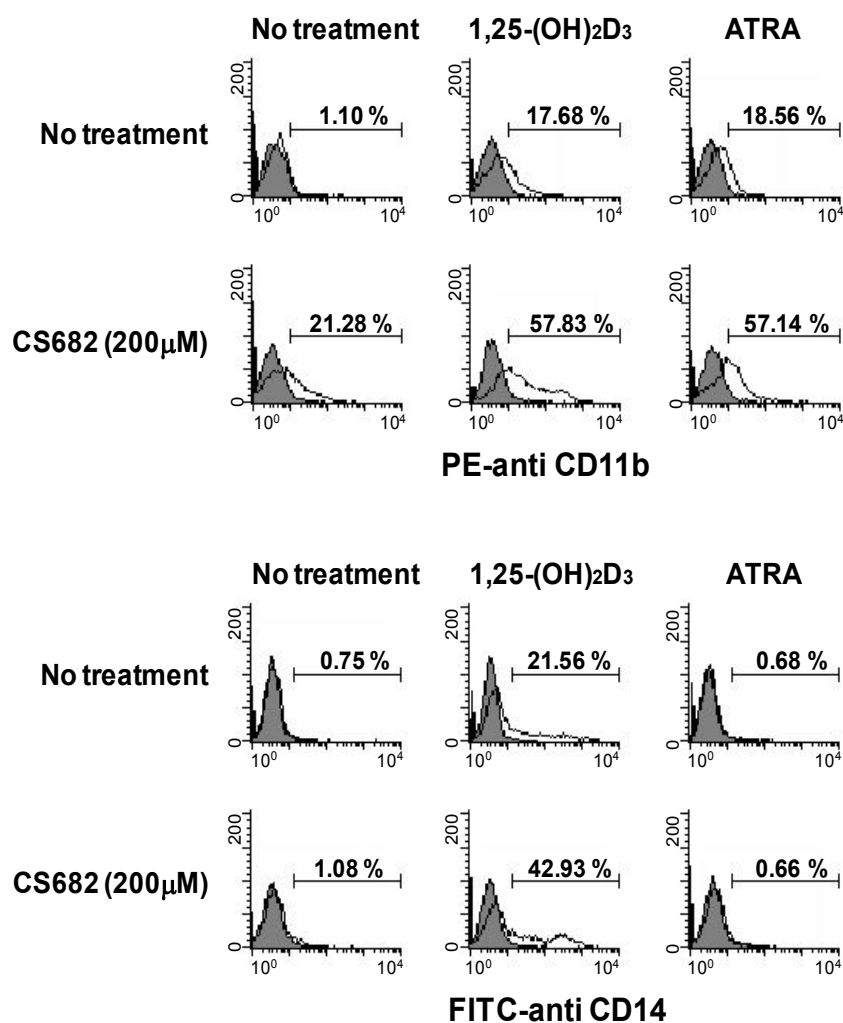


Fig. 4. Morphologic analysis of RG-1-treated HL-60 leukemia cells.

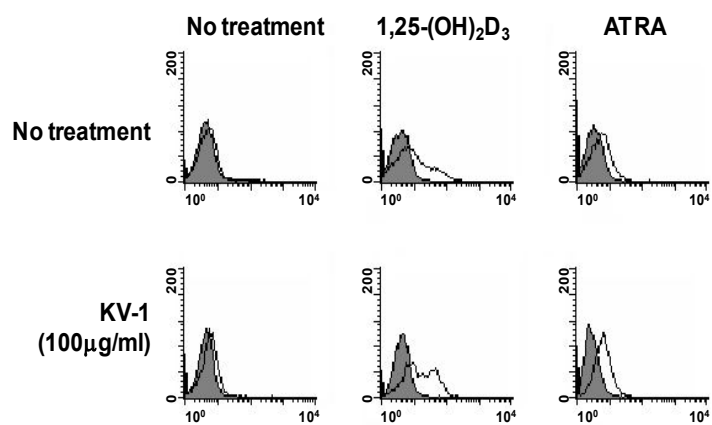
(3) CS682가 유도한 HL-60 세포주 분화의 cytofluorometric analysis

HL-60 세포주를 미처리, 5 nM 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 단독, 50 nM ATRA 단독, 200 μM CS682, 5 nM 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> + 200 μM CS682, 또는 ATRA + 200 μM CS682으로 처리하여 3일간 배양한 후 CD11b 및 CD14를 발현하는 세포를 측정함. 그 결과, CS682와 분화유도제를 처리하면 분화가 증가됨을 알 수 있었고, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 함께 처리하면 monocyte/macrophage로 ATRA와 함께 처리하면 granulocyte로 백혈병 세포가 분화함을 알 수 있었음.





**PE-anti CD11b**



**FITC-anti CD14**

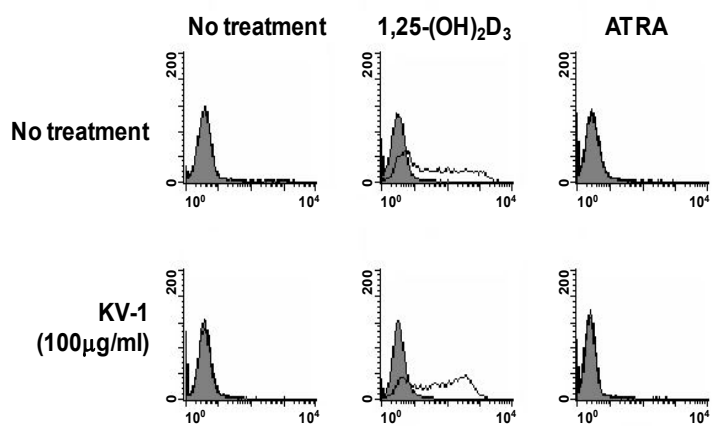


Fig. 5. Cytofluorometric analysis of KV-1-treated HL-60 leukemia cells.

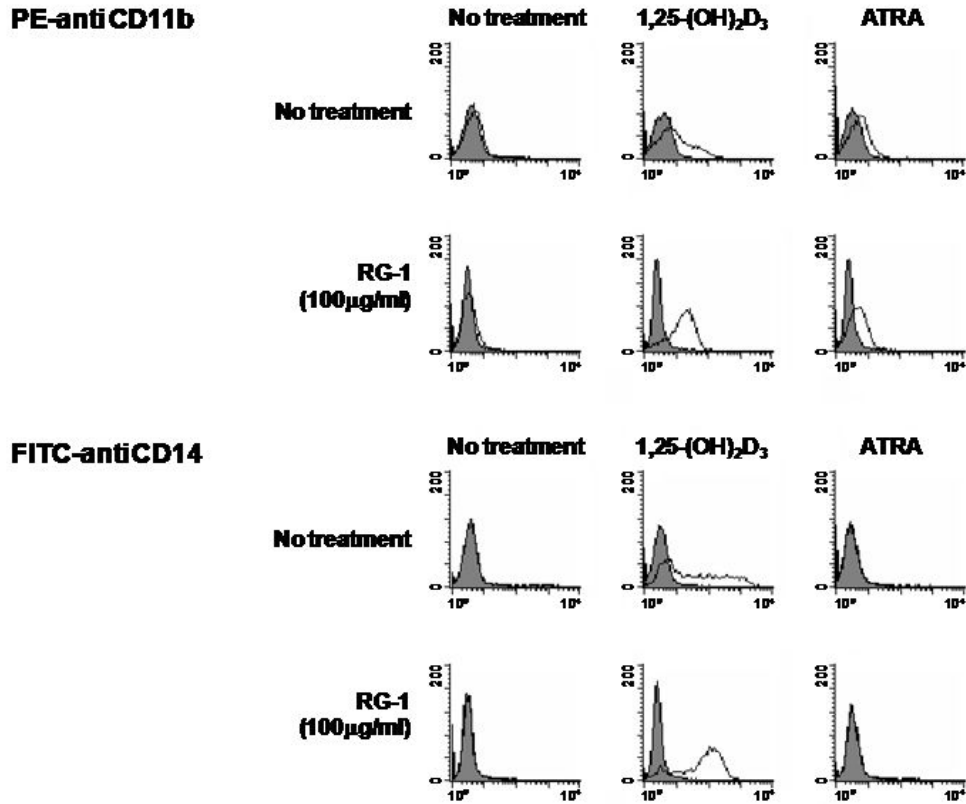


Fig. 6. Cytofluorometric analysis of RG-1-treated HL-60 leukemia cells.

(4) 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>나 ATRA가 유도하는 HL-60 세포주의 분화에서의 CS682의 시간에 따른 효과

CS682의 분화유도 효과가 분화유도제의 처리 전후의 어느 시점에서 더 효과적인지 확인하기 위해 동일시간, 즉, 3일 동안 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>나 ATRA를 처리하고, 그 처리 1일 전/같은 시각/ 1일 후 각각 세가지 조건으로 CS682를 처리함. NBT reduction assay를 통해 분화를 확인한 결과, CS682는 분화유도제를 처리하기 전 또는 동일 시점에서 처리를 해야 분화유도의 증강에 더 효과적임을 확인.

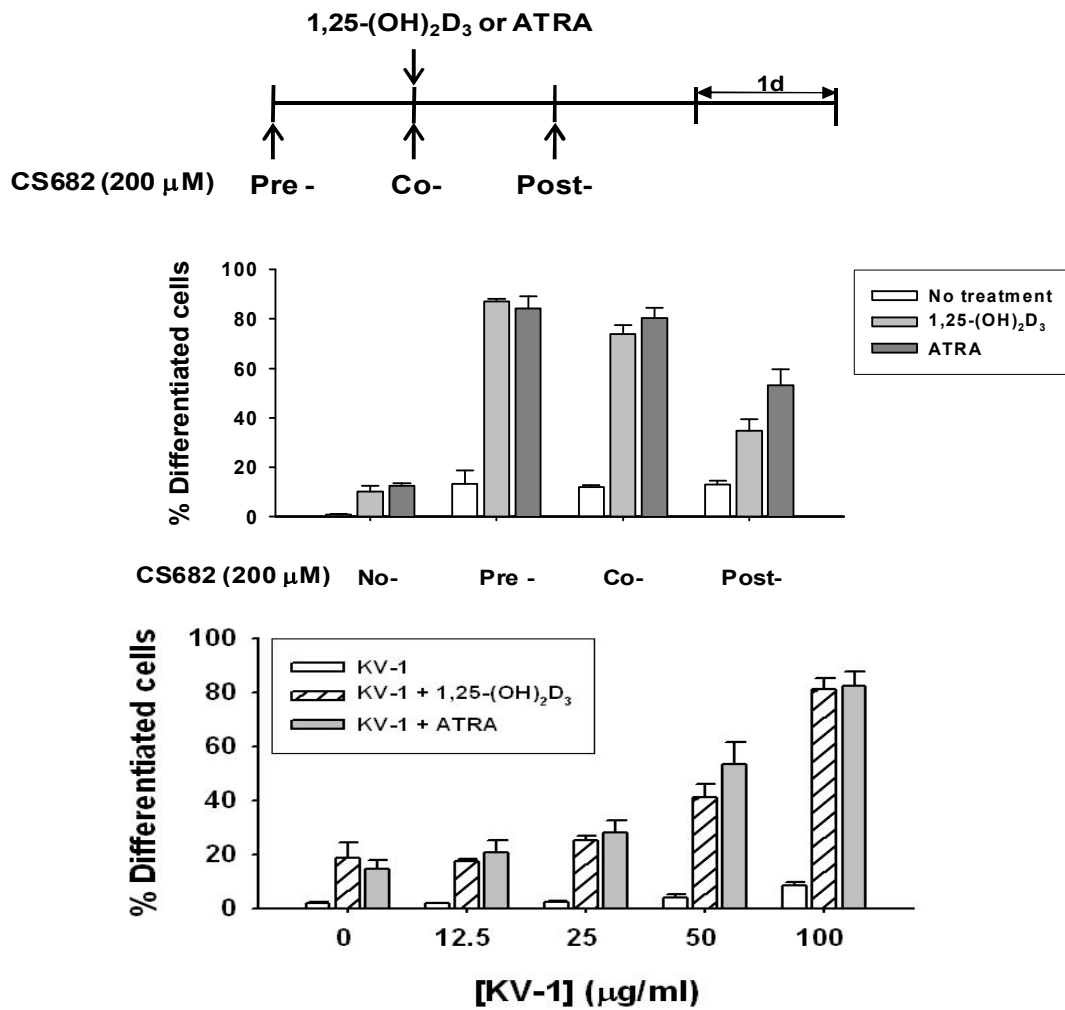


Fig. 7. Effects of KV-1 on HL-60 cell differentiation.

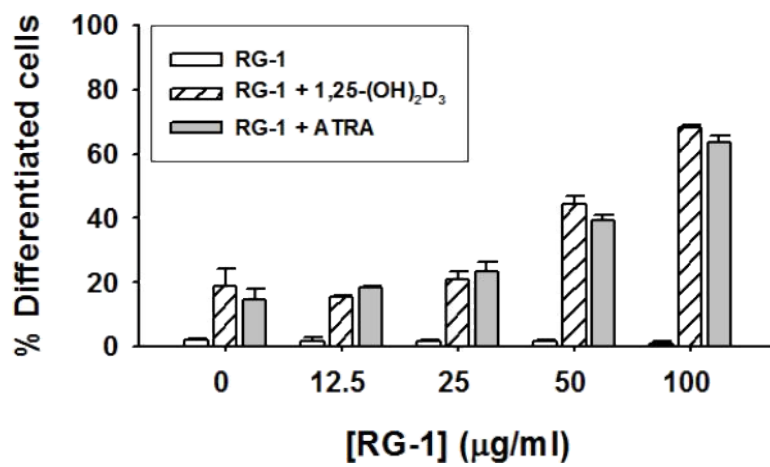


Fig. 8. Effects of RG-1 on HL-60 cell differentiation.

(5) CS682와의 병용처리에 의한 분화유도 경로 탐색

다음으로 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>나 ATRA와 함께 CS682를 처리할 때, 어떤 경로를 통해 분화가 유도되는지를 살펴봄. 각각의 분화경로 억제제를 처리하고, CS682와 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 또는 ATRA를 3일간 처리한 후 NBT assay 수행. 그 결과, PKC, ERK, JNK inhibitor에 의해 CS682와 ATRA나 1,25D<sub>3</sub> 분화 유도제에 의해 유도된 HL-60 세포의 분화가 농도 의존적으로 현저히 감소하였고, PI3-K inhibitor에 의해서는 CS682와 분화 유도제에 의해 유도된 HL-60 세포의 분화에 전혀 영향이 없었으며, p38 MAPK inhibitor는 오히려 분화를 증가시킴. 이는 이들 분화가 PKC, ERK, JNK pathway를 통해 일어나고, PI-3K와는 무관함을 보여줌.

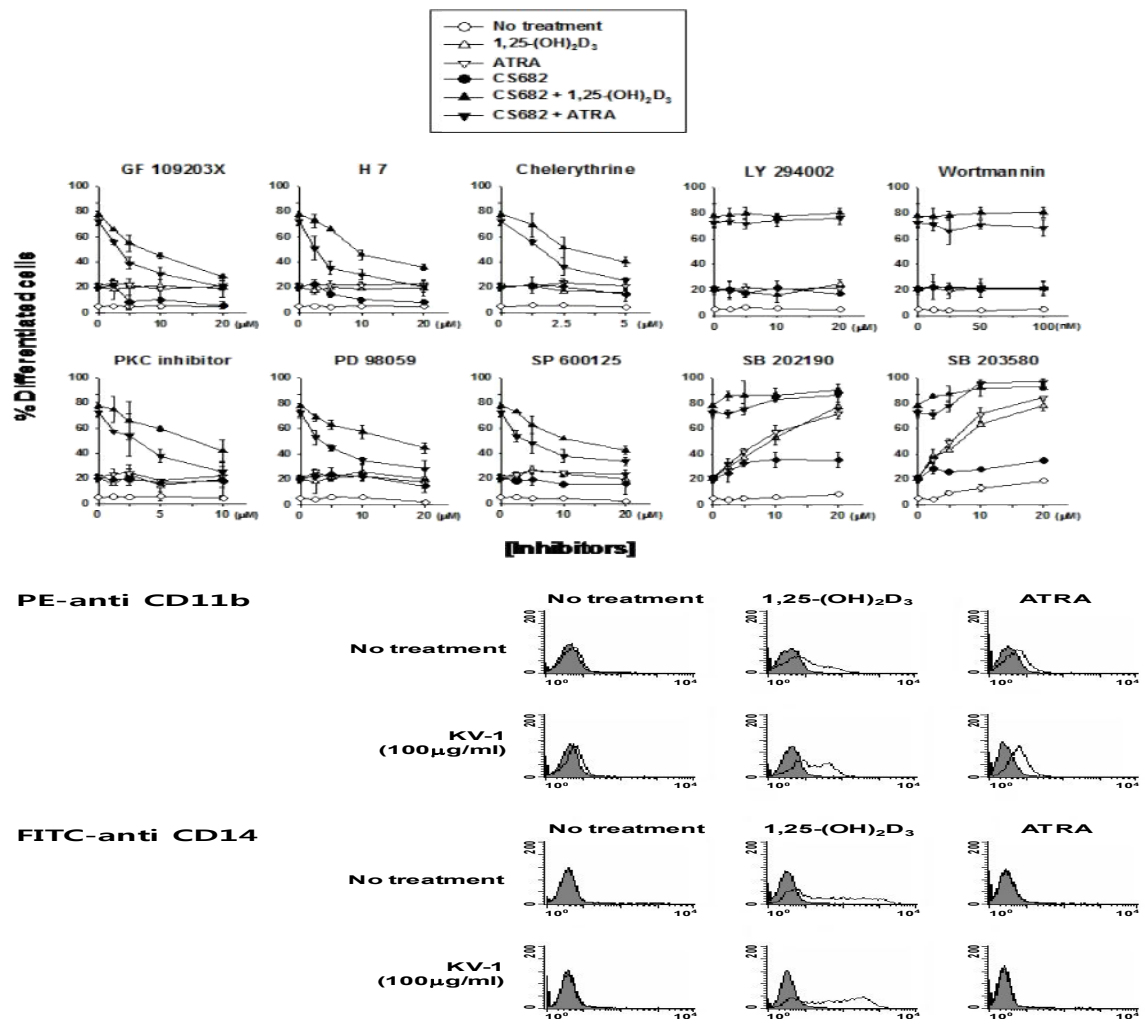


Fig. 9. Cytofluorometric analysis of KV-1-treated HL-60 leukemia cells.

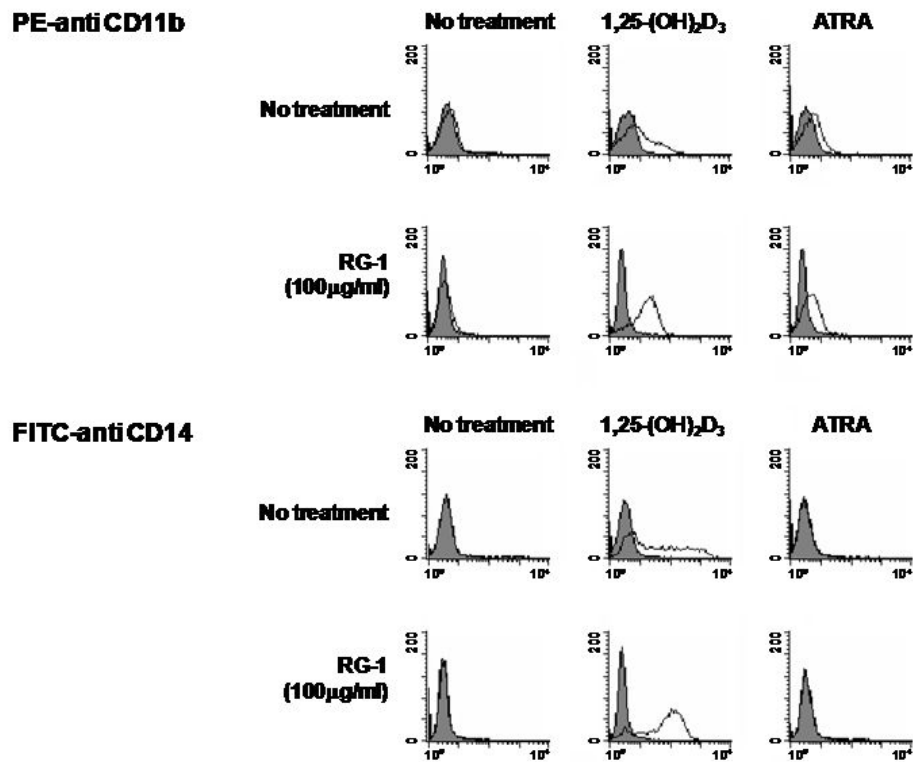


Fig. 10. Cytofluorometric analysis of RG-1-treated HL-60 leukemia cells.

(6) CS682의 항염증효과

BV2는 mouse 유래의 소교세포로 신경염증실험에서 세포 사멸의 분자적 메커니즘과 LPS에 의한 소교세포 활성화를 확인하는데 일반적으로 사용되는 세포주이므로 본 실험에서 사용. BV2 세포에 LPS를 처리하였을 때, 500 ng/ml 농도까지는 24시간 후에도 세포독성에 의한 생존능력 감소 현상이 보이지 않았지만 그 이상을 처리하고 배양하면 24시간 후에 세포사멸이 조금씩 일어나 세포생존능력이 조금씩 감소되는 것으로 보임(Fig. 11). 따라서, BV2 세포 자체에 영향을 주지 않는 농도인 500 ng/ml 농도이하로 다음 실험들을 진행.

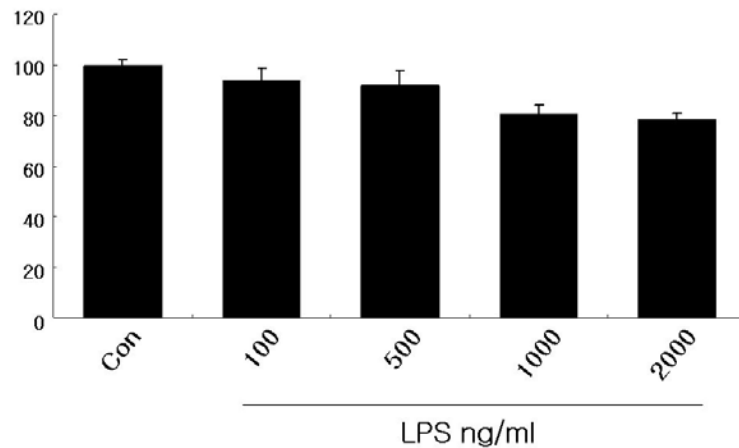


Fig. 11. Effect of LPS on the cell viability of microglia. The cell viability of BV2 cells were determined by MTT assay.

NO는 신경세포에서 신호전달물질로서 작용도 하지만 세포내 NOS에 의하여 아미노산인 L-arginine으로부터 합성되고, 더욱 산화되어 안정적이고 불활성 산화물인 nitrite(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)와 nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)로 됨. 또한 반응성 산소기와 같이 반응하여 강력한 세포독성을 나타내기도 함. LPS에 의한 NO생성 증가를 griess reagent assay를 통하여 알아보았음. LPS 처리에 의하여 소교세포가 활성화 되면서 NO의 생성량이 급격히 증가하였는데 CS682를 전 처리했을 때 LPS에 의하여 급격히 증가했던 NO생성이 드라마틱하게 억제 되는 것을 알 수 있었음. LPS만 단독 처리하였을 경우 NO생성량이 대조군에 비해 4배 가까이 증가한 반면에 CS682를 저농도(10 ng/ml)로 처리하여도 LPS에 의해 증가 했던 NO생성량이 2배 이하로 급격히 억제됨을 볼 수 있었음. 또한 CS682를 100 ng/ml 농도로 처리 했을 경우에는 원래의 상태로 100% NO생성 증가를 억제 했으며, 고농도(20 µg/ml)로 처리하였을 경우 LPS를 같이 처리 하여도 오히려 대조군보다 더 낮은 NO생성량을 보여주었음(Fig. 12). 이것으로 CS682에 의한 NO생성 억제효과가 dose-dependent하며 매우 뛰어난 NO 억제 효능을 가짐을 알 수 있었음. 이러한 결과는 염증반응과 그로 인한 NO 생성에 의한 독성으로부터 CS682가 효과적으로 보호 할 수 있음을 시사함.

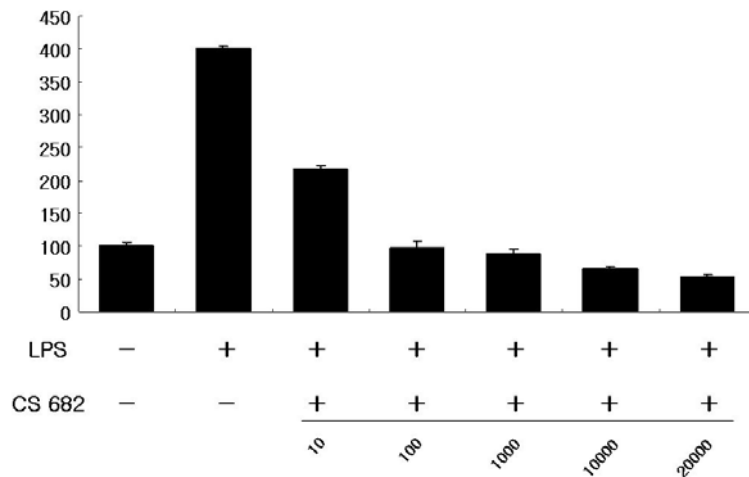


Fig. 12. Inhibition of LPS-induced NO production by CS682 in BV2 cells. The response of BV2 cells to LPS and CS682 for 24 hr stimulation was quantified by nitrite release level. CS682 (10 ng/ml~20  $\mu$ g/ml), LPS (500 ng/ml). The amount of NO was analyzed by Griess reaction.

뇌에서 발현되는 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 HPA axis(시상하부-뇌하수체- 부신 축)을 활성화시켜 호르몬 활동을 조절하는데 관여하는 것으로 보고되고 있음. 또 중추신경계 감염이나 외상성 손상, 다발성 경화 증(multiple sclerosis, MS), 알츠하이머성 치매 및 파킨슨병 등에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 또는 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가되며, 3-5 transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 나 TGF- $\beta$  superfamily에 속하는 bone morphogenic proteins, 성장인자 및 분화인자 등은 신경세포의 발달과 생존 및 손상 복구에 중요한 역할을 함. IL-1 $\beta$ 는 초기염증반응에 관여하는 중요한 인자로 알려져 있는데, LPS를 단독 처리하였을 때 IL-1 $\beta$ 의 발현량이 급격히 증가하는 것을 PCR를 통하여 볼 수 있었다. 이에 비해 CS682 처리군은 대조군에서보다 더욱 발현량이 감소되어 있음을 볼 수 있었고, LPS를 같이 처리한 군에서도 역시 대조군과 비슷한 수준으로 발현량 증가가 억제됨을 볼 수 있었음. 특히 4시간 반응 후에 IL-1 $\beta$ 의 발현량이 급증하는데 CS682와 LPS를 동시 처리한 경우 발현량이 눈에 띄게 감소하는 것을 볼 수 있었음. IL-6의 경우에는 LPS에 의하여 발현량이 증가하였지만 CS682에 의한 발현 억제 효과는 볼 수 없었음. 하지만 염증반응의 또 다른 중요한 인자인 TNF- $\alpha$ 의 경우 LPS 단독 처리시 TNF- $\alpha$ 의 발현량이 대조군에 비하여 급증하는데 비해 CS682를 같이 처리한 경우 대조군과 비슷한 수준으로 발현량 증가가 뚜렷이 억제됨(Fig. 13).

염증 반응에서 iNOS는 NO생성과 관련하여 세포피사에 많은 영향을 미치는데 대

조군과 CS682 처리군에서는 iNOS의 발현이 거의 없었지만 LPS단독 처리하였을 경우 대조군에 비하여 그 발현량이 급격히 증가하는 것을 확인. 하지만 LPS 처리군에 CS682를 동시 처리하였을 경우 iNOS의 발현양이 대조군과 비슷한 수준으로 발현량 증가가 억제됨(Fig. 14).

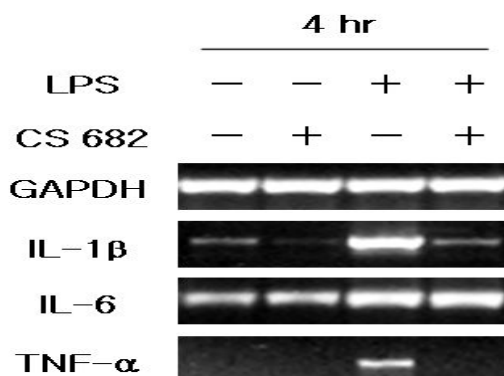


Fig. 13. Effects of co-treatment with CS682 (20 μg/ml) on LPS (500 ng/ml)-induced regulation of cytokines expression level in BV2 cells. Cells were treated with 20 μg/ml CS682 and 500 ng/ml LPS for 4 hr.

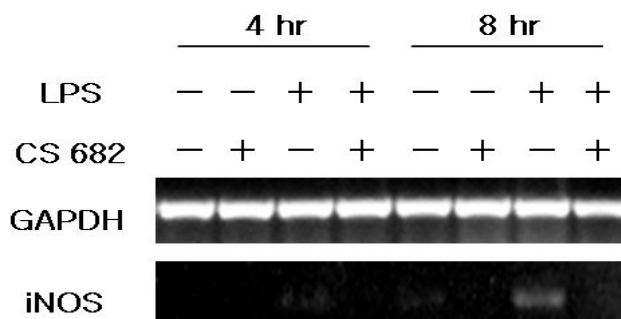


Fig. 14. Inhibition of iNOS mRNA expression by CS682 in LPS-treated BV2 cells. Cells were treated with 20 ug/ml CS682 and 500 ng/ml LPS for a incubation 4 hr or 8 hr.

BV2 세포가 활성화상태가 되면 염증인자인 IL-1β, IL-6, TNF-α가 발현이 되고 NO 생성에 관련이 있는 iNOS발현을 급격히 증가 시키는데 방선균 추출물인 CS682가 선택적으로 IL-1β, TNF-α, iNOS의 발현증가를 대조군과 비슷하거나 대조군보다 더 낮은 수준으로 억제해 주는 것을 본 연구 수행을 통해 알 수 있었음. 이로서 CS682가 신경염증반응 기작중 주로 초기에 작용을 하는 cytokines와 NO생성과 관련 있는 iNOS발현 증가를 억제함으로써 소교세포에서의 NO 분비를 억제하는 것을



확인하였고, 이러한 결과는 CS682가 효과적으로 면역-염증반응에 의한 신경세포 사멸을 막아줌으로써 염증관련 신경퇴행성 질환을 조절할 가능성을 가짐을 의미함. 방선균 추출물인 CS682는 항염증 물질로서 소교세포의 활성을 증가시키는 LPS에 의한 손상을 억제시킴으로서 신경염증증상 완화에 효과가 있을 것으로 보임. 또한 신경염증은 신경퇴행성질환과도 밀접한 관련이 보고되어지고 있는데 이에 신경염증과 신경퇴행성 질환과 연계되어 있는 pathway를 살펴보고 연구함으로써 신경염증 증상뿐만이 아니라 신경퇴행성 질환 증상완화와 치료에 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

## 2) *in vitro* 항산화 효능 평가

### (1) DPPH radical 소거능 평가

DPPH는 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로서 515-520nm 부근에서 최대 흡광도는 가지며 항산화활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주며 radical이 소거되고 탈색됨. 이러한 DPPH는 dioxane이나 CCL4와 같은 비극성 용매에서는 2차, 3차 산화 반응이 일어나기도 하나 DPPH의 질소 원자와 alcohol 간에는 수소 결합이 형성되기 때문에 alcohol 용액 내에서는 비교적 안정. Ascorbic acid와 682에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과 free radical 소거 활성은 나타나지 않았음.

### (2) NBT/XO (superoxide 소거작용) 측정

Xanthine oxidase에 의해 hypoxanthine을 uric acid로 전환 시키는 과정에서 생성되는 superoxide를 nitroblue tetrazolium(NBT)와 반응시켜 superoxide를 소거하는 작용으로서 항산화 능력을 측정. Xanthine oxidase 억제제로 알려진 allopurinol은 대조군에 비해 50%이상 감소 시킴. 그러나 682는 소거 활성을 나타내지 않음.

### (3) 환원력 평가

환원력은 시료 자체의 흡광도 수치로써 발색 정도가 높을수록 높은 환원력을 나타내며 특히 reductone의 존재와 관련이 있는데 이는 hydrogen 원자를 기부함으로써 free radical chain을 변환시키며 peroxide의 어떤 전구체와 반응하여 peroxide의 형성을 억제시킴. 또한 환원력은 반응계에 첨가되는 시료의 농도나 추출 용매의 종류 및 시료의 특성에 따라 상이함. 환원력은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있음. 그러므로 항산화 활성에 대한 중요한 인자로 작용함. 본 연구에서

는 환원력을 potassium ferricyanide 법을 사용하여 측정. 자유 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성의 결과와 마찬가지로 682의 총 폐놀 함량을 측정한 결과 환원력을 가지고 있지 않음을 확인.

#### (4) 총 폐놀 함량 측정

체내의 생체막에 존재하는 지질은 free radical과 반응하여 산화되는데 이는 생체 노화의 근원이 됨. 이러한 산화반응을 방지하기 위해 free radical scavenging을 이용하여 연쇄반응의 전과단계에서 peroxyradical 등과 탈수소반응을 통해 수소원자를 공여함으로써 radical이 비교적 안정한 상태로 유지되. 이러한 free radical scavenger를 항산화제라고 하는데 이중 대표적인 물질이 폐놀 화합물임. 폐놀 화합물의 주된 역할은 자유라디칼을 소거하는 것이라는 연구가 보고됨. 따라서 이러한 폐놀 화합물인 플라보노이드나 페놀산등의 총량인 총폐놀 함량은 DPPH radical 소거능으로 나타내는 항산화 활성에서는 중요한 인자로 작용하며 일반적으로 항산화 활성이 증가함에 따라 총폐놀 함량도 증가함.

682의 총 폐놀 함량을 측정한 결과 폐놀을 함유하고 있지 않음을 확인.

#### (5) 아질산염 소거능

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 질소 산화물(NO)은 세포 독성이 강하며 다량의 NO가 생성되면 nitroization, nitration 과 같은 간접적 효과 및 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타내게 됨. 특히 대식 세포가 활성화 되면서 생성되는 NO는 주위조직에 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있음. 그러나 NO의 반감기는 매우 짧기 때문에 실질적으로 또는 직접적으로 검출하는데 많은 어려움이 따름. 이 때문에 대부분의 NO의 측정을 위한 연구는 NOS 발현 유무나 NO의 안정화된 부산물인 nitrite, nitrate를 측정하는 간접적 방법으로 이루어짐. 본 연구에서는 nitric oxide 생성 저해 활성을 Griess 시약을 사용하여 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 아질산염의 양을 측정하는 방법으로 산출. 10, 50, 100, 500 $\mu$ g/ml 에서 시료의 아질산염 소거능은 각각 18, 36, 58, 95%를 나타냄.

#### (6) Superoxide dismutase 유사활성

항산화 효소중 하나인 superoxide dismutase (SOD)는 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전화시키는 반응을 촉매하는 효소임. SOD는 30KDa 이상의 분자량을 가진 단백질 물질로 체내에 쉽게 흡수되지 못하고 체외로 배출되며 열과 pH에 불안정함. 따라서 SOD와 유사한 활성을 가지며 SOD의 단점을 보완할 수 있는

유사활성 물질의 개발이 필요함. CS682의 superoxide 산화억제작용을 알아보기 위해 superoxide와 반응하여 갈변 물질을 만들어내는 pyrogallol 자동산화반응을 측정하여 SOD 유사활성을 측정. CS682의 Superoxide dismutase 유사활성을 측정한 결과 유사활성을 나타내지 않았음.

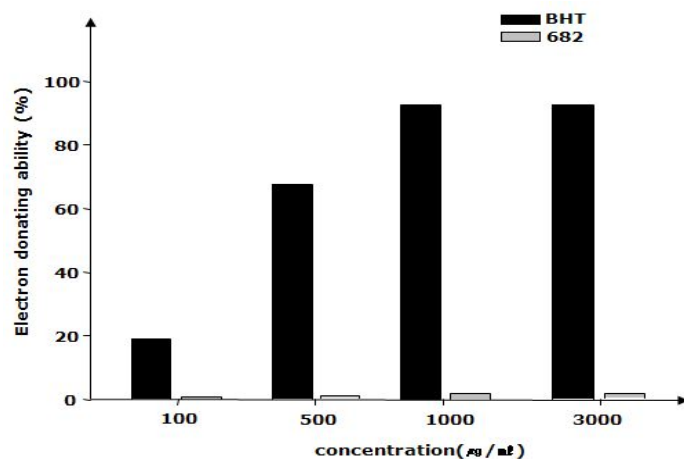


Fig. 15. Electron donating ability of 682

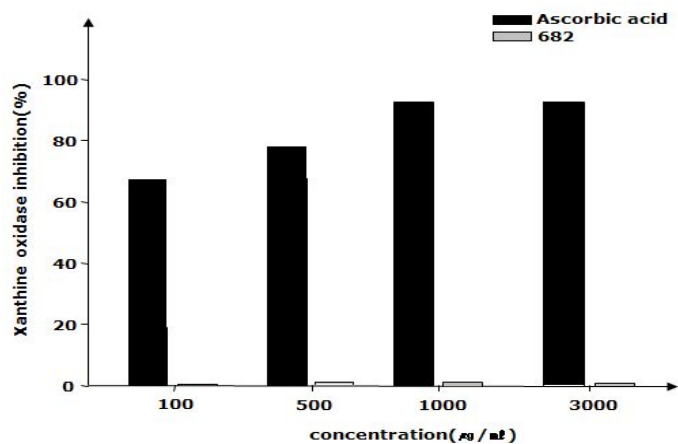


Fig. 16. Xanthine oxidase inhibition activity of 682

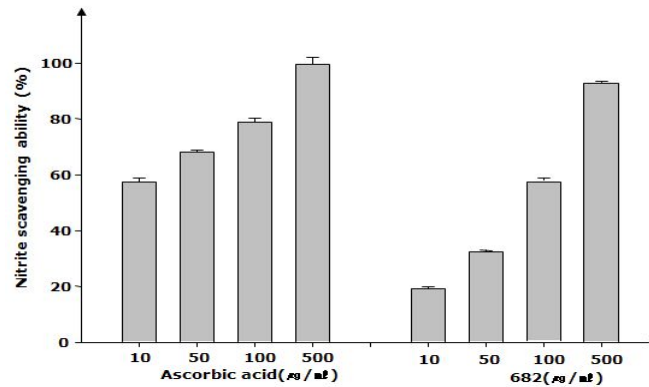


Fig.17. Nitrite scavenging activity of 682.

### 3) 항암효능 검증

#### (1) Nargenicin의 암세포 성장 억제 저해 활성 측정.

Nargenicin의 암세포 성장 억제 저해 활성 측정을 하기 위해 인간 유래 간암 세포주인 HepG2, 인간 유래 폐암 세포주인 Calu-6, 인간 유래 위암세포주 SNU-601, 마우스 유래 대장암세포 CT-26을 이용하여 다양한 농도로 CS682을 처리한 후 MTT assay를 이용하여 측정. 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300 µM의 농도로 각 세포에 처리하여 24시간 동안 처리한 MTT assay를 통하여 무처리한 대조군과 비교하여 활성을 확인함 (Fig.18). 그 결과 HepG2, Calu-6, SNU-601에서는 100 µM에서 각각 90%, 92%, 91%로 나타났으며 300µM 처리에도 생존율이 50%이하로 감소하지 않음을 나타내며 대체적으로 낮은 암세포 증식 억제 활성을 보임을 확인. 그러나 CT-26의 경우에는 50µM에서 81%, 100µM에서 61%로 생존율이 감소함을 나타내며 높은 암세포 증식 억제 활성을 확인할 수 있었음 (Fig. 18). 이와 같은 결과를 바탕으로 CT-26에 대한 Nargenicin의 항암 기작에 대한 실험을 진행. 동일한 조건하에서 세포의 손상 정도를 확인하기 위하여 CT-26의 배양액 중에 들어있는 LDH (lactate dehydrogenase)의 방출 양을 측정한 결과는 Fig. 19와 같음. 정상군에 비해 대조군은 약 50% 정도의 LDH 방출을 확인할 수 있는데 반해 Nargenicin을 각각 50, 100 µM 을 처리했을 때는 각각 6.2, 21.9%로 세포독성을 보임을 알 수 있었음. 따라서 nargenicin은 CT-26 세포에 대해 강력한 항암활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 19A.).

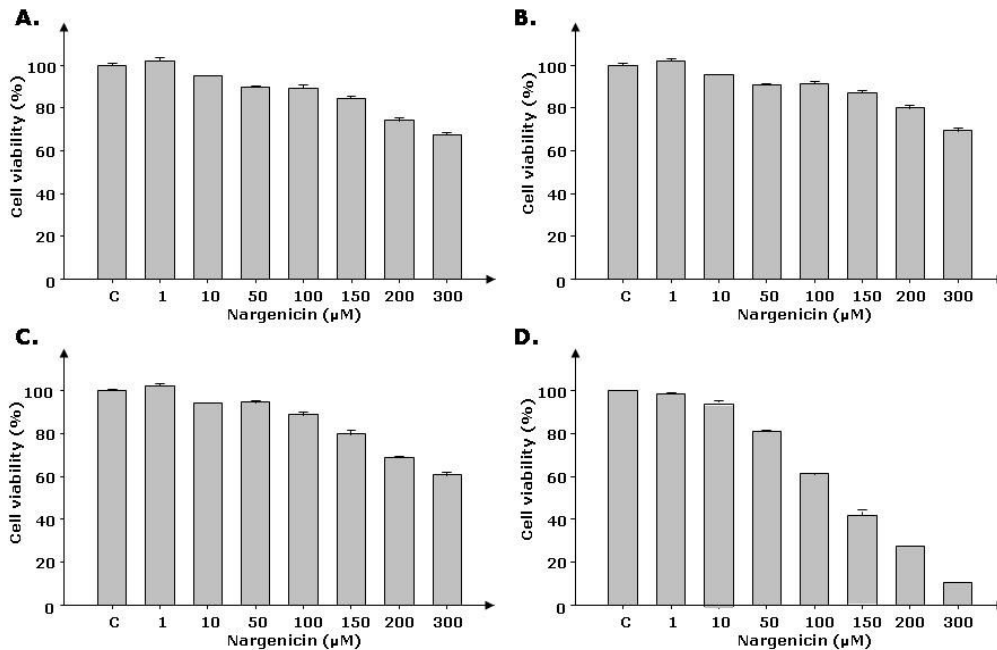


Fig. 18. Effect of nargenicin on cell viability of cancer cells. Cells were treated with various concentrations of nargenicin for 24 hrs, when the cell viability was determined by the MTT assay. A. HepG2; B. Calu-6; C. SNU-601; D. CT-26

(2) mitochondria membrane potential 과 핵의 형태변화에 대한 Nargenicin의 영향 Nargenicin처리에 의한 CT-26세포의 증식억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 nargenicin가 처리된 CT-26세포를 대상으로 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 Hoechst 33324를 이용하여 염색을 실시하고 형광 현미경을 이용하여 핵의 형태 변화를 관찰. Fig. 19B.에서 나타난 바와 같이 정상 세포의 핵은 타원형의 온전한 핵 모양을 나타냈지만 Nargenicin의 농도가 증가할수록 손상을 입은 세포의 핵은 condensation과 fragmentation으로 인한 apoptotic body가 핵 주변에 나타나는 전형적인 apoptosis 특징을 나타냄. 따라서 Nargenicin의 처리에 따른 CT-26세포의 증식억제가 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각된다. Nargenicin 처리에 의한 CT-26세포의 apoptosis 유발에 의해 mitochondria membrane potential변화를 측정하기 위해 rhodamine 123을 이용하여 염색하고 membrane potential의 변화를 관찰함. 무처리군의 membrane potential을 100%로 하였을 때 Nargenicin을 처리할 경우 농도가 증가할수록 감소하는 것을 확인할 수 있었음 (Fig.20).

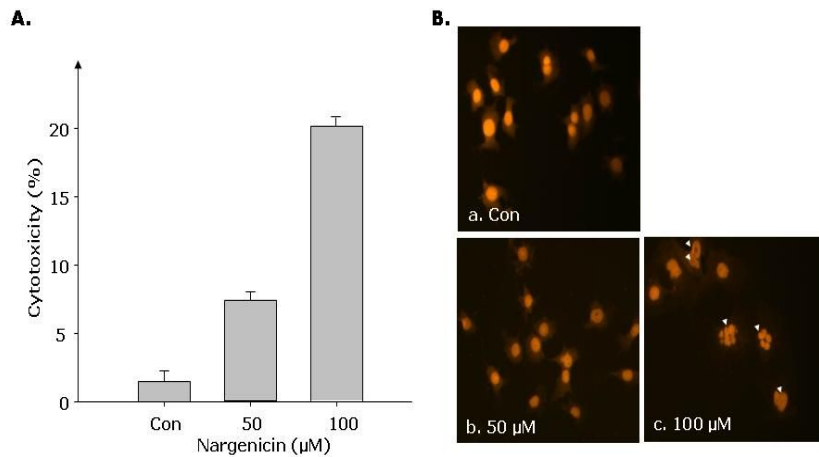


Fig. 19. Effect of Nargenicin on Cytotoxicity and nuclear morphology in CT-26 cells. Cells were treated with nargenicin for 24 hrs. (A) Cytotoxicity was determined by LDH assay. (B) Nuclei were detected using Hoechst staining for the measurement of nuclear condensation.

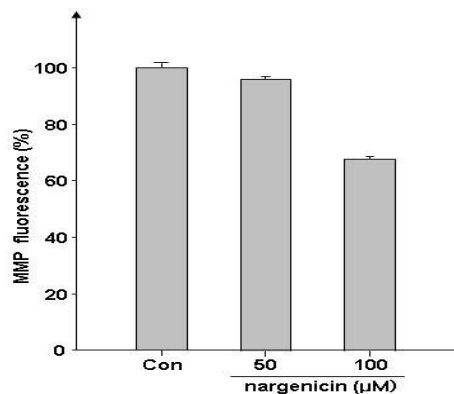


Fig. 20. Effect of nargenicin on mitochondria membrane potential in CT-26 cells. Cells were treated with nargenicin for 24 hrs. Mitochondria was stained using rhodamine 123 staining for the membrane potential.

### (3) Bcl-2 family의 발현에 미치는 nargenicin의 영향

nargenicin 처리에 의한 apoptosis 유발에 관한 기전을 분석하기 위해 apoptosis 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려진 Bcl-2 family의 발현에 미치는 nargenicin의 영향을 조사한 결과는 Fig. 21A와 같음. 결과에서 나타난 바와 같이 Bcl-2 family에 속하는 인자들 중, pro-apoptotic 인자에 속하는 Bax 발현 변화는 nargenicin 처리시에 농도가 증가할수록 발현이 증가하는 것으로 나타남. 그러나 anti-apoptotic 인자에 속하는 Bcl-2의 경우 발현이 농도가 증가할수록 발현이 감소하는 것으로 나

타남. 이상의 결과는 nargenicin 처리에 의한 apoptosis의 발생에 pro-apoptotic Bax의 증가에 따른 상대적인 anti-apoptotic 인자들의 발현 저하가 중요한 역할을 하고 있음을 의미.

(4) Caspases의 발현에 미치는 nargenicin의 영향

apoptosis 유발에서 가장 핵심적인 역할을 하는 caspases 중에서 가장 대표적인 caspase-3, -9의 발현에 미치는 nargenicin의 영향을 조사함. Fig. 21B에서 나타난 바와 같이 initiator caspase인 caspase-9의 경우는 nargenicin 처리에 따른 큰 변화가 관찰되지 않았지만 effector caspase로 알려진 caspase-3의 경우는 nargenicin의 처리에 따라 활성화형 단백질의 발현 증가가 관찰됨. nargenicin 처리에 따른 CT-26 세포의 apoptosis 유발에 있어서 caspase-3이 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었음.

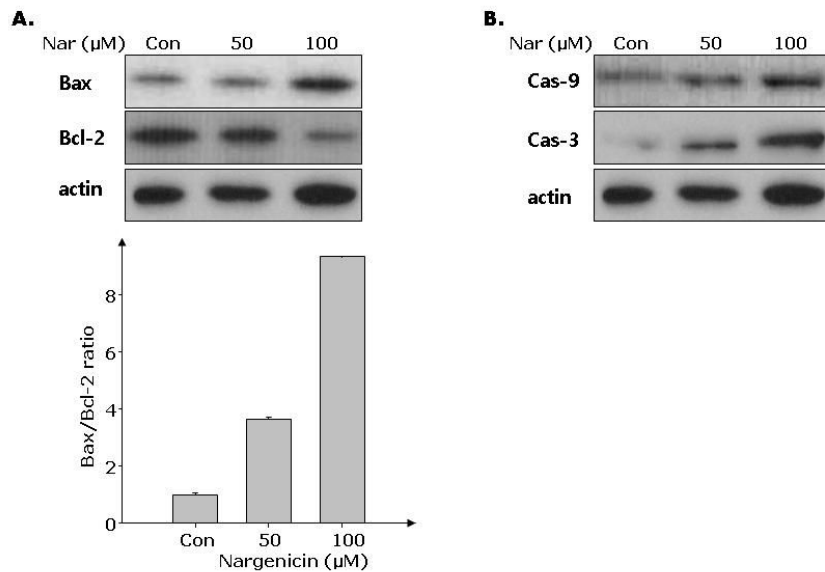


Fig. 21. Effect of Nargenicin on expressions of pro- and anti-apoptotic proteins in CT-26 cells. Cells were treated with nargenicin for 24 hrs. Anti-apoptotic proteins (Bcl-2) and pro-apoptotic proteins (Bax, Cas-9 and Cas-3) were monitored by Western blot.

(5) nargenicin에 의한 p53과 MAPK의 활성화.

p38와 JNK MAPK는 MAP kinase family를 이루는 효소로서 세포외부로부터의 자극에 대해 반응하는 신호 전달과정에서 중요한 역할을 함. p38와 JNK는 stress, heat shock, radiation 등과 같은 일련의 자극에 의해 활성화되어 염증반응,

apoptosis, 등 다양한 반응을 유도한다고 알려져 있음. 따라서 MAPK의 family에 속한 p38와 JNK의 활성을 western blot 분석을 통하여 조사한 결과는 Fig. 22와 같음. nargenicin에 의해 세포의 독성 유발 시 농도가 증가할수록 p38의 활성이 증가되는 것이 관찰되었으며 JNK 역시 그 활성이 증가함을 확인할 수 있었음. 이를 통해 nargenicin에 의한 apoptosis는 MAPK의 경로를 경유하여 유발됨을 알 수 있었음.

p53은 종양 억제 단백질로서 비정상적인 세포의 성장을 억제하고 세포내에서 여러 경로를 통해 조절인자로서의 역할을 하고 있음. DNA가 손상된 경우 p53이 활성화되어 apoptosis를 촉진하는 Bcl-2 family 인 Bax 의 발현을 증가시키고 Bcl-2의 발현을 감소시킴으로써 세포의 사멸을 유도. nargenicin에 의한 p53의 발현 양상을 조사해 본 결과, p53의 활성이 증가하였으며 nargenicin의 농도가 증가할수록 활성이 증가함을 확인할 수 있었음 (Fig. 22B.). 이 결과를 통해서 nargenicin이 p53을 활성화시키고 이를 통해 Bcl-2의 감소를 유발하여 apoptosis의 발생을 유발하는 것을 알 수 있었음.

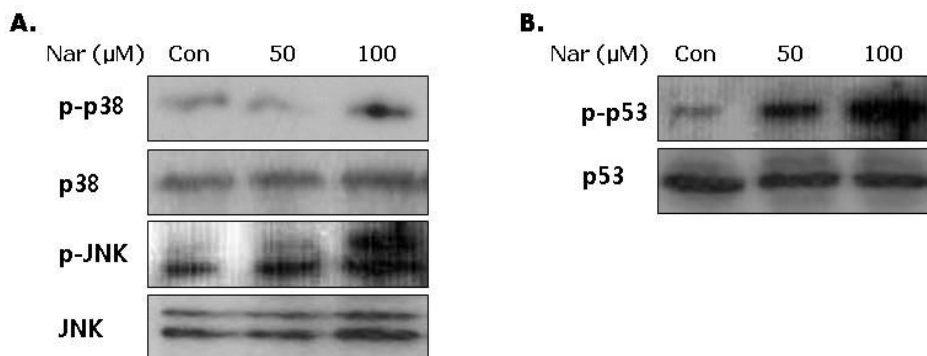


Fig. 22. Effect of Nargenicin on activation of JNK/p38 and up-regulation of p53 in CT-26 cells. Cells were treated with nargenicin for 1 hr. Cells were then lysed and subjected to Western blot analysis using the indicated primary antibodies.

#### 4) 면역증강효과검증

##### (1) hPBMC에 대한 세포독성

CS682의 세포에 대한 독성을 하기 위해 각 세포에 처리하여 24시간 동안 배양한



후, MTT assay에 의해 세포의 생존 정도를 확인함(Fig. 23). Raw 264.7의 세포에서는 0.5~20 $\mu$ M까지는 세포 생존율의 변화를 보이지 않았지만 30 $\mu$ M에서는 90%, 50 $\mu$ M에서는 81%의 생존율을 보임. hPBMC에서는 RAW264.7 보다 저농도에서 세포 생존율의 감소를 보임. 0.1~5 $\mu$ M까지는 세포 생존율의 변화를 보이지 않았지만 10 $\mu$ M에서는 82%, 20 $\mu$ M에서는 74%, 30 $\mu$ M에서는 60%의 세포 생존율을 보임. 따라서 본 실험에서는 세포의 생존에 거의 영향을 미치지 않는 농도, RAW 264.7은 20 $\mu$ M 이하, hPBMC는 5 $\mu$ M 이하의 농도를 처리하여 실험을 진행.

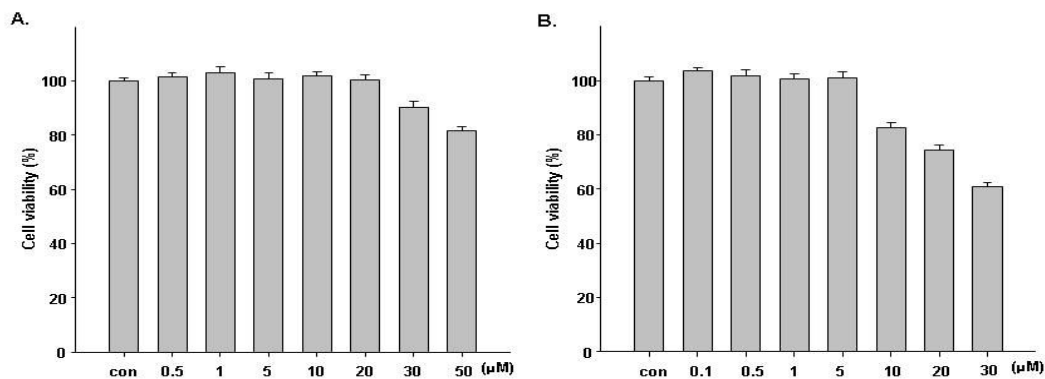


Fig. 23. Cell viability on (A) Raw 264.7 cells and (B) hPBMC following treatment of CS682. Cells were treated with various concentrations of CS682 for 24 h and Cell viability was measured using the MTT assay.

## (2) NO 생성에 미치는 효과

NO는 혈관확장, 신경전달, 혈소판응집억제, 염증반응의 매개 등 매우 다양한 기능을 갖고 있으며, 또한 체내로 침입한 미생물 및 암세포에 대한 직접적인 살상기능을 갖고 있는 것으로도 알려져 있음. NO에 의해 IL-2, IL-3 등의 cytokine 분비는 억제되며, TNF- $\alpha$ , IL-1 등의 생성은 촉진되는데, 이러한 작용에 의해 T 임파구 및 NK 세포 등의 기능이 조절된다는 등 NO가 생체 내에서 면역조절물질로서 작용한다는 것이 밝혀짐으로써 한층 그 중요성이 부각됨. NO는 주로 대식세포가 활성화되어 생성되는 바, 본 연구에서는 CS682에 의해 대식세포를 활성화하여 NO를 생성하게 하는지 조사함. Fig. 24에 나타난 바와 같이 농도 의존적으로 대식세포를 활성화시켜 NO의 양이 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군인 LPS를 첨가한 상태에서는 배양 24시간에 26.3  $\mu$ M의 nitrite를 생성하였으며, CS682은 5 $\mu$ M 농도에서 6 $\mu$ M, 10 $\mu$ M 농도에서 13 $\mu$ M, 20 $\mu$ M 농도에서 21 $\mu$ M의 nitrite를 생성. CS682의 농도 의존적으로 대식세포를 활성화시키는 것을 확인.

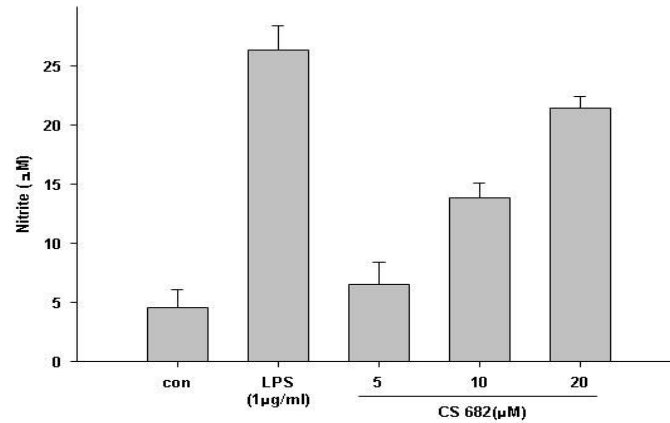


Fig. 24. Effects of CS682 on NO production in macrophages. RAW 264.7 cells were cultured for 24 h with the indicated concentrations of CS682 or with LPS (1 µg/ml). The level of NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture medium.

### (3) cytokine 분석

#### ① 염증성 cytokines의 생성에 미치는 영향

대식세포는 활성화되면 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등을 분비함. 이들은 모두 매우 다양한 기능들을 갖고 있으나, 특히 IL-1 $\beta$ 는 T 림프구의 증식을 유도하는 한편 암세포의 증식은 억제하는 활성을 갖고 있으며, IL-6는 B 림프구의 항체생성 세포인 plasma cell 분화를 유도하는 활성이 있으며, TNF- $\alpha$ 는 암세포의 살상 및 암 전이의 억제작용이 있다는 것이 밝혀짐. 따라서 이들 물질의 생성을 촉진하는 물질은 면역반응을 조절하는 작용과 함께 항암 기능까지도 가질 수 있을 것으로 추정할 수 있음.

이들 cytokines 생성에 미치는 효과를 측정하여, Fig. 25와 같은 결과를 얻음. Fig. 25A에 나타난 바와 같이 5 µM의 농도에서는 15.3pg/ml의 IL-1 $\beta$ 의 생성이 유도되었으나 10µM의 농도에서는 35.2pg/ml, 20 µg/ml의 농도에서는 91.8 pg/ml의 IL-1 $\beta$ 가 생성되었음을 나타내었음. 또 다른 cytokine인 TNF- $\alpha$  (Fig. 25B)의 경우에서도 IL-1 $\beta$ 에서의 결과와 유사하게 처리한 농도 증가에 따라 각각의 cytokines 생성량이 증가하는 것으로 나타남.

#### ② Th-1 cytokine (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )의 분비에 미치는 영향

본 연구에서는 CS682의 세포매개성 면역과 관련된 cytokine의 생산에 미치는 영향

을 알아보기 위하여 pro-inflammatory cytokine인 Th-1 type cytokine의 농도를 측정. 혈액에서 분리한 hPBMC에 CS682를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 분비된 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 의 양을 ELISA에 의하여 측정함. Fig. 26에 나타난 바와 같이 hPBMC에 CS682를 처리한 후 IL-2의 분비변화를 측정한 결과임. 0.1  $\mu$ M의 농도에서는 IL-2의 생성이 유도되지 않았으나 0.5 $\mu$ M의 농도에서는 5.8pg/ml, 1  $\mu$ g/ml의 농도에서는 7.4 pg/ml, 5  $\mu$ g/ml의 농도에서는 10.4 pg/ml의 IL-2가 생성되었음을 나타냄. 또한, IL-12의 분비도 농도가 증가할수록 전반적으로 증가함을 알 수 있었음.

hPBMC에 CS682를 처리한 후 IFN- $\gamma$ 의 분비여부를 측정한 결과, 측정농도의 범위에서 IFN- $\gamma$ 의 분비가 전반적으로 증가하였음. 특히 IL-2 및 IL-12의 분비를 크게 증가시키는 CS682 농도인 에서 IFN- $\gamma$ 의 분비도 크게 증가하는 것을 알 수 있었음. 이와 같은 결과는 IL-2는 NK 세포의 성장을 촉진시키며, IL-12는 T 세포나 NK 세포에 의하여 INF- $\gamma$ 를 생성하게 하는 강력한 유도체이며, INF- $\gamma$ 는 대식세포를 활성화하여 IL-12의 양을 증가시키는 사실을 뒷받침하고 있음.

### ③ Th-2 cytokine(IL-6, IL-10)의 분비에 미치는 영향

CS682에 의한 Th-1 type cytokine의 분비와 Th-2 type cytokine의 분비와의 관련성을 알아보기 위하여 hPBMC에 CS682를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 분비된 type 2 cytokine (IL-6, IL-8)의 양을 ELISA에 의하여 측정하였으며 측정 결과는 다음과 같음 (Fig. 27). 그 결과, Th-1 cytokine(IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ )의 분비를 증가시키는 농도에서도 IL-8의 분비는 CS682의 농도가 증가하여 약간 증가하거나 변화가 없는 것으로 나타남. 하지만 IL-6의 경우에는, 0.1, 0.5  $\mu$ M의 농도에서는 IL-6의 생성이 유도되지 않았으나 1 $\mu$ M의 농도에서는 392pg/ml, 5 $\mu$ M의 농도에서는 546pg/ml의 IL-6가 생성되었음을 Th-2 cytokine (IL-6, IL-10)은 anti-inflammatory cytokine 이며, 체액성 면역반응(humoral immunity)을 촉진함. Th-2 세포는 Th-2 type (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 등) cytokine을 분비하여 T-세포의 활성을 억제하면서 Th-1 type cytokine의 생산을 억제시킴. 따라서 Th-2 type cytokine의 감소는 항암면역기능의 활성화에 중요한 영향을 미칠 수 있음. 본 연구에서 CS682에 의한 Th-1 type cytokine 분비증가는 IL-6의 분비억제와 관련이 있을 것으로 추측됨.

### (4) iNOS 발현 분석

CS682에 의해 macrophage 내의 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인하였으며, 결과

는 Fig. 28와 같음. NO의 생성에는 NO synthase(NOS)라는 효소가 관여하며 이 효소는 L-arginine과 O<sub>2</sub>와 반응하여 citrulline과 NO를 생성함. NOS 중 iNOS는 감염, 사이토카인, 자외선 등에 의해 유도되며 NO를 생성하여 세균과 암세포 등을 죽이는 숙주방어 작용에 관여함. 이러한 iNOS의 발현 변화를 살펴본 결과, NO 생성 정도와 그 결과가 일치하여 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타남 (Fig. 28). 이렇게 발현된 iNOS는 NO 생성을 매개하며, 면역 기능에 도움을 줄 것으로 사료됨.

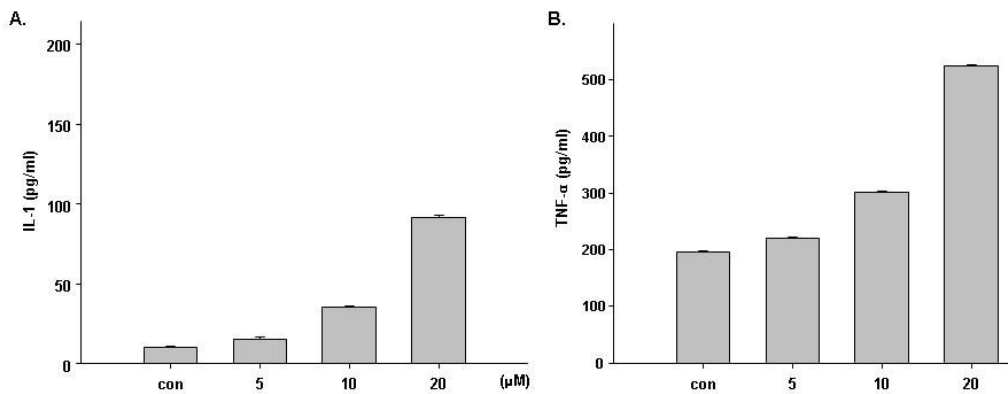


Fig. 25. Effects of CS682 on macrophage-related cytokine production in macrophages. RAW 264.7 cells were cultured for 24 h in the presence of media alone or with CS682. The amounts of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  released into the culture medium were measured by immunoassays.

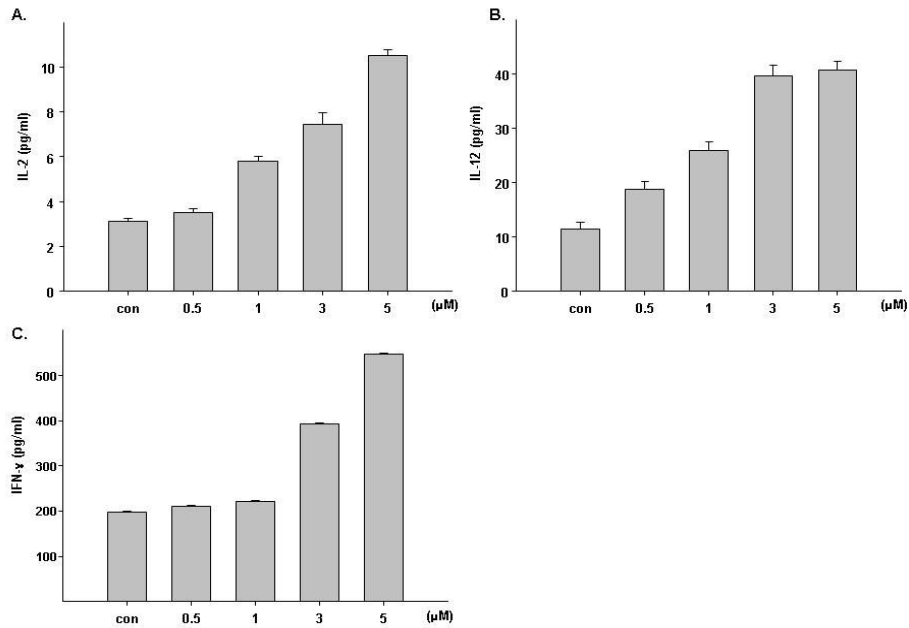


Fig. 26. Effect of CS682 on Th-1 cytokine secretion in hPBMC. Human PBMC were cultured for 24 h in the presence of media alone or with CS682. The amounts of IL-2, IL-12 and IFN- $\gamma$  released into the culture medium were measured by immunoassays.

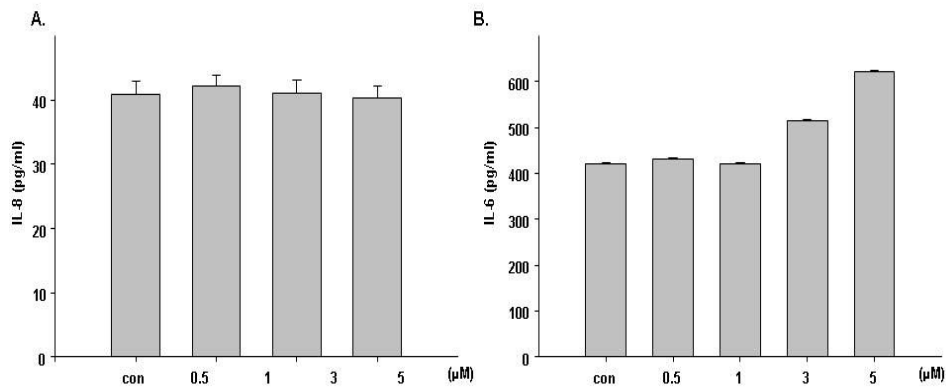


Fig. 27. Effect of CS682 on Th-2 cytokine secretion in hPBMC. Human PBMC were cultured for 24 h in the presence of media alone or with CS682. The amounts of IL-2, IL-12 and IFN- $\gamma$  released into the culture medium were measured by immunoassays.

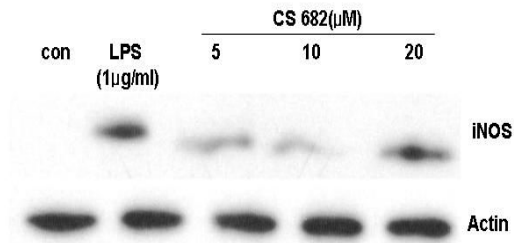


Fig. 28. Effect of CS682 on iNOS expression in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with CS682 for 24h. Cells were harvested and total protein was subjected to western blotting analyses using anti-iNOS antibody. Actin was used as an internal loading control.

## 5) 간세포 보호효과 검증

### (1) 세포 생존율 변화

CS682와 t-BHP에 의한 세포 생존율 변화를 측정하기 위해 다양한 농도로 세포에 처리한 후 세포 생존율 변화를 관찰. CS682의 경우, 30µM까지는 세포 생존율 변화가 나타나지 않았지만 그 이상의 농도에서는 급격하게 감소함을 확인할 수 있었음. t-BHP의 경우, 10µM부터 생존율이 감소하였으며, 70µM에서 50% 정도로 감소함을 확인할 수 있었음 (Fig. 29). t-BHP에 의한 세포 독성이 CS682 전처리에 의해 감소되는지 확인하기 위하여 CS682 전처리 후 t-BHP를 처리하여 MTT assay 방법으로 세포 생존율 변화를 비교. CS682를 2시간 간세포에 전 처리한 후 t-BHP 70µM를 24 시간 동안 처리. t-BHP를 단독 처리하였을 때, 약 50%의 세포생존율을 보였으나 CS682 전처리를 할 경우 농도 의존적으로 세포생존율이 회복되는 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 30).

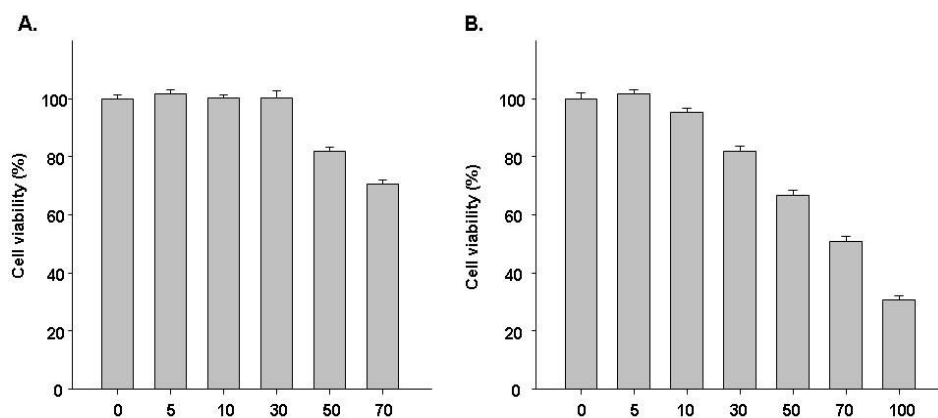


Fig. 29. Effect of (A) CS682 or (B) t-BHP on Cell viability in mouse hepatocyte. Cells were treated with various concentration CS682 or t-BHP for 24h. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay.

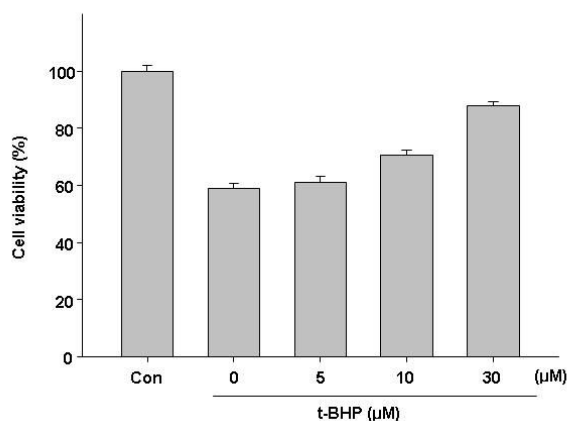


Fig. 30. Effect of CS682 on t-BHP-induced cell death in Mouse hepatocyte. Cells were pre-treated with CS682 for 2h and then treated 70μM. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay.

## (2) 세포독성 감소 효과

CS682의 전 처리에 의해 t-BHP에 의한 세포독성이 감소되는지를 확인하기 위하여 세포독성의 지표인 LDH의 발생량을 검사하였고, 간독성의 지표인 ALT의 양을 조사함 (Fig. 31). 그 결과, CS682 전 처리한 세포에서는 t-BHP만 단독으로 처리한 세포에 비해 t-BHP로 인한 LDH와 ALT의 발생량이 감소됨을 확인.

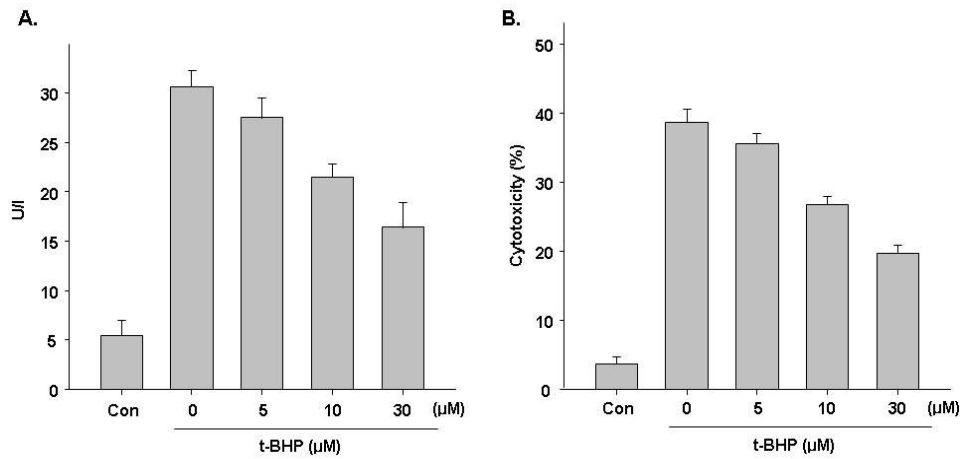


Fig. 31. Effect of CS682 on t-BHP-induced change of ALT and LDH level in Mouse hepatocyte. Cells were pre-treated with CS682 for 2h and then treated 70μM. After 24 h, ALT and LDH levels were measured in cultured media.

### (3) 활성산소 생성 조사

CS682을 전 처리한 후 t-BHP를 12시간 동안 처리한 후 DCFH-DA를 이용하여 세포내에 활성산소의 발생량을 측정 한 결과, t-BHP에 의해 유발되는 활성산소는 CS682 전 처리에 의해 감소되는 것을 알 수 있었음(Fig. 32).

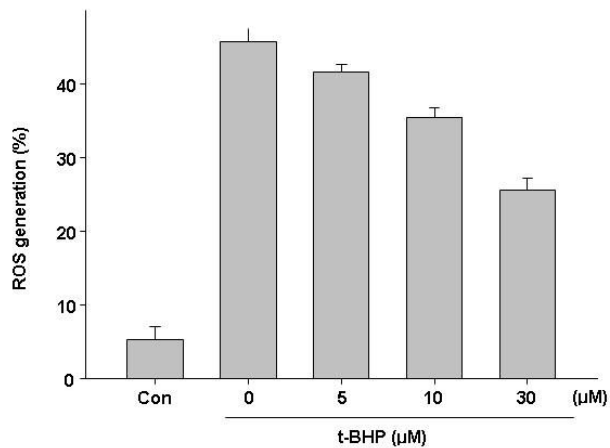


Fig. 32. Effect of CS682 on t-BHP-induced ROS generation in Mouse hepatocyte. Cells were pre-treated with CS682 for 2h and then treated 70μM. After 12 h, cells were incubated with DCF and analyzed by fluorescence plate reader to detect intracellular ROS levels



#### (4) heme-oxygenase-1 유전자의 발현 변화

Heme oxygenase-1 (HO-1)은 heme을 대사 시키는 효소로서 염증성 자극에 대한 반응으로 발현되고 항염작용이 있는 것으로 알려져 있음. 이러한 HO-1은 여러 가지 산화적 스트레스에 의해 증가됨. 본 연구에서는 t-BHP에 HO-1의 발현이 control과 비슷한 수준으로 보이지만, 이들 발현은 CS682의 전 처리에 의해 더욱 증가됨을 관찰함(Fig. 33).

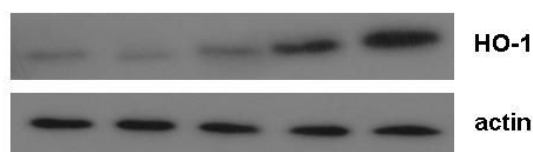


Fig. 32. Effect of CS682 on t-BHP-induced HO-1 expression in Mouse hepatocyte. Cells were pre-treated with CS682 for 2h and then treated 70 $\mu$ M. After 24 h, Cells were harvested and total protein was subjected to western blotting analyses using anti-HO-1 antibody. Actin was used as an internal loading control.

#### ○ 결과 요약

-CS682는 분화를 유도하고 또한, 분화 유도제인 ATRA나 1,25-(OH)2D3와 병행하여 처리하였을 때 분화유도의 증강에 효과적임.

→1,25-(OH)2D3와 함께 처리하면 monocyte/macrophage로 ATRA와 함께 처리하면 granulocyte로 백혈병 세포가 분화함

-CS682는 소교세포의 활성을 증가시키는 LPS에 의한 손상 (NO와 NO생성관 관련된 iNOS 발현, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성 감소)을 억제시킴

-CS682는 항산화 활성을 나타내지 않음.

-CS682는 대부분의 세포주에서는 항암활성을 나타내지 않았지만 폐암세포주에서 항암활성을 나타냄.

-CS682는 proinflammatory cytokine인 Th-1 type cytokine (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ )의 분비를 증가시켜 세포매개성면역반응 촉진, anti-inflammatory cytokine인 Th-2 cytokine (IL-6, IL8)의 분비를 억제시켜 체액성 면역반응을 억제시킴.

-CS682는 산화적 스트레스에 의한 간세포 손상에 대해 보호 효과(ALT, LDH 분비량 감소, 활성산소 생성 감소 및 HO-1의 발현량 증가)를 나타냄

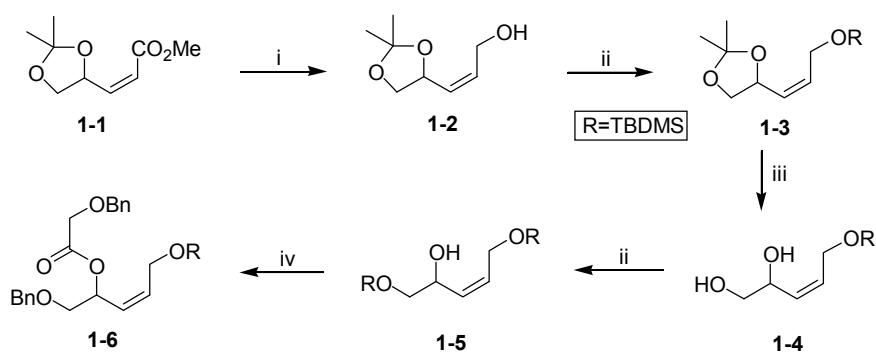
### 제3절 : 제3세부과제 (발효화합물의 유도체 합성)

연구 책임자 : 홍 준 희

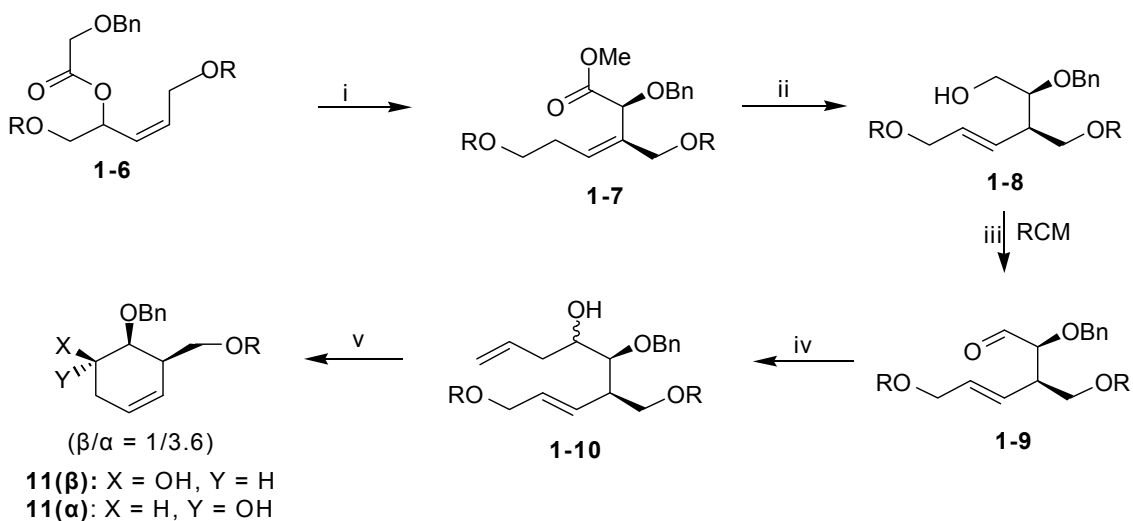
#### 1. Model study-1 (선택적 보호반응, 선택적 탈보호반응, 선택적 부가반응, 선택적 전위반응)

우수한 약효를 가진 CS682의 기본 골격을 크게 변화시키지 않고 hydroxy기의 화학적인 효과를 조금씩 바꿔 주기위하여 노출 하이드록시에 기에 i) deoxy당과 아울러 ii) 5원환의 heterocyclic ring을 축합, iii) 각종 ester 유도체를 축합으로 효능이 증가된 CS682의 유도체를 개발 하는 것이 본 연구의 최종목표임. 그중에서 단리하기 매우 어려운 CS682을 대상으로 직접 시행착오를 하기에는 경제적으로 뿐만 아니라 시간적으로 낭비라 판단되며 본연구의 1차년도 연구목표를 충실히 수행하기 위해서 model study를 통한 선택적 보호, 제거, ester화, 가수분해반응들에 대한 최적의 반응조건 연구를 수행하기 위해서 아래와 같은 상업적으로 구입하기 쉬운 D-mannitol을 출발물질로 하여 일련의 반응을 수행하였음. 특히 CS682의 유도체를 합성하는 반응 중에는 테옥시반응의 축합반응도 포함되어 있으며 이를 성공적으로 수행하기 위해서는 유사한 축합반응이 반드시 선행 연구되어야 한다고 판단됨.

먼저 Model 연구를 수행하기 위하여 이미 알려진 합성방법을 이용하여 상업적으로 구입하기 쉬운 D-Mannitol로부터  $\alpha,\beta$ -unsaturated methy ester 1-1을 합성하였음. 그리고 ester 1-1을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 용해시킨 후  $0^\circ\text{C}$ 에서 DIBALH를 처리하여 allylic alcohol 1-2를 합성함. 합성한 화합물 1-2를 imidazole, TBDMSCl로 처리하여 화합물 1-3을 높은 수율로 합성하였고, 이것을 70% acetic acid로 처리하여 선택적으로 가수 분해된 diol 1-4을 높은 수율로 합성함 (Scheme 1-1). 합성한 화합물 1-4을  $-10^\circ\text{C}$ 에서 TBDMSCl로 Selective mono-silylation시켜서 화합물 1-5을 합성하였고 이것을 시약 DCC와 DMAP로 처리하여 benzyloxymethy-protected allylic glycolate ester 1-6을 합성함. Allylic glycolate 1-6에 LiHMDS, TMSCl을 처리하여 Ireland's ester enolate claisen rearrangement반응을 시행하여  $\gamma,\delta$ -unsaturated controlled chair-like transition state로 통하여 crude acid를 합성하고 정제과정없이 이것에 직접 Triton-B,  $\text{CH}_3\text{I}$ 시약을 처리하여 높은 수율로 원하는 화합물 1-7를 합성함 (Scheme 1-2).



Scheme 1-1. Reagents: i) DIBALH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; ii) TBDMSCl, imidazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; iii) 70% acetic acid; iv) Benzyloxymethyl acetic acid, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



Scheme 1-2. Reagents: i) Benzyloxymethyl acetic acid; LiHMDS, Triton-B; ii) DIBALH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; iii) PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; iv) AllylicMgBr, THF; Grubbs (II), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

합성한 ester 1-7를 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 용해시킨 후  $-20^\circ\text{C}$ 에서 DIBAL-H을 처리하여 alcohol의 유도체 1-8을 합성하고 이어서 이것을 PCC로 oxidation하여 aldehyde 1-9를 합성함. Grignard부가반응을  $\alpha$ -chelation controlled carbonyl addition를 경로로 도입하여 부분입체이성질체인 divinyl 1-10를 높은 수율로 합성하였는데 이 단계에서는 Column으로 분리하기 어렵고 다음 반응단계에서 분리하였음. Diastereomeric mixture 12을 ring-closing metathesis 반응 (RCM)을 수행하기 위하여 Grubb's catalyst II를 사용하여 원하는 물질 1-11(a)와 원하지 않는 물질 1-11(b)을 각각 41%, 14%의 수율로 얻음. 이것을 즉시 Column Chromatography로 깨끗이 분리함. 이들에 대한 입체구조의 결정은 상대적으로 11-1(b)의 인접하는 hydrogen 사이의 NOE가 11-1(a)의 hydrogen사이보다 강함.

**(±)-(Z)-4,5-(O-Isopropylidene)-pent-2-en-1-ol (1-2):** 화합물 3 (6.5 g, 34.9 mmol)을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml)에 용해시키고 DIBAL-H (73.3 ml, 1.0 M solution in hexane)을 천천히 가한 후,  $-20^\circ\text{C}$ 에서 1시간 교반함. TLC로 반응종결을 확인한 후  $0^\circ\text{C}$ 에서 MeOH (35 ml)을 dropping시키고 상온으로 천천히 방치하여 고체를 석출함. EtOAc (200 ml)을 가하고 상온에서 2시간 교반한 후 여과. 여과액을 감압 농축하여 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:3)로 정제하여 무색 투명한 oil상의 화합물 1-2 (4.8 g, 87%)을 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  5.79-5.73 (m, 1H), 5.53-5.46 (m, 1H), 4.80 (dd,  $J = 14.4, 7.8$  Hz, 1H), 4.24 (dd,  $J = 13.5, 7.2$  Hz, 1H), 4.10 (dd,  $J = 12.6, 5.7$  Hz, 1H), 4.03 (dd,  $J = 7.8, 6.0$  Hz, 1H), 3.51 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 1.37 (s, 3H), 1.34 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  133.23, 129.41, 109.47, 71.87, 69.50, 58.50, 26.70, 25.86.

**(±)-(Z)-tert-Butyl-[3-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-yl)allyloxy]dimethylsilane (1-3):** 화합물 1-2 (4.5 g, 28.45 mmol)을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 ml)에 용해시키고 상온에서 imidazole (2.9 g, 42.67 mmol)을 넣고  $0^\circ\text{C}$ 에서 TBDMSCl (4.72 g, 31.29 mmol)을 가하고 상온에서 6시간 교반. TLC로 출발물질이 사라진 것을 확인한 후 포화  $\text{NaHCO}_3$ 용액 (10 ml)으로 반응을 종결함. 혼합액을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 와 물로 2-3회 추출하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 후 여과, 감압 농축하여 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:30)으로 정제하여 무색투명한 syrup상의 화합물 1-3 (6.74 g, 87%)를 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  5.88 (m, 1H), 5.71 (dd,  $J = 9.6, 8.4$  Hz, 1H), 4.99-4.89 (m, 2H), 4.14 (dd,  $J = 8.1, 6.3$  Hz, 1H), 4.05 (dd,  $J = 8.2, 6.4$  Hz, 1H), 3.60 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 1.44 (s, 3H),

1.41(s, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.21 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta$  133.56, 129.77, 110.03, 72.31, 68.51, 59.43, 27.21, 26.34, 25.21, 18.67, -5.35.

**(±)-(Z)-5-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-pent-3-ene-1,2-diol (1-4):** 화합물 1-3 (4.4 g, 16.15 mmol)을 70% Acetic acid (150 ml)에 용해시키고 상온에서 5시간 교반. TLC로 출발물질이 사라진 것을 확인한 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  (10 ml)으로 반응을 종결함. 혼합액을 EtOAc와 물로 2-3회 추출하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 후 여과, 감압 농축하여 그 잔사를 Column chromatography (EtOAc/hexane, 3:1)로 정제하여 무색투명한 oil상의 화합물 1-4 (2.51 g, 67%)을 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  5.81-5.67 (m, 2H), 5.07(dd, J = 12.3, 6.6 Hz, 1H), 4.83 (dd, J = 12.6, 5.7 Hz, 1H), 4.69 (m, 1H), 3.69-3.54 (m, 2H), 0.87 (s, 9H), 0.16 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  132.97, 128.58, 69.32, 67.45, 58.49, 25.21, 18.67, -5.35.

**(±)-(Z)-1,5-Bis-(tert-butyldimethylsilyloxy)-pent-3-en-2-ol (1-5):** 화합물 1-4 (11.15 g, 48.01 mmol)을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml)에 용해시키고 상온에서 imidazole (4.9 g, 72.0 mol)을 넣고  $-10^\circ\text{C}$ 에서 TBDMSCl (7.23 g, 52.8 mmol)을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 용해시켜서 천천히 가하고  $-10^\circ\text{C}$ 에서 30분간 교반시킨 후 같은 온도에서 1시간 더 교반. TLC로 출발물질이 다 사라진 것을 확인한 후 포화  $\text{NaHCO}_3$ 용액 (40 ml)으로 반응을 종결함. 혼합액을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 와 물로 2-3회 추출하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 후 여과, 감압 농축하여 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:7)로 정제하여 무색투명한 oil상의 화합물 1-5 (13.31 g, 80%)을 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  5.65-5.57 (m, 1H), 5.39-5.31 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.22-4.15 (m, 2H), 3.50 (dd, J = 9.9, 3.9 Hz, 1H), 3.36 (dd, J = 9.9, 8.1 Hz, 1H), 0.87 (s, 18H), 0.15 (s, 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  133.11, 128.99, 68.58, 66.77, 59.72, 25.91, 18.30, -5.23.

**(±)-(Z)-Benzyloxy-acetic acid 4-(tert-butyldimethylsilyloxy)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)-but-2-enyl ester (1-6):** 화합물 1-5 (5.69 g, 16.43 mmol)을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 ml)에 용해시킴. 여기에  $0^\circ\text{C}$ 에서 benzyloxyacetic acid (3.0 g, 18.05 mmol)를 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 용해시켜서 천천히 가하고 DCC (3.39 g, 18.85 mmol), DMAP (200 mg, 1.64 mmol)을 가함. 이 반응액을 상온에서 overnight시켰다. TLC로 반응종결을 확인한 후에 여과하고 그 여과액을 감압 농축하여 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:10)으로

정제하여 무색투명한 oil상의 화합물 **1-6** (6.58 g, 81%)을 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.41-7.30 (m, 5H), 5.94 (m, 1H), 5.75(m, 1H), 5.58 (dd,  $J = 10.8, 9.4$  Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.31 (dd,  $J = 8.6, 6.2$  Hz, 2H), 3.78-3.70 (m, 2H), 0.88 (s, 18H), 0.18 (s, 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  170.14, 138.24, 133.43, 130.21, 128.87, 128.42, 128.01, 78.12, 72.43, 69.06, 66.42, 58.53, 25.72, 18.54, -5.67.

**(±)-(2R,3S)-2-Benzoyloxy-3-tert-butyltrimethylsilyloxy-6-(tert-butyltrimethylsilyloxy)-hex-4-enoic acid methyl ester (1-7)**:  $-78^\circ\text{C}$ 에서 무수 THF (46.4 ml, 46.4 mmol)가 들어있는 flask에 1 M lithium bis(trimethylsilyl) amide을 천천히 가하고 10분 교반. 같은 온도에서 여기에 화합물 **8** (2.89 g, 5.84 mmol)을 THF에 희석하여 가하고 TMSCl/triethylamide (1/1, V/V, 15.2 ml)을 THF에 희석하여 가한 후 30분간 교반. 천천히 상온으로 방치하여 2시간 더 교반함. TLC로 출발물질이 다 사라진 것을 확인한 후  $0^\circ\text{C}$ 에서 1 N NaOH용액(100ml)을 가하여 반응을 종결함. 이 혼합액을 상온에서 10분간 교반한 후 2 N HCl로 PH 4~5 되게 조절함. 혼합액을 EtOAc와 물로 2-3회 추출하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 후 여과, 감압 농축하여 crude acid를 얻음. 이 crude acid를 무수 THF에 용해시킨 후 여기에 phenolphthalein 지시약을 5방울 정도 넣음. triton-B (40% in methanol)를 반응액이 보라색이 될 때까지 가하고 상온에서 1시간 교반. 1시간 후  $0^\circ\text{C}$ 에서  $\text{CH}_3\text{I}$  (1.44ml, 23.1mmol)를 천천히 가하고 이 반응액을 overnight시킴. TLC로 출발물질이 사라진 것을 확인한 후 hexane (100 ml)으로 희석한 다음 여과하여 여과액을 감압 농축. 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:20)으로 정제하여 무색투명한 oil상의 화합물 **1-7** (2.29 g, 77%)을 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.35-7.27 (m, 5H), 5.69 (m, 2H), 4.84 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.53-4.33 (m, 5H), 3.72 (s, 3H), 3.66 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.46 (dd,  $J = 9.6$  Hz, 8.6 Hz, 1H), 0.90 (s, 18H), 0.21 (s, 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  173.21, 138.72, 132.54, 128.40, 128.12, 127.15, 79.54, 70.12, 64.65, 52.33, 46.50, 25.34, 18.67, -5.37; Anal calc for  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Si}_2$ : C, 63.73; H, 9.51. Found: C, 63.64; H, 9.40.

**(±)-(2R,3S)-2-Benzoyloxy-3-tert-butyltrimethylsilyloxy-6-(tert-butyltrimethylsilyloxy)-hex-4-enol (1-8)**: 화합물 **1-7** (2.6 g, 5.11 mmol)을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 용해시키고  $-20^\circ\text{C}$ 에서 DIBALH (10.22 ml, 1.0 M solution in hexane)를 천천히 가한 후 같은 온도에서 2시간 교반. TLC로 출발물질이 다 사라진 것을 확인한 후

0°C에서 MeOH (10ml)을 가하고 상온에서 3시간 교반한 후 여과. 여과액을 감압 농축하여 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:20)으로 정제하여 무색투명한 oil상의 화합물 **1-8** (2.18 g, 89%)을 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.29-7.19 (m, 5H), 5.64 (m, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.69-3.50 (m, 7H), 2.61 (m, 1H), 0.84 (s, 18H), 0.19 (s, 12H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 138.33, 132.14, 128.30, 127.78, 127.59, 127.54, 79.60, 72.36, 70.43, 63.61, 62.17, 44.55, 25.89, 18.34, -5.18.

**(±)-(2R,3S)-2-Benzoyloxy-3-tert-butyl-dimethylsilyloxy-6-(tert-butyl-dimethylsilyloxy)-hex-4-enal (1-9)**: 화합물 **1-7** (6.92 g, 14.4 mmol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 ml)에 용해시키고 상온에서 4Å MS (8.4 g)을 재빨리 넣은 후, overnight시킴. TLC로 출발물질이 사라진 것을 확인한 후에 diethyl ether (500 ml)을 넣고 2시간 교반. 혼합액을 silica gel을 사용하여 여과한 후 감압 농축하고 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:30)으로 정제하여 무색투명한 oil상의 화합물 **1-9** (5.79 g, 84%)을 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 9.62 (s, 1H), 7.32-7.18 (m, 5H), 5.62 (m, 2H), 4.68 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 3.79-3.77 (m, 2H), 3.63 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 2.96-2.87 (m, 1H), 0.85 (s, 18H), 0.09 (s, 12H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 203.29, 138.02, 132.83, 128.63, 128.04, 127.64, 126.97, 84.24, 73.24, 68.89, 63.28, 45.60, 25.90, 18.37, 5.19.

**(±)-(4S,5R,6S)-5-Benzoyloxy-9-(tert-butyl-dimethylsilyloxy)-6-(tert-butyl-dimethyl-silyloxy-methyl)-nona-1,7-dien-4-ol** and **(±)-(4R,5R,6S)-5-Benzoyloxy-9-(tert-butyl-dimethyl-silyloxy)-6-(tert-butyl-dimethylsilyloxy-methyl)-nona-1,7-dien-4-ol (1-10)**: 화합물 **1-9** (2.83 g, 5.93 mmol)을 무수 THF에 용해하고 -78°C에서 allyl magnesium bromide (7.0 ml, 1 M solution in THF)을 천천히 가하고 같은 온도에서 2시간 교반. TLC로 출발물질이 사라진 것을 확인한 후에 포화 NH<sub>4</sub>Cl (60 ml)으로 반응을 종결함. 혼합액을 EtOAc와 물로 2-3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축한 다음 그 잔사를 Column chromatography (EtOAc/hexane, 1:20)으로 정제하여 무색투명한 oil상의 화합물 **1-10** (2.16 g, 70%)를 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.30-7.20 (m, 5H), 5.68-5.61 (m, 2H), 5.09-5.02 (m, 2H), 4.56 (dd, J = 19.2, 11.4 Hz, 2H), 4.08 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 3.74-3.66 (m, 2H), 3.55-3.48 (m, 2H), 2.76-2.69 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 0.84 (s, 18H), 0.10 (s, 12H); <sup>13</sup>C



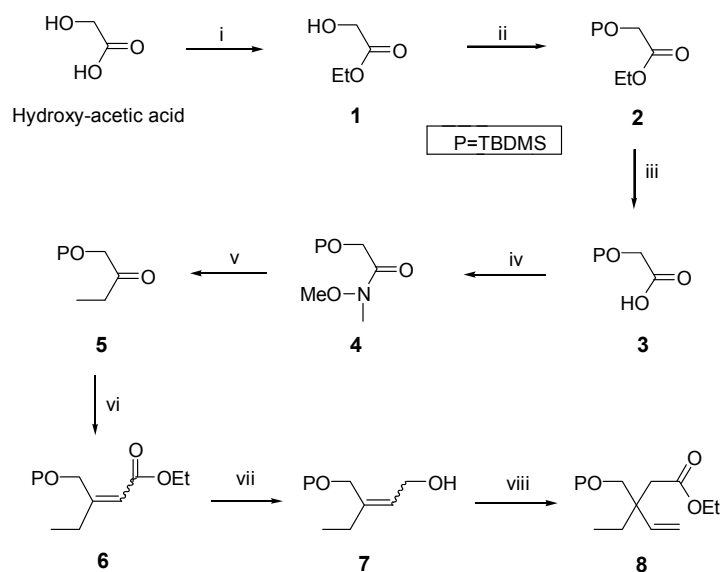
NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  138.58, 131.53, 128.96, 128.38, 128.30, 127.68, 127.57, 117.41, 83.07, 73.29, 70.36, 63.65, 46.75, 37.27, 25.94, 18.37, 5.17.

( $\pm$ )-(1S,5R,6S)-6-Benzoyloxy-5-(tert-butyltrimethylsilyloxy)methyl)cyclohex-3-enol (1-11 $\beta$ ); and ( $\pm$ )-(1R,5R,6S)-6-Benzoyloxy-5-(tert-butyltrimethylsilyloxy)methyl)cyclohex-3-enol (1-11 $\alpha$ ): 화합물 1-10 (3.60 g, 6.62 mmol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml)에 용해하고 상온에서 Grubb's catalyst II (42 mg, 0.049 mmol)을 재빨리 가함. 온도를 60°C 까지 올리고 overnight 시킴. TLC로 반응종결을 확인한 후에 감압 농축하여 그 잔사를 column chromatograph (EtOAc/hexane, 1:25)으로 정제하여 cyclopentenol의 유도체 1-11 $\beta$  (337 mg, 14%)와 1-11 $\alpha$  (989 mg, 41%)을 각각 얻음. Spectra for 1-11 $\beta$ : <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  7.36-7.25 (m, 5H), 5.86-5.57 (m, 2H), 4.61(d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.68 (dd, J = 7.5, 2.1Hz, 1H), 3.59-3.48 (m, 2H), 2.67-2.63 (m, 1H), 2.34 (m, 2H), 2.21 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 0.87 (s, 9H), 0.11 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  138.35, 128.43, 127.91, 127.68, 127.12, 126.72, 77.36, 73.08, 70.38, 66.12, 38.82, 31.40, 25.87, 18.40, -5.26;

Spectra for 1-11 $\alpha$ : <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  7.34-7.24 (m, 5H), 5.66-5.53 (m, 3H), 4.68 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.59-3.49 (m, 3H), 2.48 (m, 2H), 2.19-2.15 (m, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.08 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  138.10, 128.67, 128.55, 127.80, 127.86, 124.87, 81.48, 73.25, 70.67, 70.29, 43.75, 29.70, 25.65, 18.48, 5.41.

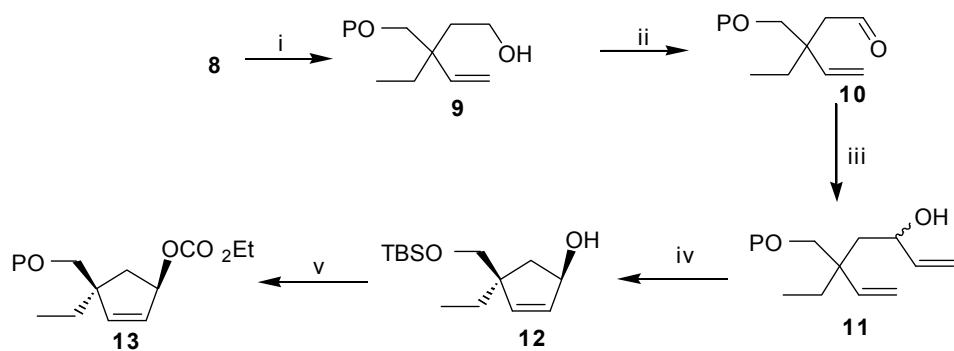
## 2. 4-lipophilic pocket-2,3-dideoxycarbasugar의 합성 및 CS-682와의 coupling

Schem 1에서 본 것과 같이 hydroxy-acetic acid를 출발물질로 하여 ethanol로 ester화 시켜서 ester 1을 합성. TBDMSCI과 imidazole을 사용하여 ester 1로부터 화합물 2를 합성하였고 다시 화합물 2를 가수분해 시켜서 acid 3을 합성. DCC, N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride, DMAP를 사용하여 Weinreb amide 4를 합성. Weinreb amide 4에 ethyl magnesium bromide를 시약으로 Grignard 반응<sup>22</sup>을 수행하여 화합물 5를 합성.



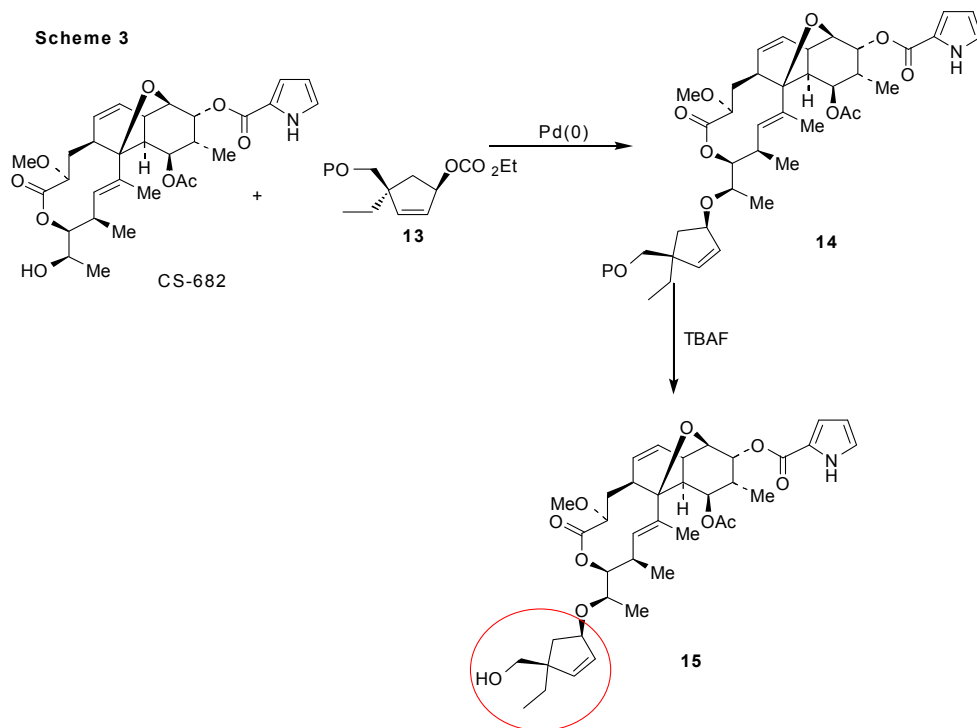
Schem 1. Reagents: i)  $c\text{-H}_2\text{SO}_4$ , EtOH,  $80^\circ\text{C}$  over night; ii) TBDMSCl, imidazole,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; iii) KOH, EtOH, rt, 1h; iv) DCC, N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride, DMAP, rt, overnight; v) ethyl magnesium bromide, THF,  $0^\circ\text{C}$ , 4h; vi) NaH, triethylphosphonoacetate, 1h; vii) DIBAL-H,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; viii) triethylorthoacetate, propionic acid,  $140^\circ\text{C}$ , overnight.

NaH, triethylorthoacetate를 사용하여  $\alpha,\beta$ -unsaturated ester **6**을 합성하였고  $0^\circ\text{C}$ 에서 DIBAL-H로 처리하여 ester **6**으로부터 alcohol derivative **7**을 합성. 그리고 Claisen rearrangement를 이용하여  $\gamma,\delta$ -unsaturated ester **8**을 합성. Ester **8**을 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 용해시킨 후  $0^\circ\text{C}$ 에서 DIBAL-H로 처리하여 alcohol derivative **9**를 합성. 합성한 화합물 **9**를 PCC로 oxidation하여 aldehyde **10**을 합성. Aldehyde **10**에 vinyl magnesium bromide을 시약으로 Grignard 반응을 수행하여 화합물 **11**을 합성. Ring-closing metathesis (RCM) 반응을 수행하기 위해서 Grubbs' catalyst II  $[(\text{Im})\text{Cl}_2\text{PCy}_3\text{RuCHPh}]$ 을 사용하여 cyclopentenol **12**를 합성. cyclopentenol **12**에 CS-682을 축합하기 위해서 먼저 cyclopentenol **12**를 ethyl chloroformate와 촉매량의 DMAP으로 반응시켜 ethoxycarbonyl derivative **13**를 합성.



**Scheme 2.** Reagents: i) DIBAL-H, MC, 0°C, 1h; ii) PCC, 4ÅMS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 4h; iii) vinyl magnesium bromide, THF, -78°C, 2h; iv) Grubbs' catalyst II, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 60°C, overnight; v) ethylchloroformate, pyridine.

Scheme 3에 보인바와 같이 합성된 4-liphophilic group을 가진 13번화합물과 CS-682와 Pd(0) 축합조건에서 조건에서 축합 화합물 14를 확보함. 최종 목적하는 화합물을 확보하기 위해서 silyl로 보호된 OH기를 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)를 처리하여 desilylation된 화합물 15를 얻음.



## 실험

시약 및 기기 - 본 실험에 사용된 시약들은 Aldrich 社, Sigma 社, Tokyo Kasei 社, 및 Fluka 社 에서 구입한 특급과 일급시약을 사용하였으며 silica gel (230-400

mesh)은 Merck사 제품을 사용하였고, 용매는 필요에 따라 정제하여 사용함. Thin layer chromatography (TLC)는 Kieselgel F254(0.25 mm)를 바른 유리판을 잘라 이용하였으며 TLC spot은 자외선램프 UVGL-58과 Anisaldehyde, KMnO<sub>4</sub> 발색 시약을 사용함. 융점 측정은 Gallen-Kamp melting point apparatus를 사용하였으며, 이에 대한 보정은 하지 않음. NMR spectra는 tetramethylsilane (TMS)를 내부 표준 물질로 하여 FT-300 MHz를 사용함.

**Hydroxyl-acetic acid ethyl ester (1).** Hydroxy-acetic acid (20 g, 0.2630 mol)를 EtOH (120 ml)에 용해하고 c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5.2 ml)을 가한 후, 80°C에서 overnight시킴. TLC로 반응종결을 확인한 후 감압 농축하고 EtOAc와 물로 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 :1)로 정제하여 oil상의 compound 1 (15.3 g, 56%)을 얻음.

**(tert-Butyldimethylsilyloxy)-acetic acid ethyl ester (2).** Compound 1 (15.4 g, 0.15 mol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 ml)에 용해하고 imidazole (30.3 g, 0.45 mol)을 재빨리 넣음. 0°C에서 TBDMSCl (24.5 g, 0.16 mol)을 천천히 가한 후 상온에서 3시간 교반. TLC로 반응종결을 확인한 후 감압 농축하고 혼합액을 ethyl acetate와 물로 2-3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 10) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound 2 (30.7 g, 95%)를 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 4.12 (s, 2H), 4.10 (d, J=6.9, 2H), 1.19 (d, J=7.5 Hz, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δ 171.69, 61.80, 60.6, 25.69, 18.35, 14.12, -5.50.

**(tert-Butyldimethylsilyloxy)-acetic acid (3).** Compound 2 (7.9 g, 36.0 mmol)을 무수 EtOH (65 ml)에 용해하고 KOH 85% (3.1 g, 4.7 mmol)을 EtOH (5 ml)에 녹여서 천천히 부가함. 상온에서 1시간 교반. TLC로 반응종결을 확인한 후 혼합액을 ethyl acetate와 물로 2-3회 추출하고 물층을 1N HCl로 산성화(PH = 3~4)시킴. Ethyl acetate와 물로 2-3회 추출하고 유기층을 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 1) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound 3 (4.8 g, 70%)을 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 5.01 (s, 1H), 3.91 (s, 2H), 0.67 (s, 9H), 0.18 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δ 171.91, 64.60, 25.72, 18.357, -5.52.

**2-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-N-methoxy-N-methyl-acetamide (4).** Compound **3** (4.0 g, 18.1 mmol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml)에 용해하고 N,O-dimethyl hydroxylamide hydrochloride (2.1 g, 21.5 mmol), DMAP (0.4 g, 3.6 mmol), TEA (3.0 ml, 21.7 mmol)를 부가함. 0°C에서 DCC (4.5 g, 21.7 mmol)을 재빨리 가한 후 상온에서 overnight 시킴. TLC로 반응종결을 확인한 후 여과, 감압 농축하고 혼합액을 ethyl acetate와 물로 2-3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 5) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **4** (2.2 g, 52%)를 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 4.30 (s, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.19 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δ 171.63, 60.56, 52.63, 31.67, 25.02, 17.72, -5.75.

**1-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-butan-2-one (5).** Compound **4** (5.1 g, 21.7 mmol)을 무수 THF에 용해하고 0°C에서 vinyl magnesium bromide (32.6 mL, 1.0 M solution in THF)을 천천히 가하고 0°C에서 4시간 교반. TLC로 반응종결을 확인한 후 포화 NH<sub>4</sub>Cl (33mL)으로 반응을 종결함. 혼합액을 ethyl acetate와 물로 2-3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 5) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **5** (3.8 g, 87%)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 4.04 (d, J=6.9 Hz, 2H), 2.45 (dd, J=14.7 7.2 Hz, 2H), 0.97 (t, J=7.5 Hz, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δ 21.79, 68.10, 60.34, 25.71, 18.71, 14.25, -5.59.

**3-(tert-Butyldimethylsilyloxymethyl)-pent-2-enoic acid ethyl ester (6).** NaH (0.9 g, 21.7 mmol)를 무수 THF (60 ml) 에 현탁시킴. 0°C에서 triethylphosphonoacetate (4.3 ml, 21.7 mmol)를 천천히 넣고 30분간 교반. 같은 온도에서 compound **5** (3.7 g, 18.1 mmol)를 천천히 넣고 상온에서 1시간 교반. TLC로 반응종결을 확인한 후에 감압 농축하고 혼합액을 ethyl acetate와 물로 2-3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 30) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **6** (4.7 g, 96%)을 얻음. Cis/trans 혼합물로서: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 5.85 (s, 1H), 4.08 (d, J=5.7 Hz, 2H), 4.04 (s, 1H), 2.45 (q, J=7.5 Hz, 2H), 1.22 (t, J=6.6 Hz, 3H), 1.02 (t, J=6.3 Hz, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.04 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δ 211.85, 130.86, 112.72, 65.43, 59.54, 25.75, 22.61, 18.37,

13.36, 7.18, -5.54.

**(E) and (Z)-3-(tert-Butyldimethylsilyloxymethyl)-pent-2-en-1-ol (7).** Compound **6** (4.9 g, 18.0 mmol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60mL)에 용해시키고 0°C에서 DIBAL-H (37.8 mL, 1.0 M solution in hexane)을 천천히 가한 후 같은 온도에서 2시간 교반. TLC로 반응 종결을 확인한 후 0°C에서 methanol (40 mL)을 천천히 dropping시키고 상온으로 천천히 방치하여 고체를 석출시킴. Magnetic bar이 도는 것을 확인하고 ethyl acetate (300 mL)을 넣고 상온에서 2시간 교반한 후 여과. 여과액을 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 10) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **7** (3.8 g, 91%)을 얻음. Cis/trans 혼합물로서: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 5.48 (d, J=6.9 Hz, 1H), 4.10 (d, J=10.2 Hz, 4H), 0.96 (t, J=3 Hz), 2.01 (dd, J=14.7 2H), 0.97 (t, J=7.5 Hz, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H).

**(±)-3-(tert-Butyldimethylsilyloxymethyl)-3-ethyl-pent-4-enoic acid ethyl ester (8).** Compound **7** (3.1 g, 13.6 mmol)을 triethyl orthoacetate (30 mL)에 용해하고 propionic acid (1.0 mL)을 가한 후, Claisen apparatus에 연결하고 140°C에서 overnight시킴. TLC로 반응종결을 확인한 후에 감압 농축하고 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 20) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **8** (3.5 g, 86%)을 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 7.20 (dd, J=14.1, 7.5 Hz, 1H), 4.59 (q, J=6.9 Hz, 2H), 2.29(dd, J=15.0, 7.5 Hz, 2H), 2.04(q, J=7.5 2H), 1.09 (t, J=7.5 3H), 0.96 (t, J=7.5 3H), 0.84 (s, 9H), 0.01 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δ 174.44, 146.29, 118.61, 65.52, 60.60, 27.57, 25.84, 21.18, 18.35, 13.62, 9.10, -5.42.

**(±)-3-(tert-Butyldimethylsilyloxymethyl)-3-ethyl-pent-4-en-1-ol (9).** Compound **8** (3.3 g, 11.0 mmol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30mL)에 용해시키고 0°C에서 DIBAL-H (23.1 mL, 1.0 M solution in hexane)을 천천히 가한 후 같은 온도에서 2시간 교반. TLC로 반응 종결을 확인한 후 0°C에서 methanol (25 mL)을 천천히 dropping시키고 상온으로 천천히 방치하여 고체를 석출시킴. Magnetic bar이 도는 것을 확인하고 ethyl acetate (300 mL)을 넣고 상온에서 2시간 교반한 후 여과. 여과액을 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 10) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **9** (2.5 g, 89%)를 얻음. <sup>1</sup>H

NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz)  $\delta$  5.57 (q, J=4.6 Hz, 2H), 5.48 (dd, J=13.2, 6.6 Hz, 2H), 4.11 (d, J=9.6 Hz, 1H) 4.01 (s, 1H), 1.98 (q, J=7.5 Hz, 2H), 0.98 (t, J=7.2 Hz, 3H), 0.84 (s, 9H), 0.04 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz)  $\delta$  143.86, 122.377, 65.69, 61.29, 27.77, 25.82, 21.04, 18.34, 13.72, 12.36, -5.42.

**(±)-3-(tert-Butyldimethylsilyloxymethyl)-3-ethyl-pent-4-enal (10).**

Compound **9** (1.8 g, 7.1 mmol)를 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30mL)에 용해시키고 상온에서 4 Å MS (2.4 g)을 재빨리 넣은 후, 0°C에서 PCC (3.8 g, 17.8 mmol)을 가하고 상온에서 4시간 교반. TLC로 반응 종결을 확인한 후에 ether (500 mL)을 넣고 2시간 교반. 혼합액을 silica gel을 사용하여 여과한 후, 감압 농축하고 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 50) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **10** (1.6 g, 86%)을 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz)  $\delta$  9.99 (t, J=8.4 Hz, 1H), 0.67 (d, J=2.1 Hz, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.45 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.08 (q, J=5.4 Hz, 2H), 0.83 (s, 9H), 0.04 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz)  $\delta$  196.73, 170.54, 123.54, 68.21, 46.88, 25.82, 21.04, 18.32, 13.38, 12.33, -5.50.

**(±)-5-(tert-Butyldimethylsilyloxymethyl)-5-ethyl-hepta-1,6-dien-3-ol (11).**

Compound **10** (1.4 g, 5.3 mmol)을 무수 THF (20 mL)에 용해하고 -78 °C에서 vinyl magnesium bromide (5.8 mL, 1.0 M solution in THF)을 천천히 가함. 2시간 후에 TLC로 출발 물질이 사라진 것을 확인한 후에 포화 NH<sub>4</sub>Cl (6mL)으로 반응을 종결함. 혼합액을 ethyl acetate와 물로 2-3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 20) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의 compound **11** (1.3 g, 85%)을 얻음. Diastereomeric mixture 로서 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz)  $\delta$  5.84-5.73 (m, 1H), 5.60-5.50 (m, 1H), 5.18-4.85 (m, 4H), 4.15 (s, 1H), 3.92 (d, J=2.1 Hz, 1H), 3.46 (s, 2H), 1.67-1.28 (m, 4H), 0.81 (s, 9H), 0.69 (d, J=7.2 Hz, 3H), 0.04 (s, 6H).

**(±)-(1S,4S)-(tert-Butyldimethylsilyloxymethyl)-4-ethylcyclopent-2-eno**

**l (12).** Compound **11** (1.5 g, 5.2 mmol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10 mL)에 용해하고 상온에서 Grubbs' catalyst II (30 mg, 0.03 mmol)을 재빨리 가함. 온도를 100°C까지 올리고 12시간 reflux시킴. TLC로 반응 종결을 확인한 후에 감압농축하고 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 20) 으로 정제하여 무색투명한 oil상의

cyclopentenol 유도체 **12** (547 mg, 41%) 얻음. Cyclopentenol **12** ( $\alpha$ -isomer):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  5.83 (dd,  $J=5.4, 2.4$  Hz, 1H), 5.45 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 4.54-4.47 (m, 1H), 3.40 (dd,  $J=12.9, 3.3$  Hz, 3H), 1.93 (dd,  $J=14.1, 7.2$  Hz, 1H), 1.54 (d,  $J=14.1$  Hz, 1H), 1.33 (q,  $J=7.5$  Hz, 2H), 0.82 (s, 9H), 0.77 (t,  $J=7.5$  Hz, 3H), 0.01 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta$  141.50, 133.02, 77.61, 70.64, 50.94, 44.83, 25.83, 24.67, 21.04, 12.33, -5.50.

( $\pm$ )-(1R,4S)-Carbonic acid 4-(tert-butyl dimethylsilyloxy methyl)-4-ethyl-cyclopent-2-enyl ester ethyl ester (**13**). Compound **12** (763 mg, 3.0 mmol)를 무수 pyridine (20 mL)에 용해하고 0°C에서 ethyl chloroformate (0.9 mL, 9.0 mmol)를 가한 후에 DMAP (73 mg, 0.6 mmol)을 넣고 50°C에서 overnight 시킴. TLC로 반응 종결을 확인한 후에 포화  $\text{NaHCO}_3$  용액 (0.5 mL)으로 반응을 중화. 반응액에 toluene을 넣고 2-3회 감압 농축한 후에 EtOAc와 물로 2-3회 추출하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조, 여과, 감압 농축함. 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 10)으로 정제하여 무색투명한 syrup상의 compound **13** (867 mg, 88%)를 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  5.72 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 5.54 (dd,  $J=7.8, 4.2$  Hz, 1H), 5.22 (m, 1H), 4.14 (q,  $J=6.9$  Hz, 2H), 3.35 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 3.31 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 2.15 (dd,  $J=14.4, 7.5$  Hz, 1H), 1.57 (dd,  $J=14.4, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J=3.9$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.74 (t,  $J=4.5$  Hz, 3H), 0.04 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta$  154.93, 142.76, 129.12, 83.50, 68.72, 63.53, 54.90, 37.84, 29.62, 25.75, 18.13, 14.22, 8.82, -5.54.

**Coupling of CS-682 with compound 13 (14):** NaH (1.0 mL, 1.0 M in DMSO)를 무수 DMSO (2 mL)에 용해하고 compound **13** (262 mg, 0.8 mmol)을 넣고 50-55°C에서 45분간 교반. 한편 빈 flask에 무수 THF (1 mL)을 취하고 상온에서  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$  (18.8 mg, 17.5  $\mu\text{mol}$ )을 넣어 용해시킨 후,  $\text{P}(\text{O}-i\text{-Pr})_3$  (0.4 mL, 1.8 mmol)을 가하고 30분간 교반. 다음 CS-682 (390 mg, 0.7 mmol)를 무수 THF (1 mL)에 용해시켜서 천천히 가함. 온도를 100°C까지 올리고 overnight 시킴. TLC로 출발 물질이 사라진 것을 확인한 후 혼합액을 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/hexane = 1 : 13)으로 정제하여 백색 고체상의 compound **15** (235 mg, 37%)를 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (br s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.72 (d,  $J = 7.2$

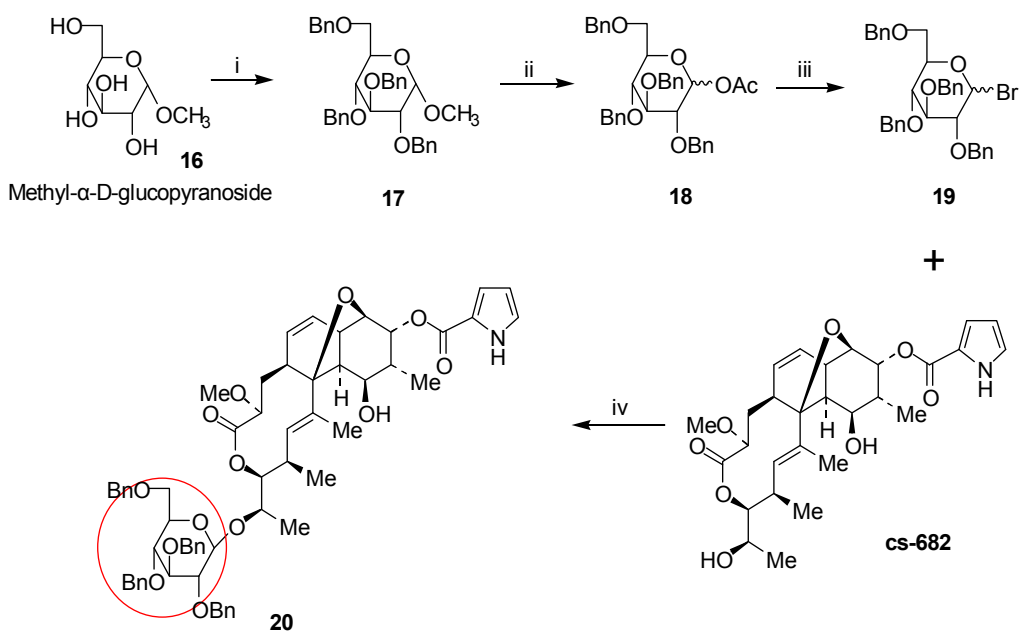


Hz, 1H), 5.61-5.68 (m, 2H), 5.55 (m, 2H), 5.50 (dd, J = 6.2, 1.4 Hz, 1H), 5.10-5.09 (m, 2H), 4.21 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.14-4.09 (m, 4H), 3.72-3.67 (m, 3H), 3.36 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd, J = 3.4, 1.4 Hz, 1H), 2.59-2.50 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (dd, J = 14.4, 7.5 Hz, 1H), 2.02 (s, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.57 (dd, J = 14.4, 3.3 Hz, 1H), 1.43 (q, J = 3.9 Hz, 2H), 1.24-1.19 (m, 13H), 0.86 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).

**CS-682-deoxycarbasugar (15).** Compound 14 (100 mg, 0.13 mmol)를 무수 THF (3 mL)에 용해하고 0°C에서 TBAF (0.2 mL, 1.0 M solution in THF)을 가한 후, 상온에서 1시간 교반함. TLC로 반응 종결을 확인한 후에 감압 농축하고 그 잔사를 column chromatography (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1 : 10) 로 정제하여 백색 고체 상의 compound 15 (77 mg, 74%)를 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 9.09 (br s, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.74 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 5.65-5.60 (m, 2H), 5.56-5.49 (m, 3H), 5.32 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 5.09 (m, 2H), 4.21 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.15-4.08 (m, 4H), 3.70-3.64 (m, 4H), 3.37 (dd, J = 9.6, 5.4 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.01 (dd, J = 3.4, 1.2 Hz, 1H), 2.60-2.52 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (dd, J = 14.2, 7.6 Hz, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.58 (dd, J = 14.2, 3.3 Hz, 1H), 1.43 (q, J = 3.9 Hz, 2H), 1.25-1.18 (m, 14H).

### 3. Glucose 와 CS-682와의 배당체 합성

목적하는 CS-682와 glucose를 축합하기 위해서 상업적으로 쉽게 구입할 수 있는 methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside **16**을 출발물질 일련의 반응을 수행함. 선행반응으로 glucose의 수산기를 반응에 견딜 수 있도록 benzyl bromide를 이용하여 모두 보호함. 축합에 필요한 이탈기를 anomeric 위치에 만들기 위해서 glacial hydrogen bromide를 처리하여 glycosyl donor인 **19**번 화합물을 쉽게 합성 할 수 있었음. 다음 silver triflate (AgOTf)를 촉매로 이용하여 CS-682의 less hindered 수산기와 축합하여 화합물 **20**을 합성하였음.



**Scheme 4:** Reagents: i) NaH, BnBr, DMF, THF, 0 °C, overnight; ii) AcOH, Ac<sub>2</sub>O, c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0 °C, overnight; iii) 45% HBr/AcOH, MC, 15h; iv) AgOTf, MC, 0 °C, 1h.

## 실 험

**3,4,5-Tris-benzyloxy-2-benzyloxymethyl-6-methoxy-tetrahydro-pyran (17):** NaH (60% in mineral oil, 1.03 g, 25.75 mmol)를 무수 THF (6ml)에 현탁함. 0°C에서 출발물질 Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside **16** (1.0 g, 5.15mmol)을 DMF (7ml)에 용해시켜서 천천히 부가한 후 30분 동안 교반. 같은 온도에서 BnBr (2.94 ml, 24.720 mmol)을 천천히 부가하고 상온에서 overnight로 교반. TLC로 출발물질이 완전히 사라진 것을 확인하고 0 °C에서 포화 NH<sub>4</sub>Cl용액 (2ml)을 부가하여 반응을 종결함. 반응액을 EtOAc와 물로 2-3회 추출하고 유기용매층을 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 여과, 감압 농축. 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/Hexane, 5:1)로 정제하여 화합물 **17** (2.34 g, 82%)을 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  7.37-7.10 (m, 15H), 4.99 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.84-4.77 (m, 1H), 4.68-4.61 (m, 1H), 4.58-4.44 (m, 1H), 3.73-3.53 (m, 2H), 3.37 (s, 3H).

Acetic

acid

**3,4,5-tris-benzyloxy-6-benzyloxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yl ester (18):**

빈 flask에 화합물 17 (974 mg, 1.756 mmol)을 넣고 0 °C에서 AcOH, Ac<sub>2</sub>O, c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 차례로 천천히 부가한 후, 같은 온도에서 overnight로 교반. TLC로 출발물질이 완전히 사라진 것을 확인하고 반응액을 찬 EtOAc와 물로 2-3회 추출하고 유기용매층을 다시 포화 NaHCO<sub>3</sub>용액과 소금물로 씻음. 유기용매층을 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조하고 여과, 감압 농축하여 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/Hexane, 10:1)로 정제하여 화합물 18 (920 mg, 90%)를 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.39-7.15 (m, 15H), 4.83 (dd, J = 10.2, 4.6 Hz, 1H), 4.73-4.60 (m, 2H), 4.41-4.28 (m, 2H), 3.69-3.50 (m, 2H), 2.09 (s, 3H).

**3,4,5-Tris-benzyloxy-2-benzyloxymethyl-6-bromo-tetrahydro-pyran**

**(19):** 화합물 18 (0.342 g, 0.587 mmol)를 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3ml)에 용해하고 0 °C에서 45% HBr/AcOH (0.6ml)을 천천히 부가한 후 상온에서 15시간 교반. TLC로 출발물질이 다 사라진 것을 확인하고 반응액을 Toluene과 혼합한 후, 감압 농축하여 화합물 19 (244 mg, 69%)를 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.41-7.19 (m, 15H), 4.12 (m, 1H), 4.68-4.51 (m, 2H), 4.38-4.21 (m, 2H), 3.70 (dd, J = 12.8, 4.6 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 12.8, 6.8 Hz, 1H).

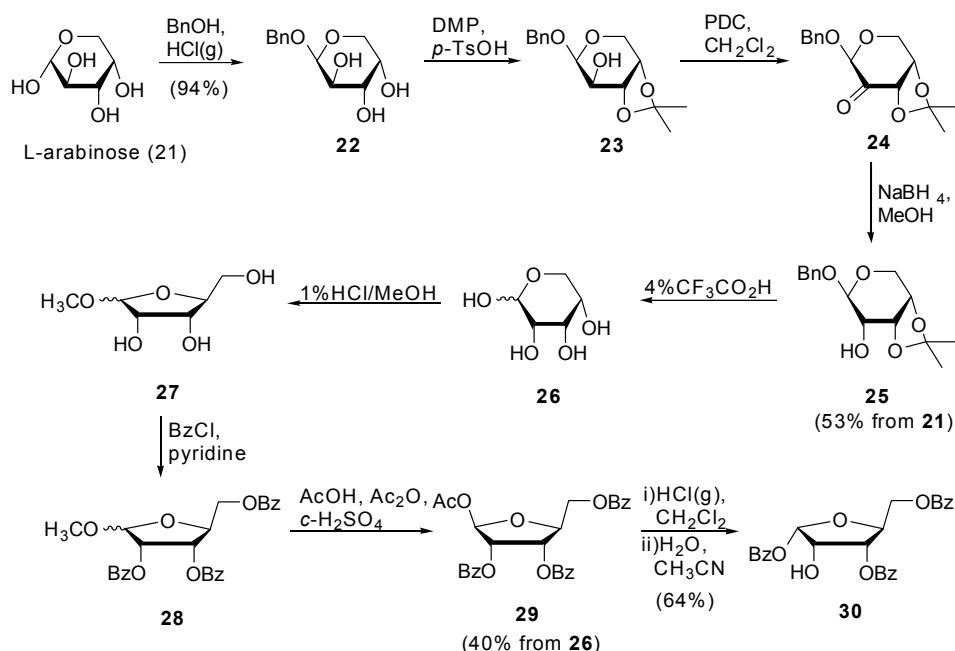
**CS-682-benzylated glucose (20):**

빈 flask에 화합물 19 (42.37 mg, 0.070 mmol)을 넣고 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2ml)로 용해시킨 후 0°C로 냉각시킴. 여기에 시약 AgOTf (17.84 mg, 0.069 mmol)를 넣고 20분 동안 교반. 같은 온도에서 화합물 cs-682 (20 mg, 0.0388 mmol)를 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2ml)에 용해하여 천천히 부가하고 1시간 교반. TLC로 출발물질이 다 사라진 것을 확인하고 Triethylamine (0.2 ml)을 넣어 반응을 종결함. 생성된 고체를 celite pad를 이용하여 제거하고 그 여액을 감압 농축. 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/Hexane, 1:2)로 정제하여 화합물 20 (14 mg, 36%)를 얻음. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 9.12 (br s, 1H), 7.39-7.21 (m, 15H), 6.98 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.23 (dd, J = 6.0, 2.4 Hz, 1H), 5.82-5.80 (m, 1H), 5.57 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 5.52 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.10-5.04 (m, 3H), 4.20-4.12 (m, 3H), 4.19-4.09 (m, 4H), 3.72-3.64 (m, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.02 (dd, J = 6.2, 4.4 Hz 1H), 2.51-2.42 (m, 2H), 2.30-3.21 (m, 2H), 2.01 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.25-1.15 (m, 10).

#### 4. Fluorosugar 와 CS-682와의 배당체 합성

목적하는 불소당 (fluorosugar)을 cs-682와 배당체를 합성하기 위해서 먼저 arabinose에 불소를 도입하여 적당한 glycosyl donor를 준비하는것이 필요하다고 판단됨. 상업적으로 쉽게 구입할 수 있는 arabinose의 anomeric 위치를 benylalcohol 로 보호하고 2번 수산기의 입체구조를 쉽게 inversion 할 수 있었음. 2번 위치에 불소를 도입하기 imidazolate를 이탈기로 도입하고 친핵체로서는 HF/Et<sub>3</sub>N를 이용함. 최종 cs-682와 glycosylation하기 위해서 AgOTf를 이용하고 불소당의 anomeric 위치는 bromine으로 활성화 시켰으며 예상대로 목적하는 34번 화합물을 합성.

**SCHEME 5**



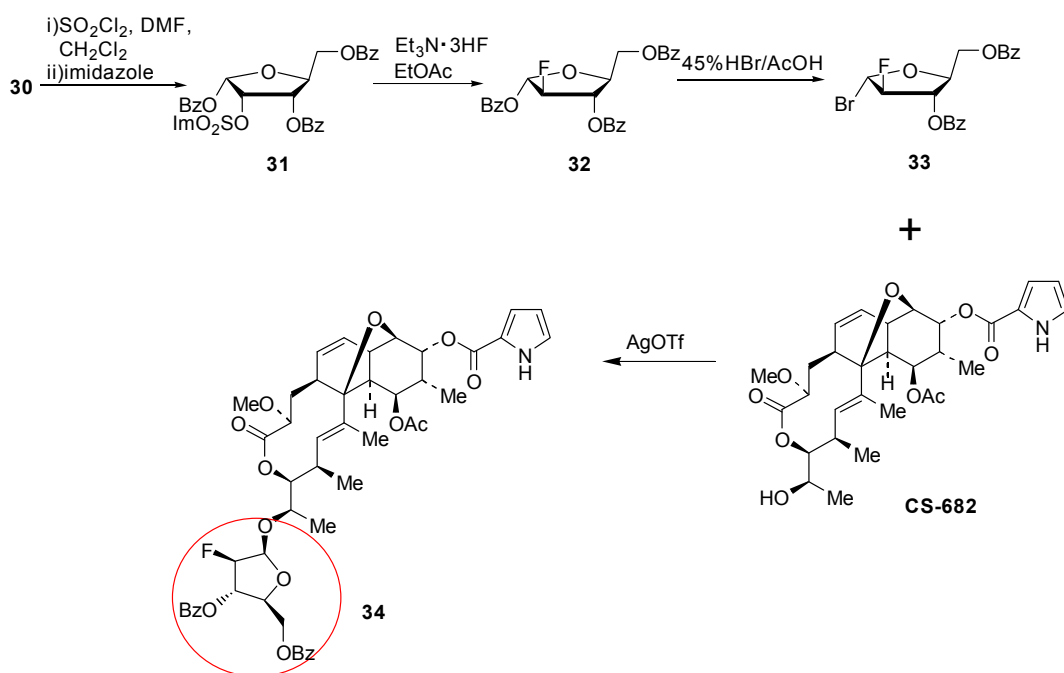
#### 실 험

**1-O-Benzyl-β-L-arabinoside (22):** Benzyl alcohol (1000 mL)을 포화염화수소에 용해하고 0℃에서 40min 교반시킨 다음 L-arabinoside 21 (200 g, 1.33 mol)을 부가하고 상온에서 10h 교반. EtOAc (1.5 L)를 천천히 부가하여 침전을 석출시킴. EtOAc로 여과하고 건조시켜서 백색 고체인 compound 1 (300 g, 94%)을 얻음.

**1-O-Benzyl-3,4-O-isopropylidene-β-L-ribose (25):** 1-O-benzyl-β-L-arabinoside (22) (200 g, 0.83 mol), 2,2-dimethoxypropane (240 mL, 1.95 mol)

과 *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (4 g, 0.02 mol)를 아세톤 (2000 mL)에 용해시켜 상온에서 2h 교반. triethylamine을 넣어 반응을 종결하고 감압농축 시켜 얻은 황색 compound **23**를 아래의 반응을 거쳐 정제. compound **23**와 pyridinium dichromate (240 g, 0.63 mol)를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2000 mL)에 용해시키고 0°C에서 Ac<sub>2</sub>O (240 mL, 2.54 mol)를 부가하고 물질이 완전히 녹을 때까지 환류 교반 (ca, 4h). 용매를 원래의 1/3로 감압 농축한 그 잔여물에 EtOAc (1500 mL)를 넣어 세게 교반시킨 후 Celite pad로 여과하고 EtOAc로 충분히 씻어 내림. 흑색을 띤 화합물을 silica gel (2-20 micron)로 column (20 cm height, 10 cm in diameter)함. silica gel을 EtOAc로 충분히 씻어내려 compound **3**의 존재여부를 TLC로 검출. toluene으로 용매를 두 번 감압 증발하여 얻은 compound **24**을 2000 mL 메탄올에 용해한 후 -20°C에서 NaBH<sub>4</sub> (40 g, 1.06 mol)를 3h에 걸쳐서 아주 천천히 부가함. acetic acid로 반응을 종결시키고 감압 증발하여 얻은 하얀 고체를 EtOAc (1000 mL)와 물 (200 mL)로 추출. 물 층을 EtOAc (100 mL)로 다시 한 번 추출.

### SCHEME 6



유기 층을 소금물 (200 mL)로 씻어내고 건조 (MgSO<sub>4</sub>), 증발시켜 얻은 백색 고체를 뜨거운 hexane (700 mL)로 재결정하여 백색 결정체 compound **25** (123 g, 50% from **21**)를 얻음: mp 79-80°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup>+126.5° (c 0.87, EtOH); <sup>1</sup>H NMR  $\delta$  (ppm) 7.26-7.36 (m, 5H, Ar), 4.85 (d, 1H, J = 7.99 Hz, H-1), 4.82 (d, 1H, J = 12.1 Hz,

PhCH<sub>2</sub>-), 4.56 (d, 1H, J = 12.1 Hz, PhCH<sub>2</sub>-), 4.50 (dd, 1H, J = 8.10 Hz, H-2), 4.27 (m, 1H, H-3), 3.86 (dd, 1H, J = 3.44, 12.9 Hz, H-5), 3.74 (dd, 1H, J = 3.31, 12.9 Hz, H-5), 3.37 (m, 1H, H-4), 1.55 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.37(s, 3H, -CH<sub>3</sub>); Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>: C, 64.27, H, 7.12. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>: C, 64.16, H, 7.12.

**1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-β-L-ribofuranose(29):** Compound **25** (201 g, 0.717 mol)를 CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (1000 mL)에 용해시켜 출발물질과 중간물질인 (1-O-benzoyl derivative)이 완전히 사라질 때까지 환류 교반(ca.4-8h). 반응혼합물을 상온으로 냉각시킨 다음 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4×500 mL)로 씻어내어 benzyl alcohol를 제거. 용매를 날리고 toluene (2×200 mL)으로 감압농축 시켜 황색 Compound **26**를 얻음. Compound **26**를 1% HCl methanol (2000 mL)에 용해시켜 상온에서 2h 교반. 혼합물을 pyridine (183 mL)로 중화하고 30-35°C에서 농축 하면 황색 compound **27**이 생성됨. compound **27**을 pyridine (800 mL)에 용해시켜 0°C에서 benzoyl chloride (212 mL)을 천천히 부가한 후 상온에서 8 h 교반. 다음 혼합물을 45°C로 온도를 올려 1.5 h 교반한 다음 상온으로 냉각시킴. 과량의 pyridine을 30-40°C에서 감압증발한 후 그 잔여물을 EtOAc (1500 mL)에 용해시키고 차다운 H<sub>2</sub>O (500 mL), 차가운 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (576 mL), NaHCO<sub>3</sub> (2×500 mL), 소금물 (500 mL)로 연속 씻어냄. 유기 층을 건조 (MgSO<sub>4</sub> and activated carbon), silica gel (2-20 μ) pad로 여과, 감압증발하여 황색 compound **28**을 얻음. compound **28**을 acetic acid (144 mL, 2.52 mol)에 용해시키고 0°C에서 acetic anhydride (334 mL, 3.54 mol), c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (48 mL, 0.9 mol)을 천천히 부가하여 결정체를 석출시킴. 혼합물을 overnight 냉장보관하여 계속 정출시킴. 혼합물에 얼음물 (700 mL)넣어 고체를 여과하고 차가운 물로 두 번 씻음. 고체를 EtOAc (2000mL)에 용해하고 차가운 물, NaHCO<sub>3</sub> (500mL), 소금물 (500 mL)로 씻음. 유기 층을 건조 (MgSO<sub>4</sub> and activated carbon), silica gel (2-20 μ) pad로 여과. 용매를 날려 그 잔사를 메탄올로 재결정하여 compound **29** (144.7 g, 40% from compound **25**)을 얻음: mp 124-125°C (lit.<sup>13</sup>mp124-125°C); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-22.1 (c 1.0, pyridine) [lit.<sup>13</sup> [α]<sub>D</sub>-45.6 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>); D-enantiomer [α]<sub>D</sub> +24.3 (c 1.0, pyridine)]; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.09-7.32 (m, 15H, Ar-H), 6.43 (s, 1H, H-1), 5.91 (dd, 1H, J = 4 Hz, H-3), 5.79 (d, 1H, J = 8 Hz, H-2), 4.81-4.76 (m, 2H, H-4 and H-5), 4.54-4.49 (m, 1H, H-5), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO).

**1,3,5-Tri-O-benzoyl-α-L-ribofuranose (30):** compound **29** (50 g, 99.16 mmol)을 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (460 mL)과 AcCl (7.5 mL)에 용해하고 0°C에서 HCl (gas)를

1.5 h 통과시킴. 혼합물을 12 h 동안 냉장보관한 후 용매를 제거. 잔사를 toluene (3×150 mL)으로 45°C에서 감압증발 한 후 CH<sub>3</sub>CN (105mL)에 용해시키고 0°C에서 물 (13mL) 부가하여 30min 지난 후부터 2h 동안 침전이 계속 생성되게 함. 생성된 고체를 여과하고 잔사를 diethyl ether로 충분히 씻어 내림. 획득한 고체를 EtOAc에 용해시켜 NaHCO<sub>3</sub>으로 남아있는 HCl를 씻어내고 건조 (MgSO<sub>4</sub>). 여과 감압 농축하여 백색고체 compound **30** (29.2 g, 63.7%)를 얻음: mp 137–139°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -82.01° (c 1.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.31, 8.19 (m, 15H, Ar-H), 6.69 (d, 1H J = 4.6 Hz, H-1). 5.59 (dd, 1H, J = 6.7, 1.8 Hz, H-3), 4.64, 4.80 (m, 4H, H-2, H-4 and H-5), 2.30 (br s, D<sub>2</sub>O exchangeable, OH).

**1,3,5-Tri-O-benzoyl-2-O-imidazolylsulfonyl- $\alpha$ -L-ribofuranose (31):** compound **30** (107.0 g, 0.232 mol)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1070 mL), DMF (214 mL)에 용해시킴. low temperature (-10 to -78°C) 조건하에서 용액에 SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.463 mol, 62.5 g, 37.2 mL)를 천천히 부가하고 상온에서 3 h 동안 교반시킨 다음 5°C에서 imidazole (2.32 mol, 157.8 g)을 부가하고 상온에서 20 h 교반한 후 얼음물 (400 mL)을 부가하고 물 층을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×100 mL)로 추출하고 유기용매 층을 소금물 (200 mL)로 씻어낸 다음 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조, 감압 농축시켜 DMF를 제거. 잔 여액(시럽)에 2-propanol (100 mL)를 부가하고 감압 농축하여 백색고체 **31**을 얻음.

**1-(3,5-Di-O-benzoyl-2-fluoro- $\beta$ -L-arabinofuranosyl)bromide (33).** imidazolate 유도체 **32** 과 Et<sub>3</sub>N • 3HF (224.1 g, 1.39 mol)을 EtOAc (824 ml)에 용해시켜 80 °C에서 3 h 가열. Et<sub>3</sub>N (0.696 mol, 70.3 g, 92.5 ml)을 천천히 부가하고 같은 온도에서 1h 교반한 다음 상온으로 냉각시킴. 얼음물로 반응을 종결하고 NaHCO<sub>3</sub>으로 pH치를 7로 조절. 물 층을 EtOAc (3×100 mL)로 추출하고 소금물로 씻은 다음 건조 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)함. 감압 농축하고 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL)에 용해시킨 다음 silica gel pad로 여과. 용매를 감압농축 시켜서 얻은 2-fluoro-sugar **32** (101.0 g)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL)에 용해한 다음 0°C에서 HBr/AcOH (45 % w/v, 1.09 mol, 88.2 g, 195.9 mL)를 부가하고 상온에서 15 h 교반. 용매를 날리고 toluene (3×100 mL)으로 충분히 감압 농축시켜서 sugar bromide **33** 을 얻어 더 이상의 정제 과정없이 재빨리 축합반응을 수행함. (bromide유도체가 상온에서 불안정함)

**CS-682-fluorosugar (34):** 빈 flask에 화합물 **33** (30 mg, 0.084 mmol)을 넣고 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2ml)로 용해시킨 후 0°C로 냉각. 여기에 시약 AgOTf (21.3 mg, 0.0828 mmol)를 넣고 20분 동안 교반. 같은 온도에서 화합물 cs-682 (26 mg,

0.0466 mmol)를 무수  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2ml)에 용해하여 천천히 부가하고 1시간 교반. TLC로 출발물질이 다 사라진 것을 확인하고 Triethylamine (0.3 ml)을 넣어 반응을 종결함. 생성된 고체를 celite pad를 이용하여 제거하고 그 여액을 감압 농축. 그 잔사를 column chromatography (EtOAc/Hexane, 1:2)로 정제하여 화합물 **34** (22 mg, 29%)를 얻음.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.14 (s, 1H), 7.41-7.24 (m, 15H), 6.99 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.70 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 6.21 (dd, J = 6.0, 2.4 Hz, 1H), 5.82-5.80 (m, 1H), 5.59 (dd, J = 6.7, 1.8 Hz, 2H), 5.52 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.10-5.04 (m, 3H), 4.80 (m, 4H), 4.20-4.12 (m, 3H), 4.15-4.02 (m, 3H), 3.70-3.61 (m, 3H), 3.23 (s, 3H), 2.97 (dd, J = 6.4, 4.6 Hz 1H), 2.57-2.46 (m, 2H), 2.35-3.26 (m, 2H), 2.07 (dd, J = 6.8, 4.2 Hz, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.24-1.15 (m, 10).

#### 연구개발에 따른 기대성과:

- cs-682의 cellular uptake를 증가시키기 위해서 일련의 배당체를 합성할 수 이 분야 배당체 화학에 기여할 수 있음.
  - 특정 수산기에 선택적으로 배당체를 도입할 수 있어 비슷한 구조를 가진 화합물에 쉽게 적용할 수 있음
  - 특히, glucose 배당체 화합물 **20**은 cs-682와 거의 비슷한 정도의 생리활성을 보여주고 있음
  - 불소는 수산기와 전기적 및 입체적 효과가 비슷하여 많은 생리 활성 물질이 불소를 함유하고 있음.
- 본 연구에서 개발된 불소화 반응은 중성의 조건에서 수행가능하기 때문에 이 분야의 불소함유 의약품개발에 쉽게 응용 할 수 있음.

#### 5. Coupling of CS-682 with 5-membered heterocycles

다양한 5-membered heterocycle을 CS-682에 축합하기 위해서 TBDMS로 보호된 **7-1**에 Alfred Hassner의 축합방법을 이용하여 **7-2**, **7-4**, **7-6**, **8-8**, **7-10**을 합성함. 보호기를 제거하기 위해서 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)를 사용하여 타겟 분자 (**7-3**, **7-5**, **7-7**, **7-9**, **711**)를 얻을 수 있었음.

Compound **7-2**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (br s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.72 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.61-5.68



(m, 2H), 5.55 (m, 2H), 5.50 (dd,  $J = 6.2, 1.4$  Hz, 1H), 5.10–5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.14–4.09 (m, 4H), 3.72–3.67 (m, 3H), 3.36 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd,  $J = 3.4, 1.4$  Hz, 1H), 2.59–2.50 (m, 2H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (dd,  $J = 14.4, 7.5$  Hz, 1H), 2.02 (s, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.57 (dd,  $J = 14.4, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 1.24–1.19 (m, 13H), 0.86 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).

Compound **7-3**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.09 (br s, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.74 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 5.65–5.60 (m, 2H), 5.56–5.49 (m, 3H), 5.32 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.15–4.08 (m, 4H), 3.70–3.64 (m, 4H), 3.37 (dd,  $J = 9.6, 5.4$  Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.01 (dd,  $J = 3.4, 1.2$  Hz, 1H), 2.60–2.52 (m, 2H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (dd,  $J = 14.2, 7.6$  Hz, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.58 (dd,  $J = 14.2, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 1.25–1.18 (m, 14H).

Compound **7-4**:  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (ppm) 7.26–7.36 (m, 5H, Ar), 4.85 (d, 1H,  $J = 7.99$  Hz, H-1), 4.82 (d, 1H,  $J = 12.1$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ -), 4.56 (d, 1H,  $J = 12.1$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ -), 4.50 (dd, 1H,  $J = 8.10$  Hz, H-2), 4.27 (m, 1H, H-3), 3.86 (dd, 1H,  $J = 3.44, 12.9$  Hz, H-5), 3.74 (dd, 1H,  $J = 3.31, 12.9$  Hz, H-5), 3.37 (m, 1H, H-4), 1.55 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.37 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).

Compound **7-5**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.14 (s, 1H), 7.41–7.24 (m, 15H), 6.99 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.70 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 6.21 (dd,  $J = 6.0, 2.4$  Hz, 1H), 5.82–5.80 (m, 1H), 5.59 (dd,  $J = 6.7, 1.8$  Hz, 2H), 5.52 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 5.50 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.10–5.04 (m, 3H), 4.80 (m, 4H), 4.20–4.12 (m, 3H), 4.15–4.02 (m, 3H), 3.70–3.61 (m, 3H), 3.23 (s, 3H), 2.97 (dd,  $J = 6.4, 4.6$  Hz, 1H), 2.57–2.46 (m, 2H), 2.35–3.26 (m, 2H), 2.07 (dd,  $J = 6.8, 4.2$  Hz, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.24–1.15 (m, 10).

Compound **7-6**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.12 (br s, 1H), 7.39–7.21 (m, 15H), 6.98 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.23 (dd,  $J = 6.0, 2.4$  Hz, 1H), 5.82–5.80 (m, 1H), 5.57 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 5.52 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 5.50 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.10–5.04 (m, 3H), 4.20–4.12 (m, 3H), 4.19–4.09 (m, 4H), 3.72–3.64 (m, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.02 (dd,  $J = 6.2, 4.4$  Hz, 1H), 2.51–2.42 (m, 2H), 2.30–3.21 (m, 2H), 2.01 (d,  $J = 4.2$  Hz, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.25–1.15 (m, 10).

Compound **7-7**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.09 (br s, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.74 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 5.65–5.60 (m,

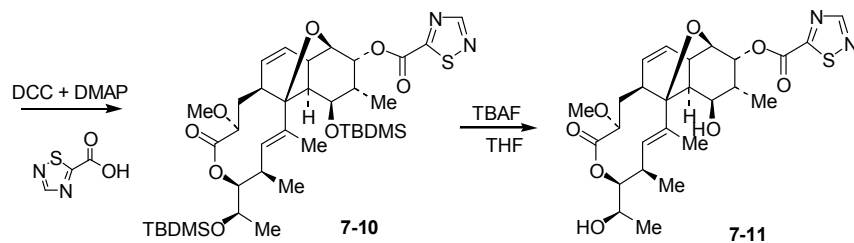
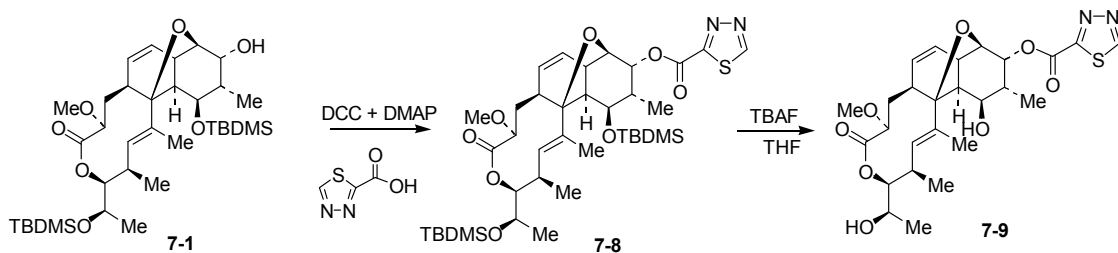
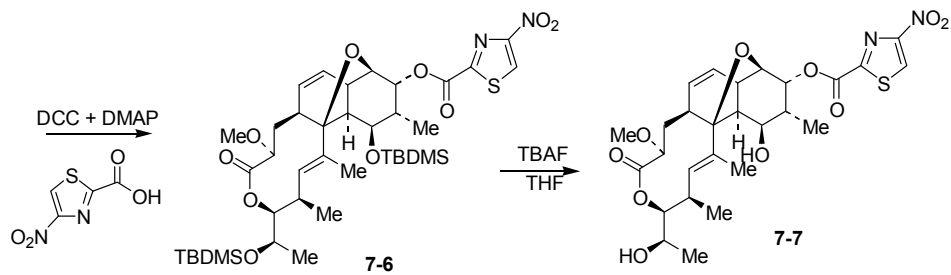
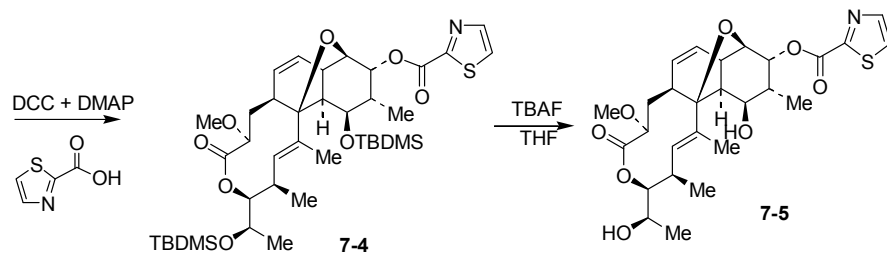
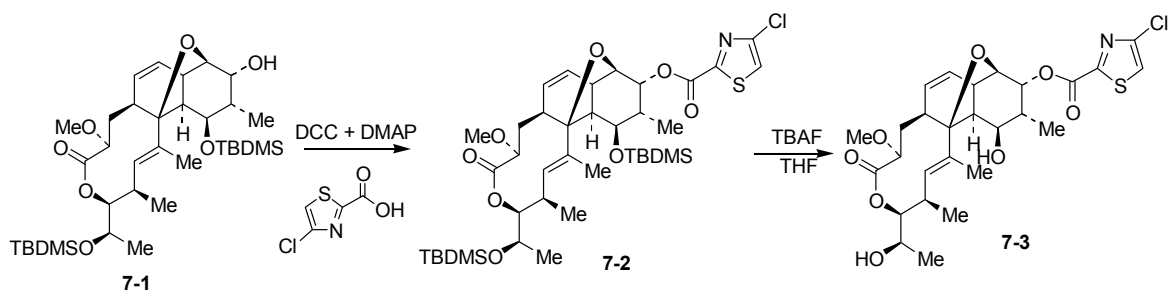
2H), 5.56-5.49 (m, 3H), 5.32 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 5.09 (m, 2H), 4.21 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.15-4.08 (m, 4H), 3.70-3.64 (m, 4H), 3.37 (dd, J = 9.6, 5.4 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.01 (dd, J = 3.4, 1.2 Hz, 1H), 2.60-2.52 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (dd, J = 14.2, 7.6 Hz, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.58 (dd, J = 14.2, 3.3 Hz, 1H), 1.43 (q, J = 3.9 Hz, 2H), 1.25-1.18 (m, 14H).

Compound **7-8**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (br s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.72 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.61-5.68 (m, 2H), 5.55 (m, 2H), 5.50 (dd, J = 6.2, 1.4 Hz, 1H), 5.10-5.09 (m, 2H), 4.21 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.14-4.09 (m, 4H), 3.72-3.67 (m, 3H), 3.36 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd, J = 3.4, 1.4 Hz, 1H), 2.59-2.50 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (dd, J = 14.4, 7.5 Hz, 1H), 2.02 (s, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.57 (dd, J = 14.4, 3.3 Hz, 1H), 1.43 (q, J = 3.9 Hz, 2H), 1.24-1.19 (m, 13H), 0.86 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).

Compound **7-9**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  5.72 (d, J=7.2 Hz, 1H), 5.54 (dd, J=7.8, 4.2 Hz, 1H), 5.22 (m, 1H) 4.14 (q, J=6.9 Hz, 2H), 3.35 (d, J=9.6 Hz, 1H), 3.31 (d, J=9.6 Hz, 1H), 2.15 (dd, J=14.4, 7.5 Hz, 1H), 1.57 (dd, J=14.4, 3.3 Hz, 1H), 1.43 (q, J=3.9 Hz, 2H), 1.25 (t, J=7.3 Hz, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.74 (t, J=4.5, Hz, 3H), 0.04 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta$  154.93, 142.76, 129.12, 83.50, 68.72, 63.53, 54.90, 37.84, 29.62, 25.75, 18.13, 14.22, 8.82, -5.54.

Compound **7-10**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.12 (br s, 1H), 6.99 (m, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.28 (dd, J = 6.0, 2.4 Hz, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.60 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 5.56 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 5.13 (m, 2H), 4.22 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.15-4.08 (m, 2H), 3.74-3.68 (m, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.06 (m, 1H), 2.57-2.48 (m, 2H), 2.37-3.34 (m, 2H), 2.04 (s, 2H), 1.83 (s, 3H), 1.26-1.20 (m, 10), 0.87 (s, 9H), 0.12 (s, 6H).

Compound **7-11**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (br s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.61-5.68 (m, 2H), 5.55 (dd J = 3.6, 1.2. Hz, 1H), 5.50 (dd, J = 6.2, 1.4 Hz, 1H), 5.10-5.09 (m, 2H), 4.21 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.14-4.09 (m, 2H), 3.72-3.67 (m, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd, J = 3.4, 1.4 Hz, 1H), 2.59-2.50 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.02 (s, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.24-1.19 (m, 10), 0.88 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).



Organism(24시간)(10 <sup>7</sup> CFU/ml)	Nargenicin	Vancomycin	Nargenicin 용도액												
			#7-11	#7-9	#7-7	#7-5	#7-3	#9-12	#9-19	#4-22	#3-8	#2-15			
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8760	> 80	> 80	40	> 80	> 80	> 80	40	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 80	1.25	80	> 80	> 80	> 80	40	> 80	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC	> 80	0.15	2.5	> 80	> 80	> 80	> 80	10	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Staphylococcus aureus</i> KC TC1928	0.31	5	2.5	0.15	0.15	5	5	> 80	> 80	10	40	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.625	0.625	2.5	0.15	0.15	5	1.25	> 80	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 9341	> 80	2.5	5	> 80	> 80	80	10	> 80	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Salmonella typhimurium</i> K CT1926	> 80	> 80	2.5	80	80	> 80	> 80	20	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>E. Coli</i> KC TC1923	> 80	> 80	20	80	> 80	> 80	40	> 80	> 80	20	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K CT1637	> 80	> 80	40	> 80	> 80	> 80	40	> 80	> 80	> 80	10	> 80	> 80	> 80	> 80
<i>Streptococcus pyrogenes</i> ATCC 21059	-	> 80	80	> 80	40	80	20	> 80	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
MRSA 693E	0.15	0.3	1.25	0.15	0.15	5	5	> 80	> 80	20	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
MRSA 6-3	0.3	> 80	80	20	40	> 80	20	> 80	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
MRSA 4-21	-	> 80	80	80	40	> 80	20	> 80	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
VRE 89	> 80	> 80	80	40	> 80	80	20	> 80	> 80	80	80	> 80	> 80	> 80	> 80
VRE 98	> 80	> 80	80	> 80	> 80	40	20	> 80	> 80	80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80

6. Coupling of CS-682 with single, double and triple 5-membered heterocycles.

**(i) Single coupling of C-11 of CS-682 with single 5-membered heterocycle:**

다양한 5-membered heterocycle을 CS-682의 C-11 위치에 축합하기 위해서 C-9 과 C-18이 TBDMS로 보호된 7-1에 (DCC+DMAP)의 축합조건을 이용하여 7-2, 7-4, 7-6, 8-8, 7-10을 합성ga. 보호기를 제거하기 위해서 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)를 사용하여 타겟분자 (7-3, 7-5, 7-7, 7-9, 7-11)를 얻을 수 있었음.

Compound 7-2: yield 36%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (br s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.72 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 5.61-5.68 (m, 2H), 5.55 (m, 2H), 5.50 (dd,  $J = 6.2, 1.4$  Hz, 1H), 5.10-5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.14-4.09 (m, 4H), 3.72-3.67 (m, 3H), 3.36 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd,  $J = 3.4, 1.4$  Hz, 1H), 2.59-2.50 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (dd,  $J = 14.4, 7.5$  Hz, 1H), 2.02 (s, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.57 (dd,  $J = 14.4, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 1.24-1.19 (m, 13H), 0.86 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).

Compound 7-3: yield 52%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.09 (br s, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.74 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 5.65-5.60 (m, 2H), 5.56-5.49 (m, 3H), 5.32 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.15-4.08 (m, 4H), 3.70-3.64 (m, 4H), 3.37 (dd,  $J = 9.6, 5.4$  Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.01 (dd,  $J = 3.4, 1.2$  Hz, 1H), 2.60-2.52 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (dd,  $J = 14.2, 7.6$  Hz, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.58 (dd,  $J = 14.2, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 1.25-1.18 (m, 6H); MS  $m/z$  568(M+H)+.

Compound 7-4: yield 29%;  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (ppm) 7.26-7.36 (m, 5H, Ar), 4.85 (d, 1H,  $J = 7.99$  Hz, H-1), 4.82 (d, 1H,  $J = 12.1$  Hz,  $\text{PhCH}_2^-$ ), 4.56 (d, 1H,  $J = 12.1$  Hz,  $\text{PhCH}_2^-$ ), 4.50 (dd, 1H,  $J = 8.10$  Hz, H-2), 4.27 (m, 1H, H-3), 3.86 (dd, 1H,  $J = 3.44, 12.9$  Hz, H-5), 3.74 (dd, 1H,  $J = 3.31, 12.9$  Hz, H-5), 3.37 (m, 1H, H-4), 1.55 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.37(s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).

Compound **7-5**: yield 65%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.14 (s, 1H), 7.41–7.24 (m, 15H), 6.99 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.70 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 6.21 (dd,  $J = 6.0, 2.4$  Hz, 1H), 5.82–5.80 (m, 1H), 5.59 (dd,  $J = 6.7, 1.8$  Hz, 2H), 5.52 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 5.50 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.10–5.04 (m, 3H), 4.80 (m, 4H), 4.20–4.12 (m, 3H), 4.15–4.02 (m, 3H), 3.70–3.61 (m, 3H), 3.23 (s, 3H), 2.97 (dd,  $J = 6.4, 4.6$  Hz, 1H), 2.57–2.46 (m, 2H), 2.35–3.26 (m, 2H), 2.07 (dd,  $J = 6.8, 4.2$  Hz, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.24–1.15 (m, 5); MS  $m/z$  534(M+H) $^+$ .

Compound **7-6**: yield 26%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.12 (br s, 1H), 7.39–7.21 (m, 15H), 6.98 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.23 (dd,  $J = 6.0, 2.4$  Hz, 1H), 5.82–5.80 (m, 1H), 5.57 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 5.52 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 5.50 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.10–5.04 (m, 3H), 4.20–4.12 (m, 3H), 4.19–4.09 (m, 4H), 3.72–3.64 (m, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.02 (dd,  $J = 6.2, 4.4$  Hz, 1H), 2.51–2.42 (m, 2H), 2.30–3.21 (m, 2H), 2.01 (d,  $J = 4.2$  Hz, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.25–1.15 (m, 10).

Compound **7-7**: yield 51%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.09 (br s, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.74 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 5.65–5.60 (m, 2H), 5.56–5.49 (m, 3H), 5.32 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.15–4.08 (m, 4H), 3.70–3.64 (m, 4H), 3.37 (dd,  $J = 9.6, 5.4$  Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.01 (dd,  $J = 3.4, 1.2$  Hz, 1H), 2.60–2.52 (m, 2H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (dd,  $J = 14.2, 7.6$  Hz, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.58 (dd,  $J = 14.2, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 1.25–1.18 (m, 6H). MS  $m/z$  579(M+H) $^+$ .

Compound **7-8**: yield 21%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (br s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88–5.82 (m, 1H), 5.72 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 5.61–5.68 (m, 2H), 5.55 (m, 2H), 5.50 (dd,  $J = 6.2, 1.4$  Hz, 1H), 5.10–5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.14–4.09 (m, 4H), 3.72–3.67 (m, 3H), 3.36 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd,  $J = 3.4, 1.4$  Hz, 1H), 2.59–2.50 (m, 2H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (dd,  $J = 14.4, 7.5$  Hz, 1H), 2.02 (s, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.57 (dd,  $J = 14.4, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 1.24–1.19 (m, 13H), 0.86 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).

Compound **7-9**: yield 49%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  5.72 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 5.54 (dd,  $J=7.8, 4.2$  Hz, 1H), 5.22 (m, 1H) 4.14 (q,  $J=6.9$  Hz, 2H), 3.35 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 3.31 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 2.15 (dd,  $J=14.4, 7.5$  Hz, 1H), 1.57 (dd,  $J=14.4, 3.3$  Hz, 1H), 1.43 (q,  $J=3.9$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.74 (t,  $J=4.5$ , Hz, 3H), 0.04 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta$  154.93, 142.76, 129.12, 83.50, 68.72, 63.53, 54.90, 37.84, 29.62, 25.75, 18.13, 14.22, 8.82, -5.54; MS  $m/z$  535(M+H) $^+$ .

Compound **7-10**: yield 29%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.12 (br s, 1H), 6.99 (m, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.28 (dd,  $J = 6.0, 2.4$  Hz, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.60 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 5.56 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 5.53 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 5.13 (m, 2H), 4.22 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.15-4.08 (m, 2H), 3.74-3.68 (m, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.06 (m, 1H), 2.57-2.48 (m, 2H), 2.37-3.34 (m, 2H), 2.04 (s, 2H), 1.83 (s, 3H), 1.26-1.20 (m, 10), 0.87 (s, 9H), 0.12 (s, 6H).

Compound **7-11**: yield 70%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (br s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.61-5.68 (m, 2H), 5.55 (dd  $J = 3.6, 1.2$ . Hz, 1H), 5.50 (dd,  $J = 6.2, 1.4$  Hz, 1H), 5.10-5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.14-4.09 (m, 2H), 3.72-3.67 (m, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd,  $J = 3.4, 1.4$  Hz, 1H), 2.59-2.50 (m, 2H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.02 (s, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.24-1.19 (m, 10), 0.88 (s, 9H), 0.15 (s, 6H);MS  $m/z$  535(M+H) $^+$ .

Compound **7-12**: yield 30%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (s, 1H), 5.60-5.57 (m, 2H), 5.45 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.99 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 2.61-2.51 (m, 2H), 2.35-2.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.02-1.99 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.88-0.82 (m, 18H), 0.03 (s, 12H).

Compound **7-13**: yield 66%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.11 (s, 1H), 5.59-5.54 (m, 2H), 5.46 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.99 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.15-3.13 (s, 3H), 2.63-2.55 (m, 2H), 2.34-2.29 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.04-1.98 (m, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.01 (s, 3H); MS  $m/z$  601(M+H) $^+$ .

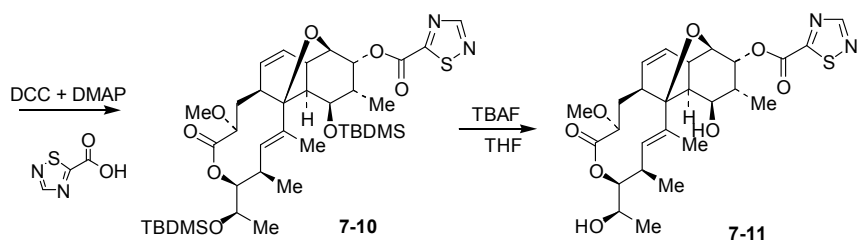
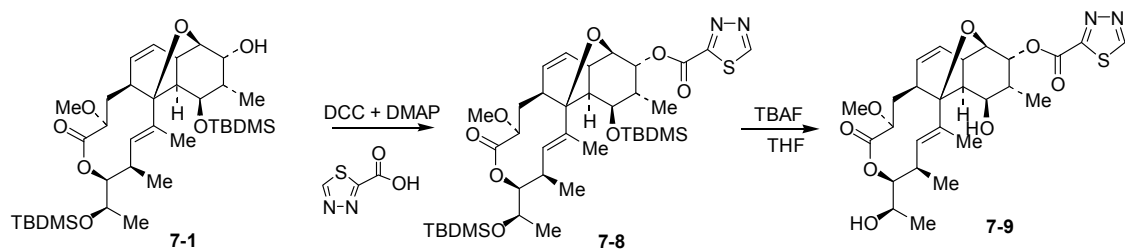
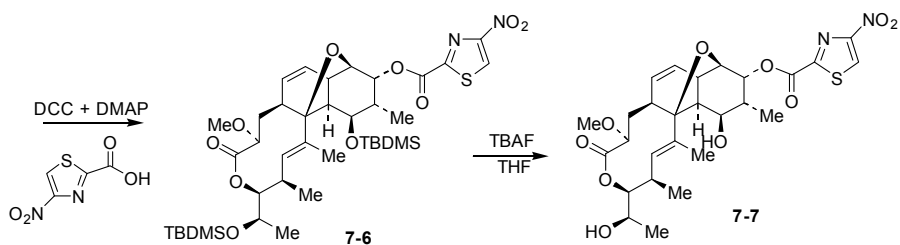
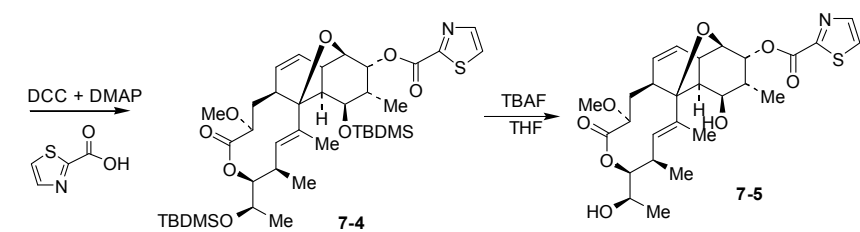
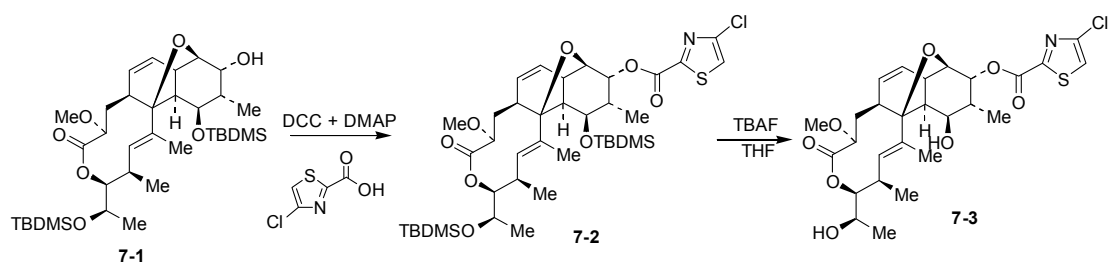
Compound **7-14**: yield 18%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (s, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 5.88–5.82 (m, 1H), 5.61–5.68 (m, 2H), 5.55 (dd  $J = 3.6, 1.2$  Hz, 1H), 5.50 (dd,  $J = 6.2, 1.4$  Hz, 1H), 5.10–5.09 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.14–4.09 (m, 2H), 3.72–3.67 (m, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.05 (dd,  $J = 3.4, 1.4$  Hz, 1H), 2.59–2.50 (m, 2H), 2.35–3.29 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.02 (s, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.24–1.19 (m, 6), 0.88 (s, 18H), 0.02 (m, 12H).

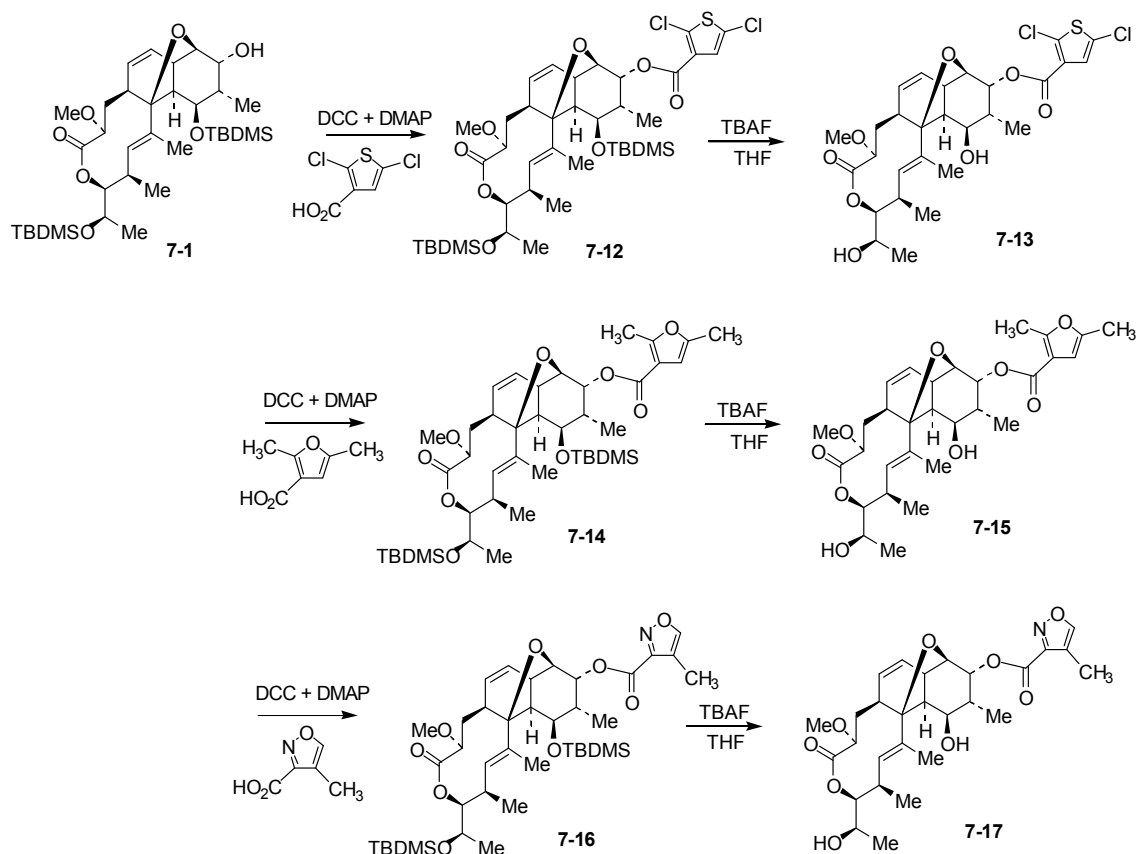
Compound **7-15**: yield 52%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.12 (br s, 1H), 5.61–5.55 (m, 2H), 5.43–5.39 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.99 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.15–3.13 (s, 3H), 2.63–2.55 (m, 2H), 2.37–2.31 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.11 (m, 6H), 2.04–1.98 (m, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.01 (s, 3H); MS  $m/z$  545(M+H) $^+$ .

Compound **7-16**: yield 22%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.99 (s, 1H), 5.60–5.57 (m, 2H), 5.45 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.99 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.49–3.44 (m, 1H), 3.18–3.15 (s, 3H), 2.61–2.51 (m, 2H), 2.35–2.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.02–1.99 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.88–0.82 (m, 18H), 0.01 (m, 12H).

Compound **7-17**: yield 69%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.01 (s, 1H), 5.59–5.56 (m, 2H), 5.46 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 4.21–4.18 (m, 2H), 4.01 (m, 1H), 3.84–3.79 (m, 2H), 3.48–3.43 (m, 1H), 3.18 (s, 3H), 2.63–2.55 (s, 1H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.04–1.98 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.01 (s, 3H); MS  $m/z$  532(M+H) $^+$ .







(ii) Double coupling of C-11 and C-9 of CS-682 with two 5-membered heterocycles:

5종의 5-membered heterocycle을 CS-682의 C-11, C-9 두곳에 위치에 축합하기 위해서 C-12 이 TBDMS로 보호된 7-2-0에 (DCC+DMAP)의 축합조건을 이용하여 (7-2-1, 7-2-3, 7-2-5, 7-2-7, 7-2-9)을 합성하였음. 보호기를 제거하기 위해서 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)를 사용하여 타겟분자 (7-2-2, 7-2-4, 7-2-6, 7-2-8, 7-2-10)를 합성함.

Compound 7-2-1: yield 20%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.94 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 5.61–5.56 (m, 2H), 5.48–5.45 (m, 1H), 4.10–4.01 (m, 2H), 3.82–3.75 (m, 2H), 3.49–3.44 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.94–2.89 (m, 2H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.07–2.01 (m, 2H), 1.77 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.90–0.85 (m, 9H), 0.03–0.01 (m, 6H).

Compound **7-2-2**: yield 56%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.00 (br s, 2H), 5.64–5.58 (m, 2H), 5.44 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.92–4.87 (br d, 2H), 4.18–4.11 (m, 2H), 4.04 (m, 1H), 3.87–3.80 (m, 2H), 3.46–3.39 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 2.63–2.55 (m, 1H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.09–1.98 (m, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.07 (s, 3H); MS  $m/z$  713(M+H) $^+$ .

Compound **7-2-3**: yield 20%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.92 (s, 2H), 8.85 (s, 2H), 5.63–5.52 (m, 3H), 5.45–5.40 (m, 1H), 4.12–4.11 (m, 2H), 3.81–3.73 (m, 2H), 3.51–3.46 (m, 1H), 3.21 (s, 3H), 2.91–2.86 (m, 2H), 2.42–3.36 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.09–2.03 (m, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.89 (m, 9H), 0.02 (m, 6H).

Compound **7-2-4**: yield 56%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.00 (br d, 2H), 5.64–5.58 (m, 2H), 5.44 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.92–4.87 (br d, 2H), 4.18–4.11 (m, 2H), 4.04 (m, 1H), 3.87–3.80 (m, 2H), 3.46–3.39 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 2.63–2.55 (m, 1H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.09–1.98 (m, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.07 (s, 3H); MS  $m/z$  765(M+H) $^+$ .

Compound **7-2-5**: yield 18%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.10 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 5.61–5.56 (m, 2H), 5.48–5.45 (m, 1H), 4.10–4.01 (m, 2H), 3.82–3.75 (m, 2H), 3.49–3.44 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.94–2.89 (m, 2H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.07–2.01 (m, 2H), 1.77 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.90 (m, 9H), 0.04–0.02 (m, 6H).

Compound **7-2-6**: yield 59%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.04 (s, 2H), 8.97 (s, 1H), 5.54–5.48 (m, 2H), 5.34 (m, 1H), 4.90–4.85 (br s, 2H), 4.31–4.24 (m, 2H), 4.06–4.01 (m, 2H), 3.90–3.83 (m, 1H), 3.51–3.44 (m, 1H), 3.22 (s, 3H), 2.67–2.59 (m, 1H), 2.35–3.30 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.05–1.97 (m, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.06 (s, 3H); MS  $m/z$  735(M+H) $^+$ .

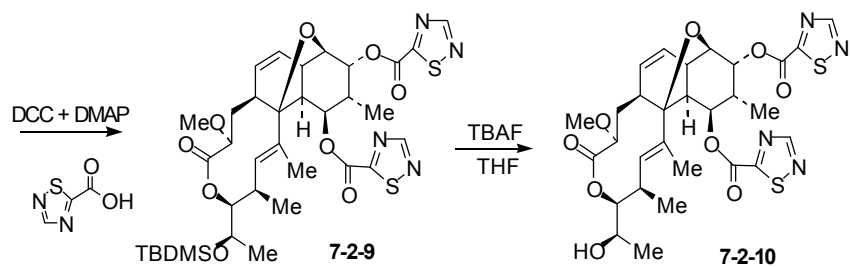
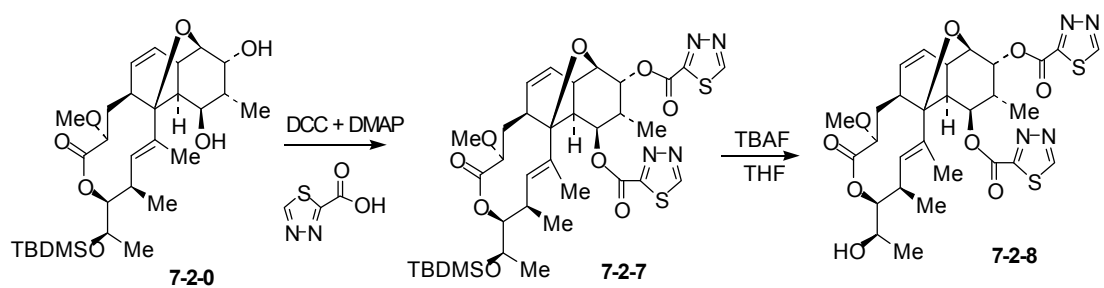
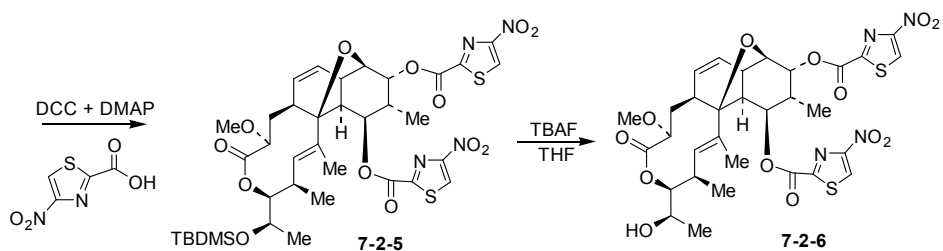
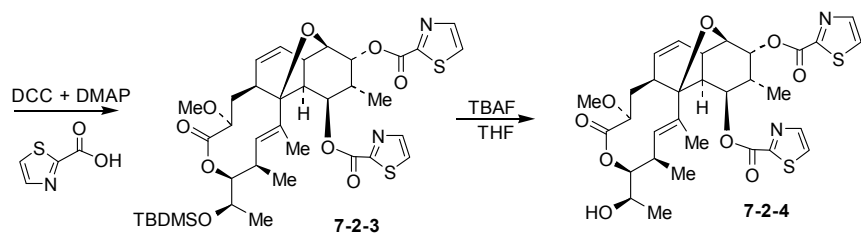
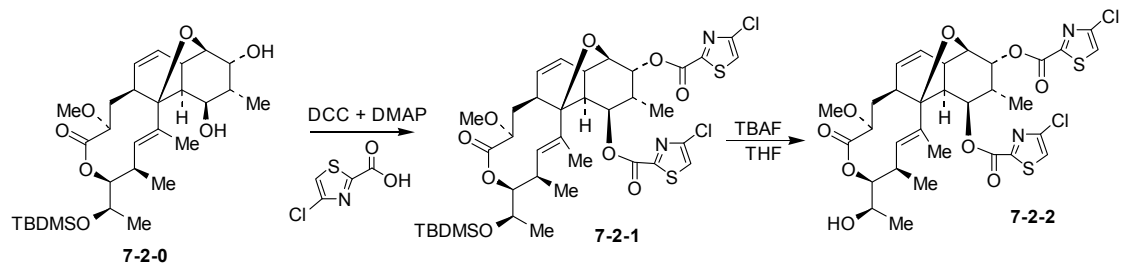
Compound **7-2-7**: yield 17%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.87 (s, 1H), 5.63–5.57 (m, 2H), 5.47 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 4.26–4.19 (m, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.80–3.71 (m, 2H), 3.45 (m, 1H), 3.17(s, 3H), 2.72–2.65 (m, 2H), 2.39–2.34 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.02–1.99 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.03 (s, 3H),

0.88-0.82 (m, 18H), 0.03 (m, 12H).

Compound **7-2-8**: yield 57%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.90 (s, 1H), 5.59-5.52 (m, 2H), 5.46 (m, 1H), 4.89 (br s, 1H), 4.25-4.18 (m, 2H), 4.03 (m, 1H), 3.81-3.74 (m, 2H), 3.51-3.44 (m, 1H), 3.21 (s, 3H), 2.61-2.56 (s, 1H), 2.38-2.33 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.07-2.02 (m, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.06 (s, 3H); MS  $m/z$  647(M+H) $^+$ .

Compound **7-2-9**: yield 16%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.02 (s, 1H), 5.61-5.53 (m, 2H), 5.34-5.27 (m, 1H), 4.18-4.12 (m, 2H), 3.80-3.73 (m, 2H), 3.52-3.46 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.94-2.89 (m, 2H), 2.35-2.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.09-2.02 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.91-0.89 (m, 9H), 0.02 (m, 6H).

Compound **7-2-10**: yield 59%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.03 (s, 1H), 5.64-5.58 (m, 2H), 5.44 (m, 1H), 4.91 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.18-4.11 (m, 2H), 4.04 (m, 1H), 3.88-3.81 (m, 2H), 3.46-3.39 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 2.63-2.55 (m, 1H), 2.45-2.39 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.11-2.05 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.07 (s, 3H); MS  $m/z$  647(M+H) $^+$ .



**(iii) Triple coupling of C-11, C-9, C-12 of CS-682 with three 5-membered heterocycles:**

5종의 5-membered heterocycle을 CS-682의 C-11, C-9, C-12 세곳에 위치에 축합하기 위해서 출발물질 7-3-0에 (DCC+DMAP)의 축합조건을 이용하여 7-3-1, 7-3-2, 7-3-3, 7-3-4, 7-3-5를 합성하였음.

Compound 7-3-1: yield 12%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.90 (s, 2H), 8.86 (s, 1H), 5.65-5.57 (m, 2H), 5.47-5.41 (m, 2H), 4.23-4.17 (m, 2H), 3.85-3.77 (m, 2H), 3.48-3.44 (m, 2H), 3.26 (s, 3H), 2.86-2.80 (m, 2H), 2.48-3.39 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.07-1.99 (m, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.02 (s, 3H); MS  $m/z$  860(M+H) $^+$ .

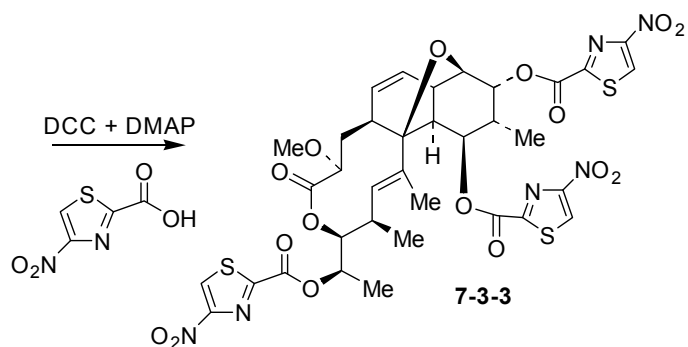
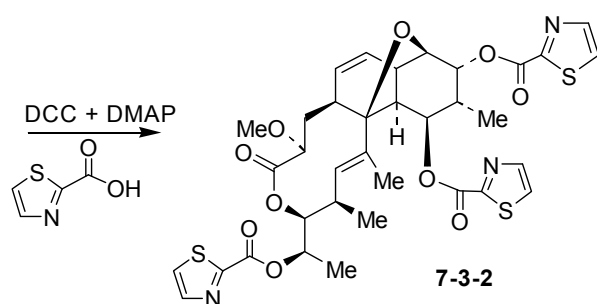
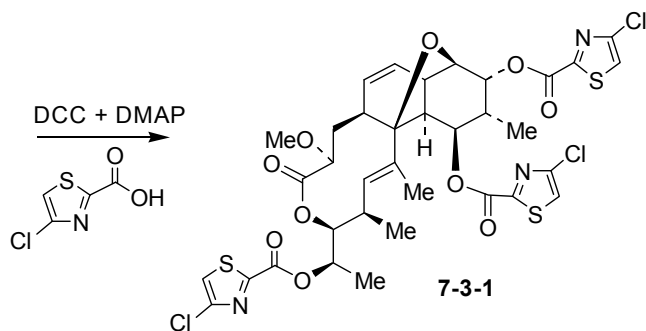
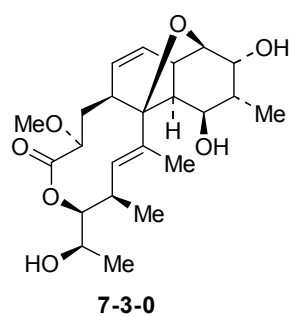
Compound 7-3-2: yield 10%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.93-8.98 (br s, 3H), 5.63-5.57 (m, 2H), 5.42 (m, 1H), 4.48-4.41 (m, 2H), 4.14-4.09 (m, 2H), 3.87-3.80 (m, 2H), 3.46-3.40 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 2.63-2.55 (m, 1H), 2.35-3.30 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.09-1.98 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.319 (s, 3H), 1.04 (s, 3H); MS  $m/z$  756(M+H) $^+$ .

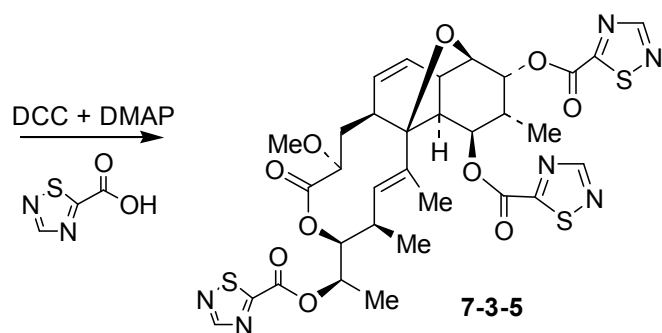
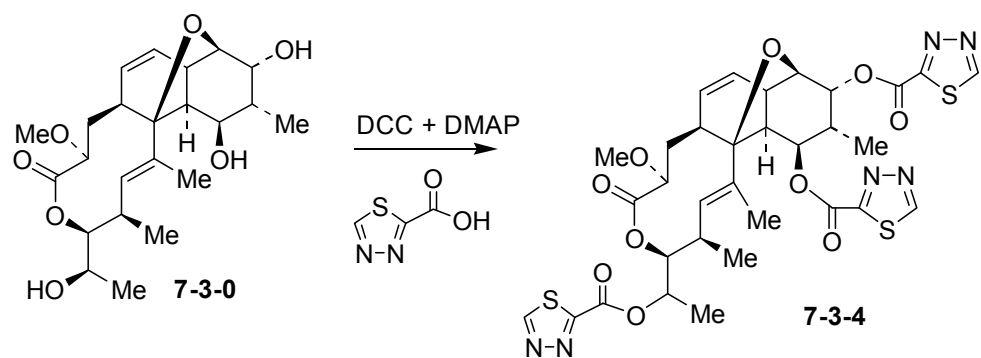
Compound 7-3-3: yield 15%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.94-8.98 (br s, 3H), 5.63-5.57 (m, 2H), 5.47 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 4.26-4.19 (m, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.80-3.71 (m, 2H), 3.45 (m, 1H), 3.17(s, 3H), 2.72-2.65 (m, 2H), 2.39-2.34 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.02-1.99 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.03 (s, 3H); MS  $m/z$  891(M+H) $^+$ .

Compound 7-3-4: yield 9%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.03-9.09 (br s, 3H), 5.66-5.58 (m, 2H), 5.42 (m, 1H), 4.26-4.19 (m, 2H), 4.08-4.03 (m, 1H), 3.81-3.74 (m, 2H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.61-2.56 (s, 1H), 2.38-2.33 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.07-2.02 (m, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.06 (s, 3H); MS  $m/z$  759(M+H) $^+$ .

Compound 7-3-5: yield 13%;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  9.00-9.04 (s, 3H), 5.63-5.56 (m, 2H), 5.42-5.37 (m, 2H), 4.23-4.16 (m, 1H), 4.08-4.03 (m, 1H), 3.91-3.84 (m, 2H), 3.49-3.42 (m, 1H), 3.19 (s, 3H), 2.68-2.60 (m, 1H), 2.43-2.35

(m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.12-2.06 (m, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.10 (s, 3H);  
MS  $m/z$  759(M+H)<sup>+</sup>.







Organism(24시간)(0FU/ml)	Nargenicin	Vancomycin	Nargenicin 용도별											
			#7-11	#7-9	#7-7	#7-5	#7-3	#6-12	#6-19	#4-22	#3-8	#2-15		
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8760	>80	>80	40	>80	>80	>80	40	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>80	1.25	80	>80	>80	>80	40	>80	80	>80	80	>80	>80	>80
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC	>80	0.15	2.5	>80	>80	>80	10	>80	80	>80	80	>80	>80	>80
<i>Staphylococcus aureus</i> KC TC1928	0.31	5	2.5	0.15	0.15	5	5	>80	10	40	>80	>80	>80	
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.625	0.625	2.5	0.15	0.15	5	1.25	>80	80	>80	80	>80	>80	
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 9341	>80	2.5	5	>80	>80	80	10	>80	80	>80	80	>80	>80	
<i>Salmonella typhimurium</i> KC TC1926	>80	>80	2.5	80	80	>80	20	>80	80	>80	80	>80	>80	
<i>E. Coli</i> KC TC1923	>80	>80	20	80	>80	>80	40	>80	20	>80	20	>80	>80	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KC TC1697	>80	>80	40	>80	>80	>80	40	>80	>80	10	>80	>80	>80	
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 21069	-	>80	80	>80	40	80	20	>80	80	>80	80	>80	>80	
MRSA 693E	0.15	0.3	1.25	0.15	0.15	5	5	>80	20	>80	20	>80	>80	
MRSA 5-3	0.3	>80	80	20	40	>80	20	>80	80	>80	80	>80	>80	
MRSA 4-21	-	>80	80	80	40	>80	20	>80	80	>80	80	>80	>80	
VRE 89	>80	>80	80	40	>80	80	20	>80	80	80	>80	>80	>80	
VRE 98	>80	>80	80	>80	>80	40	20	>80	80	>80	80	>80	>80	

		HJH-7-2 -10	HJH-7-3 -1	HJH-7-3 -2	HJH-7-3 -3
	Organism(24 h (10 <sup>6</sup> CFU/ml))	FW-647	FW-860	FW-756	FW-891
1	<i>Alacligenesfaecalis</i>	20	20	20	40
2	<i>EnterococcusFaecalis</i>	40	5	>80	40
3	<i>Bacillus subtilis</i>	5	2.5	1.25	2.5
4	Staphylococcus aureus	5	10	2.5	5
5	<i>Micrococcusluteus</i>	5	5	10	5
6	<i>Mycrobacterium smegmatis</i>	10	5	10	10
7	<i>Salmonellatyphimrium</i>	20	20	20	40
8	<i>Escherrichia coli</i>	20	20	20	40
9	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	20	20	20	40
10	MRSA 693E	5	5	1.25	5
11	MRSA 4-5	10	5	2.5	5
12	MRSA 5-3	5	2.5	2.5	2.5
13	VRE 82	20	2.5	80	40
14	VRE 89	20	10	>80	40
15	VRE 98	20	5	>80	40
16	VRSA	20	5	2.5	40

		HJH-7-3 -4	HJH-7-3 -5	CS-682
	Organism 24 h (10 <sup>6</sup> CFU/ml)	FW-759	FW-759	
1	<i>Alacligenesfaecalis</i>	>80	40	>80
2	<i>EnterococcusFaecalis</i>	>80	40	>80
3	<i>Bacillus subtilis</i>	40	20	>80
4	Staphylococcus aureus	0.6	10	1.25
5	<i>Micrococcusluteus</i>	0.3	40	0.3
6	<i>Mycrobacterium smegmatis</i>	>80	20	>80
7	<i>Salmonellatyphimrium</i>	>80	40	>80
8	<i>Escherrichia coli</i>	>80	20	>80
9	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	>80	40	>80
10	MRSA 693E	20	10	1.25
11	MRSA 4-5	80	10	10
12	MRSA 5-3	40	20	>80
13	VRE 82	>80	40	>80
14	VRE 89	>80	80	>80

15	VRE 98	>80	80	>80
16	VRSA	>80	80	>80

		HJH-7-2- 2	HJH-7-2- 4	HJH-7- 2-6	HJH-7- 2-8
	Organism (24 h (10 <sup>6</sup> CFU/ml))	FW-713	FW-765	FW-735	FW-647
1	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC1004	>80	>80	>80	>80
2	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	40	>80	>80	>80
3	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	10	10	>80	>80
4	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1928	5	40	>80	2.5
5	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	20	40	>80	1.25
6	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC9341	>80	>80	>80	>80
7	<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC1925	40	>80	>80	>80
8	<i>Escherichia coli</i> KCTC1923	40	>80	>80	>80
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC	80	>80	>80	>80
10	MRSA 693E	20	20	>80	0.625
11	MRSA 4-5	20	40	>80	2.5
12	MRSA 5-3	20	20	>80	0.625
13	VRE 82	40	20	>80	>80
14	VRE 89	80	80	>80	>80
15	VRE 98	80	80	>80	>80
16	VRSA	10	20	>80	>80

## 7. Nargenicin 유도체 5종의 MTT assay(세포독성 확인)

Nargenicin 유도체에 의한 세포 생존율 변화를 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시함. Raw 264.7 세포주를  $1 \times 10^5$  cells/ml로 맞추고 96 well plate에 각각 100  $\mu$ l씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 nargenicin 유도체를 각각 세포주에 처리하였음. 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5mg/ml) 용액을 10  $\mu$ l씩 첨가하여 다시 1시간 동안 배양 시킴. Formazan 형성을 확인한 후, 배지를 완전히 제거하고, well 바닥에 형성된 formazan을 녹이기 위해 100  $\mu$ l의 DMSO를 첨가한 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 조각인 추출물을 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포생존 변화를 나타내었음.

처음 실험 진행 시 100  $\mu$ M을 최고 농도로 지정하여 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M 순으로 농도별 처리 후 세포독성을 확인하였으며, 이 중 HJH-09-148을 제외한 나머지 4종의 시료에서 세포독성이 강한 것으로 나타나 각각의 시료별 농도를 재구성.

- ① HJH-09-142 (0.1, 0.2, 0.5, 1,  $\mu$ M)
- ② HJH-09-146 (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1  $\mu$ M)
- ③ HJH-09-148 (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400  $\mu$ M)
- ④ HJH-09-150 (0.5, 1, 5, 10, 25  $\mu$ M)
- ⑤ HJH-10-156 (0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu$ M)

위와 같이 농도 재 구성 후 Raw 264.7 cell에 처리

- 24시간 incubation 뒤 medium 제거
- serum free medium+MTT(0.2 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l change
- 30분 뒤 상층 제거 후 DMSO 100 $\mu$ l 넣고 pipetting
- 흡광도 540nm 측정

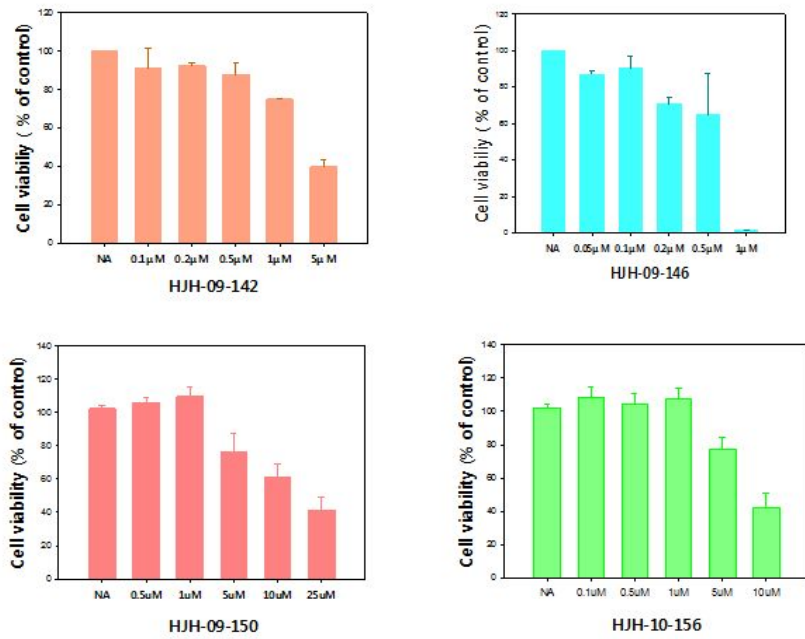
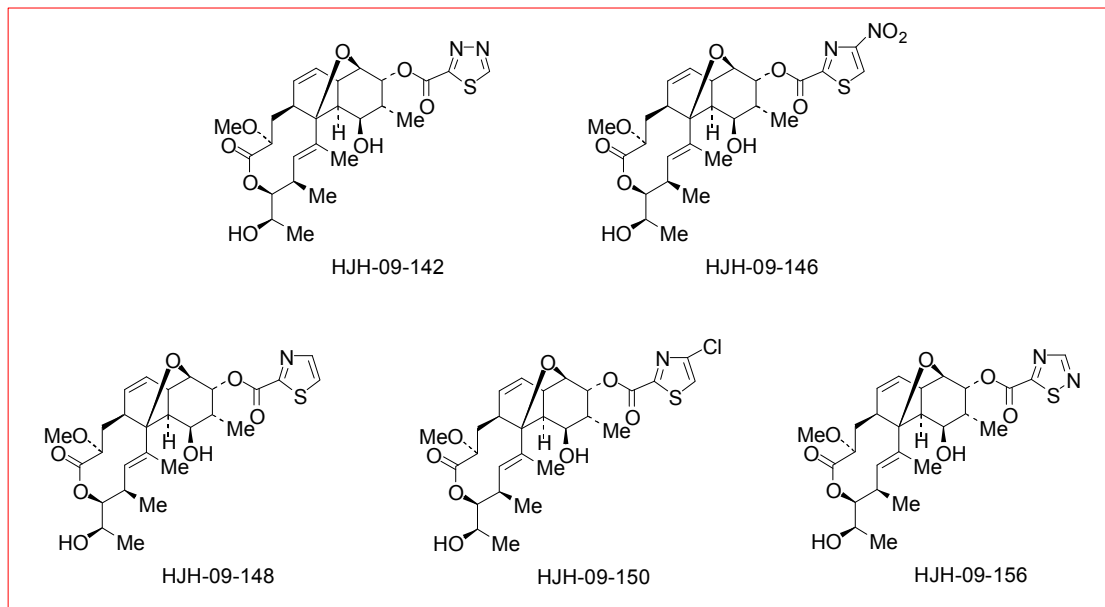


Fig. 1. Nargenicin 유도체의 Raw 264.7 세포에 대한 세포 독성



※ 결과 ※

HJH-09-142 : 5  $\mu$ M에서 40% 정도의 cell viability가 확인되며, 그 농도를 기준으로 다음 실험 진행

HJH-09-146 : 1  $\mu$ M에서 세포 독성이 심하였으며, Nargenicin 유도체 5종 중 세포 독성에 있어서 가장 심한 물질로 확인됨.

HJH-09-148 : 400  $\mu$ M에서도 세포 독성이 심하지 않으며, Nargenicin 유도체 5종 중 세포 독성에 있어서 가장 안정적으로 확인됨.

HJH-09-150 : 10  $\mu$ M 이후부터 세포 독성이 크게 작용하는 것으로 확인되어, 10  $\mu$ M을 기준으로 다음 실험 진행

HJH-10-156 : 10  $\mu$ M부터 세포 독성이 크게 작용하는 것으로 확인

⇒ Nargenicin 유도체 5종 중 가장 세포 독성이 큰 물질은 HJH-09-146 였고, 세포 독성에 있어서 가장 안정적인 것으로 생각되는 물질은 HJH-09-148임. 나머지 3종의 물질들은 비슷한 농도에서 세포 독성을 보이는 것으로 확인됨.

#### 8. Nargenicin 유도체 5종의 항염효과 측정(Nitrite Oxide Production)

세포 독성 실험으로 영향을 주지 않는 농도가 확인된 Nargenicin 유도체 5종 각각의 농도와 LPS 1 $\mu$ g/ml을 Raw 264.7 cell에 동시 처리 후 griess reagent(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) assay 통해 NO 생성량 확인. Raw 264.7 cell을 96 well plate에 cell culture

→ Nargenicin 유도체 5종 각각의 농도와 LPS 1 $\mu$ g/ml을 동시 처리

→ 18시간 incubation

→ medium 100 $\mu$ l + Griess reagent 100 $\mu$ l

→ 암실에서 15분 incubation 후 흡광도 540nm 측정

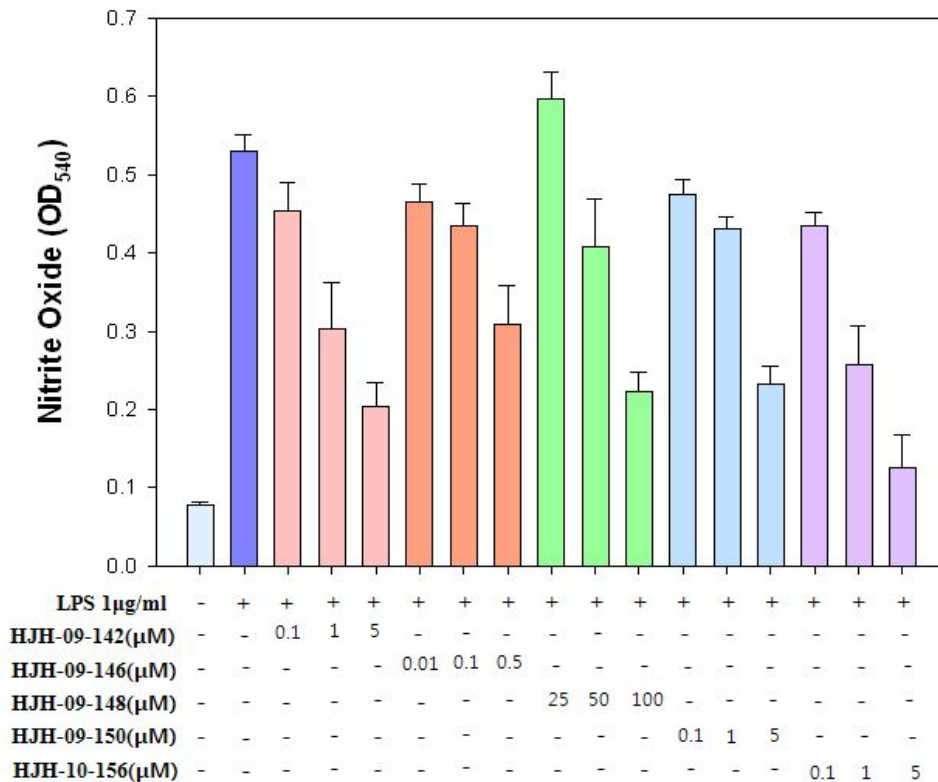


Fig. 2. Nargenicin 유도체의 NO 생성 변화

※ 결과 ※

NO는 혈관확장, 신경전달, 혈소판응집억제, 염증반응의 매개 등 매우 다양한 기능을 갖고 있으며, 또한 체내로 침입한 미생물 및 암세포에 대한 직접적인 살상기능을 갖고 있는 것으로도 알려져 있음. NO에 의해 IL-2, IL-3 등의 cytokine 분비는 억제되며, TNF- $\alpha$ , IL-1 등의 생성은 촉진되는데, 이러한 작용에 의해 T 임파구 및 NK 세포 등의 기능이 조절된다는 등 NO가 생체 내에서 면역조절물질로서 작용한다는 것이 밝혀짐으로써 한층 그 중요성이 부각되었음. NO는 주로 대식세포가 활성화되어 생성되는 바, 본 연구에서는 Nargenicin 유도체에 의해 대식세포를 활성화하여 NO를 생성하게 하는지 조사하였음. Fig. 2에 나타난 바와 같이LPS에 의해 증가된 NO 생성량이 Nargenicin 유도체 5종을 동시 처리하였을 경우 모두 억제됨을 확인. 각각의 Nargenicin 유도체들의 고농도 처리 시에는 절반 정도로 억제되는 것을 볼 수 있으며, 이것으로 보아 Nargenicin 유도체 5종 모두 항염효과가 있는 것을 알 수 있음.

## 9. Nargenicin 유도체 5종의 항염증 단백질 western blot

HJH-09-146, HJH-09-148, HJH-09-150 3종에 대한 항염증 관련 western blotting 진행

### ① western blotting에 사용할 sampling 진행

Raw 264.7 cell에 HJH-09-146, HJH-09-148, HJH-09-150 각각의 농도 처리

- 24시간 후 medium 제거하고 cell 회수
- lysis buffer를 넣고 cell lysis 진행(vortex)
- 12000 rpm, 20 min, 4 °C centrifuge 진행 후 상층액 회수
- Bradford assay를 통해 protein 정량
- western blot sample loading buffer + 20 $\mu$ g의 protein mix
- western blot sampling 완료

### ② western blotting

10% Running gel - 30% acrylamide mixture, 1.5M Tris-HCl(pH 8.8), 10% SDS,  
10% Ammonium Persulfate, TEMED

Stacking gel - 30% acrylamide mixture, 1.0M Tris-HCl(pH 6.8), 10% SDS,  
10% Ammonium Persulfate, TEMED

- western gel을 만들고 western running buffer를 채움
- 미리 준비한 western blot sample loading
- 100V, 400mA로 western blot 진행
- loading 종료 후 gel의 protein band를 membrane으로 transfer 진행
- membrane을 5% Skim milk로 1시간 blocking
- washing buffer로 membrane washing (10분씩 3회 반복)
- 1st antibody(iNOS) overning, 2nd antibody(anti-rabbit) 2시간 incubation
- ECL solution을 사용하여 해당 size의 band 확인
- actin 확인 위해 해당 antibody도 incubation 진행 후 AP solution으로 band 확인



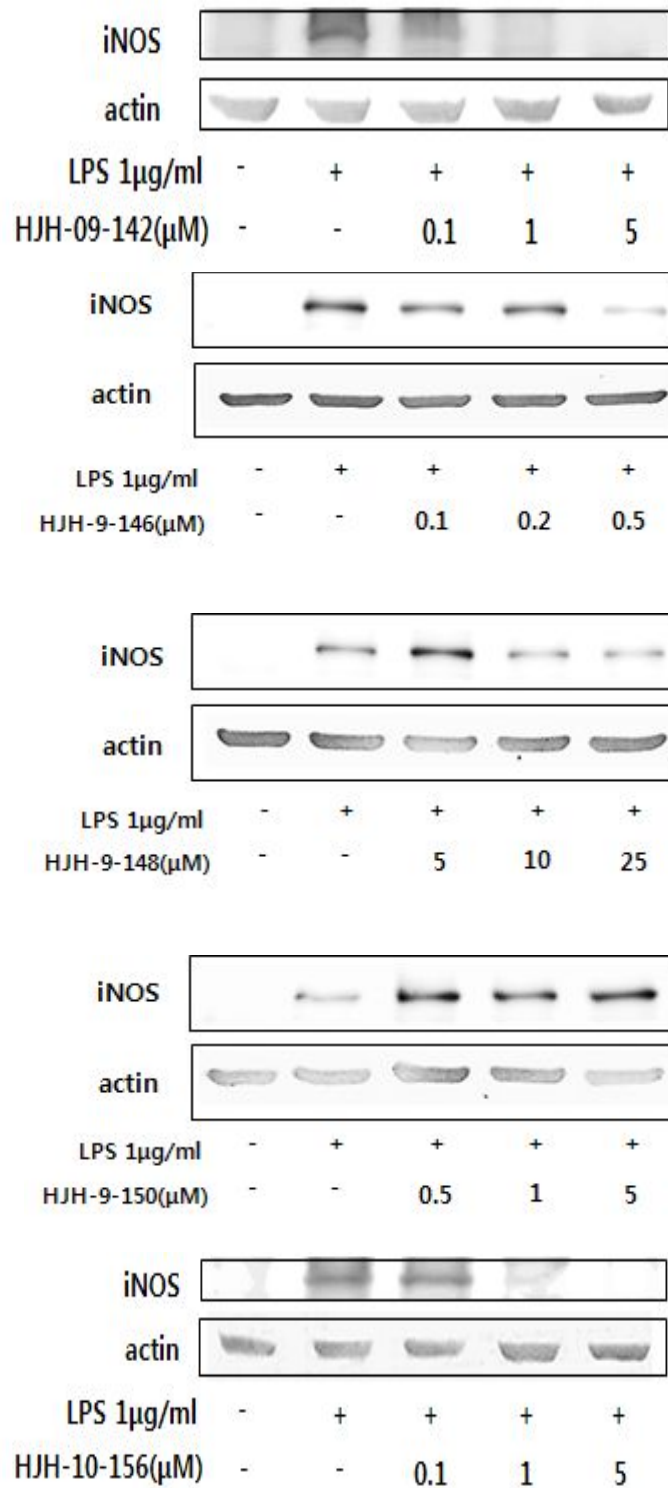


Fig. 3. Raw 264.7 세포에 Nargenicin 유도체 처리 시 iNOS의 발현 변화

※ 결과 ※

- HJH-09-142 : 농도별 처리 후 iNOS protein expression에 미치는 영향을 확인한 결과, 저 농도에서 고 농도로 갈수록 농도 의존적으로 iNOS expression이 억제됨.
- HJH-09-146 : 저농도에서도 cell에 독성을 보였던 유도체였으며, 독성이 없는 최소한의농도를 처리한 결과 상대적으로 가장 낮은 농도에서 농도의존적으로 iNOS expression이 억제되는 것을 확인.
- HJH-09-148 : 유일하게 cell에 독성이 나타나지 않았던 유도체로써, 농도를 조금 높게 처리하였고 농도의존적이긴 하나 다른 유도체들에 비해 높은 농도로 처리할수록 iNOS expression에 영향을 나타냄.
- HJH-09-150 : HJH-09-142와 똑같은 농도로 처리하였으며, 역시나 농도의존적으로 iNOS expression을 억제함.
- HJH-10-156 : HJH-09-142와 똑같은 농도로 처리하였으며, 이 유도체 역시 농도 의존적으로 iNOS expression을 억제함.

⇒ 농도에 있어서는 다소 차이가 많이 나지만, 5종의 Nargenicin 유도체 모두 iNOS protein expression에 영향을 미치어 Negative control과 비슷한 level까지 발현을 억제시키는 것으로 확인됨.

## 제4절 : 제1협동과제

### (CS682 발효물의 기능성검증 및 임상 독성 평가)

연구 책임자 : 김 종 춘

#### 1. 육계를 이용한 CS682의 기능성 검증

CS682의 육계용 기능성 보조사료로서의 기능성을 검증하기 위해 초생추를 2007년 전북 정읍시 자연부화장으로부터 구입하여 전남대학교 실험동물사에서 사육함. 초생추에 28일간 0.1%, 1%의 농도로 사료(육계전기, ㈜대한사료)에 첨가, 급여하여 질병 예방기능, 성장기능, 사료효율기능 및 안전성 평가를 실시한 결과, 위장관계 기능 장애를 일으키지 않고, 생체대사에 영향을 미치지 않으면서, 사료효율을 높이는 것으로 나타남.

시험 전 기간을 거쳐 이상증상 및 소화기계 증상이 나타나지 않았으며, 일부 개체에서 싸움에 의한 탈모 및 출혈이 보였으나, 이는 군집사육에 의한 서열싸움에 기인한 것으로 보임.

CS682 투여 후 14일째에는 각 군간에 증체량 및 사료효율에서 차이가 미미하였으나, 28일째에는 대조군에 비해 0.1% 군은 115.64, 1%군은 122.49%의 사료효율을 보여 각 군간에 큰 차이를 나타내었음. 그리고 28일째 각 군에서 채혈한 혈액의 기본 혈구 검사를 실시한 결과, 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않고 모두 정상 범위를 나타낸 것으로 보아 CS682는 생체대사에 영향을 미치지 않는 것으로 보임.

결론적으로 초생추에서 CS682의 사료첨가는 0.1% 및 1% 용량에서 생체대사에 영향을 미치지 않고, 소화기 이상 증상을 유발하지도 않으면서 사료효율을 효과적으로 증가시키는 것으로 나타남. 본 결과를 토대로 육계에서 안전하게 사료효율을 증가시킬 목적으로 CS682의 사료첨가가 효과적일 것으로 생각됨.

#### 2. 랫드를 이용한 CS682의 경구투여 급성독성시험

CS682의 단회 경구투여에 의한 급성독성 잠재력을 평가하기 위해 랫드에게 0, 2.5, 5 및 10 ml/kg 용량으로 1회 경구투여한 후 일반증상과 사망률, 체중, 부검소견 및 조직병리소견을 관찰한 결과, CS682는 랫드에게 일반증상과 사망, 체중, 부검소견 및 조직병리소견에 어떠한 영향도 끼치지 않은 것으로 나타남.

시험기간 중 투여군의 암수동물에서 소수 관찰된 적색유루와 탈모 소견은 발생

빈도가 낮았고, 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 투여와는 관련이 없는 것으로 판단됨. 상기 소견들은 정상적인 Sprague-Dawley 랫드에서도 흔히 관찰되는 소견이며, 군집사육에 의한 스트레스나 싸움 등 여러 원인에 의해 발생할 수 있다고 알려져 있음(Kim 등, 2002; Burn 등, 2006). 시험기간 중 상기한 일반증상 이외에는 사망이나 체중의 변화는 인정되지 않았으며, 부검 및 조직병리학적 관찰에서도 독성학적 소견은 관찰되지 않았음. 따라서 본 시험물질의 최소치사량은 암수 모두 10 ml/kg 이상으로 평가됨.

일반적으로 화학물질의 상대 독성정도는 반수치사량(median lethal dose, LD<sub>50</sub>)에 의해 평가됨. Hodge와 Sterner (1949)의 급성독성 분류에 의하면, 경구반수치사량이 체중 kg당 1 mg/kg 이하이면 맹독성 물질이며, 1-50 mg/kg 이면 중등도 독성물질, 500-5,000 mg 이면 약한 독성물질, 5,000~15,000 mg 이면 실질적인 무독성물질, 그리고 15,000 mg/kg 이상이면 상대적으로 무해하다고 함. 미국 환경보호청(US EPA, 1998)에서도 경구투여 반수치사량이 체중 kg당 500-5,000 mg (class III) 이면 약한 독성물질이고, 5,000 mg 이상(class IV)이면 무해한 물질로 분류하고 있음. 상기한 기준에 의거하여 볼 때, CS682의 경구반수치사량은 10 ml/kg (비중이 1 일 경우 10,000 mg/kg)을 상회하기 때문에 실질적인 무독성 물질로 사료됨.

결론적으로 랫드에 CS682의 단회경구투여는 10 ml/kg 이하의 용량에서 어떠한 부작용도 초래하지 않으며, 최소치사량은 암수 모두 10 ml/kg을 상회하는 것으로 나타남. 본 시험 결과는 CS682가 매우 안전한 물질이라는 것을 보여주며, 사료첨가제로써 개발가능성을 제시함.

### 3. 이유자돈을 이용한 CS682의 기능성 검증

기능성 사료로서 CS682 발효물의 효능을 검증하기 위해 2008년 이유자돈을 공시하여(재환축산, 전남 나주시 노안면 유곡리 산54) 기본 배합 사료(돈의보약 골드, 돈의보약 2호, 돈의보약 3호를 주령에 따라 단계별 급여, (주)비타바이오)에 28일간 0.1%의 농도로 사료에 첨가하여 급여 한 후 질병예방기능, 성장기능, 사료효율기능 및 안전성 평가를 실시한 결과, CS682의 급여군은 대조군에 비해 체중이 다소 증가하였고, 사료효율도 개선된 것으로 확인되었음. 본 실험에서는 실험에 사용된 이유자돈의 초기 체중이 이후의 실험결과에 영향을 줄 수 있다는 예비 실험을 토대로 실험군으로 대조군에 비해 시험개시시 체중이 낮은 군(0.1%-1)과 높은 군(0.1%-2)의 2개 군을 두어 실험을 수행하였음. 실험결과, 2개 실험군 모두 대조군에 비하여 높은 사료효율을 나타냈음을 확인할 수 있었음. 결론적으로 CS682 발효물은 이유자

돈의 성장을 촉진하고 사료효율을 개선하는 효과가 있는 것으로 판단되며, 사료첨가제로서 개발가능성을 확인하였음.

#### 4. 랫드를 이용한 CS682의 경구투여 아급성독성시험

CS682 발효물의 아급성독성을 평가하기 위해 국립수의과학검역원고시 제2007-5호(2007. 1. 22) “동물용의약품등독성시험지침”에 준하여 랫드 아급성독성시험 수행한 결과, Table 1-18에서 보는 바와 같이 1,000 mg/kg/day 이하의 용량으로 CS682의 반복 경구투여는 랫드의 일반증상과 체중, 사료섭취량, 안 및 요소건, 혈액, 혈청생화학, 부검소견, 장기중량 및 주요 장기의 조직병리에 어떠한 독성영향도 나타내지 않았음. 본 시험조건 하에서 CS682의 무영향량(no-observed-effect level)은 1,000 mg/kg/day로 산출됨. 결론적으로 본 시험결과는 CS682가 독성이 없는 안전한 물질이라는 것을 암시해주며, 사료첨가제로서의 개발가능성을 제시함.

#### 5. 육성돈을 이용한 CS682의 기능성 검증

CS682 발효물의 기능성 검증을 위해 평균체중 30 kg인 육성돈(3원 교잡종 L x Y x D)을 공시하여(재환축산, 전남 나주시 노안면 유곡리 산54) 일반 육성돈 사료(큐맥스 육성돈, 팜스토리 도드람 B&F)만을 급여한 대조군과 CS682 투여군 1(일반사료 톤당 1 kg 혼합) 및 CS682 투여군 2(일반사료 톤당 2 kg 혼합)의 3개 시험군으로 하여 질병예방기능과 성장촉진기능 및 사료효율 개선 기능을 평가함. 3차 년도에는 본 연구과제의 참여기업인 대한뉴팜의 요청으로 군당 개체수를 50마리에서 360마리(총 약 1080마리)로 증가시켰고, 실험기간을 60일에서 120일로 변경하여 육성전기와 육성후기 및 출하 시기까지의 질병예방기능, 성장기능, 사료효율 및 도체성적 까지 평가하는 것으로 계획하여 시험을 진행함. 따라서 많은 수의 육성돈을 이용한 장기간의 시험을 원활하게 수행하기 위해서 3차년도와 4차년도에 걸쳐 육성돈에 대한 기능성을 검증하고자 하였으며, 최종 결과는 4차 년도에 제출하였음.

#### 6. 랫드를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 급성독성시험

랫드에게 CS682 순물질을 0, 320, 800 및 2,000 mg/kg의 용량으로 단회 경구투여한 후 14일간의 시험기간 동안 사망동물을 관찰한 결과, 시험물질의 투여에 기인

된 사망동물은 관찰되지 않았음. 따라서 본 시험물질의 최소치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 확인되었음.

시험기간 중 암수동물의 일반증상을 관찰한 결과, 대조군과 320 및 800 mg/kg 투여군의 암수동물에서는 시험기간 중 어떠한 이상소견도 관찰되지 않음. 반면, 2,000 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 수컷 4마리와 암컷 2마리, 그리고 투여 후 익일에는 수컷 2마리와 암컷 1마리에서 침울(depression)이 관찰됨. 그러나 이 소견은 투여 후 2일째부터는 관찰되지 않음.

시험기간 중 암수동물의 체중을 측정된 결과, 시험물질의 투여에 기인되어 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았으나 암수 모두 투여용량의 증가에 따라 미약한 체중증가의 억제가 인정되었고, 고용량군 암수동물의 증체량은 대조군에 비해 약 5-9% 감소함. 이는 시험물질 투여 후 익일의 체중이 대조군에 비해 감소한 것이 원인이었으며, 그 이후의 증체량은 대조군과 유사하여 회복성이 인정됨.

투여 후 14일째에 모든 동물을 부검하여 육안적 이상 유무를 관찰한 결과, 시험물질의 투여에 기인된 어떠한 변화도 인정되지 않았음. 부검 시 모든 암수동물의 간과 신장, 부신, 비장, 흉선, 폐, 심장 및 뇌를 적출하여 조직학적 이상유무를 관찰한 결과, 모든 장기에서 시험물질의 투여에 기인된 어떠한 조직변화도 인정되지 않았음.

결론적으로 랫드에 CS682 순물질의 단회경구투여는 2,000 mg/kg 용량에서 일시적인 침울과 체중증가량의 억제를 유발하나 회복성이 인정되었으며, 800 mg/kg 이하에서는 어떠한 부작용도 초래하지 않음. 또한, CS682 순물질의 최소치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 나타남. 따라서 본 시험 결과는 CS682 순물질이 단회 투여 시 안전한 물질이라는 것을 보여주며, 사료첨가제로써 개발가능성을 제시함.

## 7. 육성돈을 이용한 CS682의 기능성 검증

CS682의 기능성 보조사료로서의 기능성을 검증하기 위해 2010년 육성돈을 공시하여(재환축산, 전남 나주시 노안면 유곡리 54) 사료(큐맥스 육성돈, 팜스초리 도드람 B&F) 톤당 1% CS682를 1 kg 투여한 F1 실험군(344마리), 그리고 사료 톤당 1% CS682 및 5% 모아이스트<sup>®</sup>를 1 kg 투여한 F2 실험군(349마리)으로 시험군으로 구성하여 육성돈에 60일 동안 급여하였고, 육성기와 비육기 동안의 질병예방기능, 성장기능, 사료효율기능 및 도체성적을 비교하였음.

CS682의 사료첨가 실험에서, 육성기 동안 임상적으로 특이한 부작용 없이 대조

군에 비하여 F1과 F2군에서 높은 사료효율을 나타냈으며 F2군에서의 사료효율이 F1군보다 더 높았음. 비육돈에서의 도체성적 중 도체등급에서는 거세돈 중 F1군이 가장 좋았으며, 전체적으로는 F1군이 대조군보다 더 우수하였고, F2군과는 유의적인 차이를 보여주었음. 도체중에서는 F1의 암태지, 거세돈 및 전체에서 대조군보다 높고, F2군보다 유의적으로 높은 체중을 나타내었음. 등지방두께는 대조군보다 F1과 F2의 전체에서 유의적으로 얇았음. 따라서 CS682만을 첨가한 F1군보다 CS682와 모아이스트<sup>®</sup>를 함께 첨가한 F2군이 육성기 때 사료효율은 높으나, 도체성적에서는 F1군이 더 뛰어난 결과를 보였음. 결론적으로 육성기에 CS682의 단독 사료첨가는 폐사율과 도태율을 감소시키고 사료효율을 높였으며, 비육기에도 폐사율과 도태율을 감소시켰고, 출하 시에 도체성적을 높이는 효과를 나타내었음.

#### 8. 마우스를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 아급성독성시험

CS682 순물질의 아급성독성을 평가하기 위해 국립수의과학검역원고시 제2007-5호(2007. 1. 22) “동물용의약품등독성시험지침”에 준하여 마우스 아급성독성시험을 수행함. CS682 순물질을 마우스에게 0, 100, 300 및 1,000 mg/kg/day로 21일간 반복 경구투여하고, 일반증상 관찰과 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 요검사, 혈청생화학검사, 부검소견, 장기중량 및 조직병리학적 검사를 실시한 결과, 시험물질의 투여에 기인된 이상소견은 인정되지 않음. 따라서 본 시험조건 하에서 CS682 순물질의 무영향량은 1,000 mg/kg/day로 산출됨. 결론적으로 CS682 순물질은 마우스에서 독성이 없는 안전한 물질이라는 것을 암시해주며, 사료첨가제로서의 개발가능성을 제시함.

#### 9. 육계를 이용한 CS682 순물질의 기능성 검증

CS682 순물질의 기능성 보조사료로서의 효능과 안전성을 평가하기 위해 대조군과 CS682 0.1% 투여군 및 1% 투여군(각 군당 육계 40수)으로 구성하여 28일 동안 사료에 첨가하여 급여함. 시험기간 중에 일반증상과 사망동물을 관찰하고, 체중변화와 사료섭취량, 부검소견, 혈액 및 혈청생화학 검사를 수행하였음. 본 시험에 공시된 시험동물은 2011년 9월 26일 농촌진흥청에서 재래토종닭으로 복원한 맛닭 초생주 66마리(1일령, 평균체중 41g)를 전북 부안 우슬재농장으로부터 구입하여 완전 무작위로 2개 군에 배치하여 전남대학교 실험동물사에 사육함. 사양관리는 온도 21~32℃, 습도 60~70%, 명암 12시간 주기(조명: 08:00~20:00) 및 환기가 잘 되는

평사계사에서 육계의 사양방법에 준하여 3개 군을 동일하게 하였으며, 물과 사료(육계전기, (주)대한사료)를 자유급식함. 육계의 체중변화를 관찰하기 위하여 시험 개시일인 2011년 9월 26일 및 시험 2주째인 2011년 10월 10일 및 시험 종료일인 2011년 10월 24일 총 3회 체중을 측정하였고 시험기간 중 매일 1회 일반증상과 사망동물을 관찰함.

시험기간 중 매일 1회 이상 공시동물의 일반증상과 사망동물을 관찰하였으나 입식 당일 쇠약하여 대조군으로부터 1마리, 0.1% 투여군과 1%투여군으로부터 각각 2마리를 도태시킨 것을 제외하고는 실험기간 동안에 질병이 발생하거나 사망한 동물은 없었음(Figure 1, Table 1).

A. Day 0



B. Day 14



C. Day 28



Figure 1. Photographs of chickens on day 0, 14 and 28.



**Table 1.** Mortality of chickens fed with diet containing CS682

	Group		
	Control	0.1%	1%
No. of chickens examined	40	40	40
No. of survived chickens at term	39	38	38
Artificial selection	1	2	2
No. of death	0	0	0
Death rate (%)	0	0	0
Survival rate (%)	100	100	100

시험기간 중 육계의 체중변화를 관찰하기 위하여 측정된 입식당일의 전체 체중은 0.1% 투여군과 1% 투여군 모두 대조군보다 낮았음. 그러나 전체 시험기간 동안 대조군은 21792.68 g 체중이 증가한데 비하여 0.1% 투여군은 23432.78 g 증가하여 대조군보다 개체수가 1수 적음에도 군 전체의 증체량이 대조군보다 약 7.5% 높았음(Table 2). 1% 투여군은 시험기간동안 전체 체중이 21672.26 g 증가하여 대조군보다 증체량이 약 120 g 적었으나(Table 2), 개체별 증체율은 대조군의 602.56 g/chicken에 비하여 1% 투여군이 614.10 g/chicken 으로 약 1.9% 높았음(Table 2, 3).

시험기간동안 일당 증체율은 대조군이 19.96 g/chicken/day, 0.1% 투여군이 22.02 g/chicken/day, 1% 투여군이 20.37 g/chicken/day로 시험기간동안 일당 증체율은 대조군보다 0.1% 투여군은 약 10.3% , 1% 투여군은 약 2.0% 높게 나타남(Table 3).

시험기간 동안 섭취한 사료량과 증체율을 통해 조사된 사료효율은 0.1% 투여군이 2.02로 가장 높은 사료효율을 나타냄. 1% 투여군은 일당 증체율에서는 대조군보다 높은 수치를 보였으나 대조군에 비하여 일당 사료섭취량이 많아 사료효율은 2.02로 대조군보다 낮음(Table 3). 이로써 CS682는 0.1% 투여군에서 기능성 보조 사료로서 사료효율을 높이는 것을 확인함.

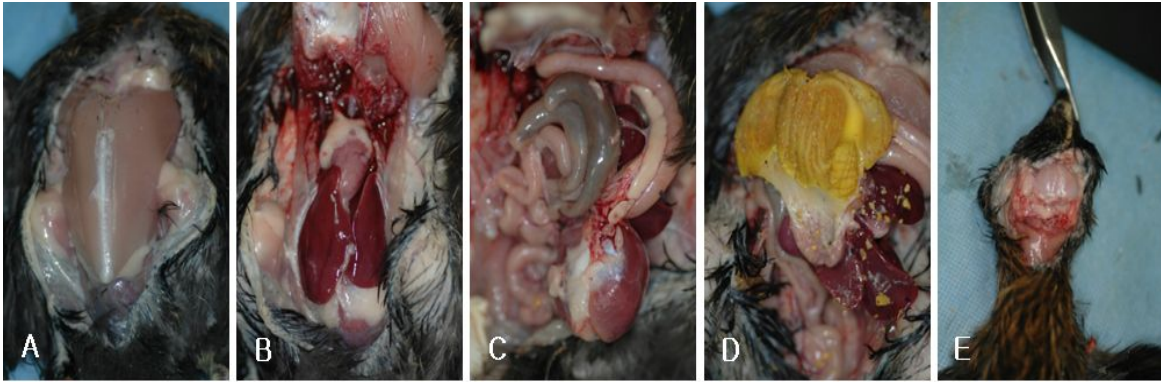
**Table 2.** Body weights of chickens fed with diet containing CS682

	Group			
	Control	0.1%	1%	
No. of chickens examined	39	38	38	
Body weight (g)	Day 0	1707.52	1686.92	1663.64
	Day 14	8884.50	9673.44	8799.92
	Day 28	23500.20	25119.70	23335.90
	Weight gain	21792.68	23432.78	21672.26

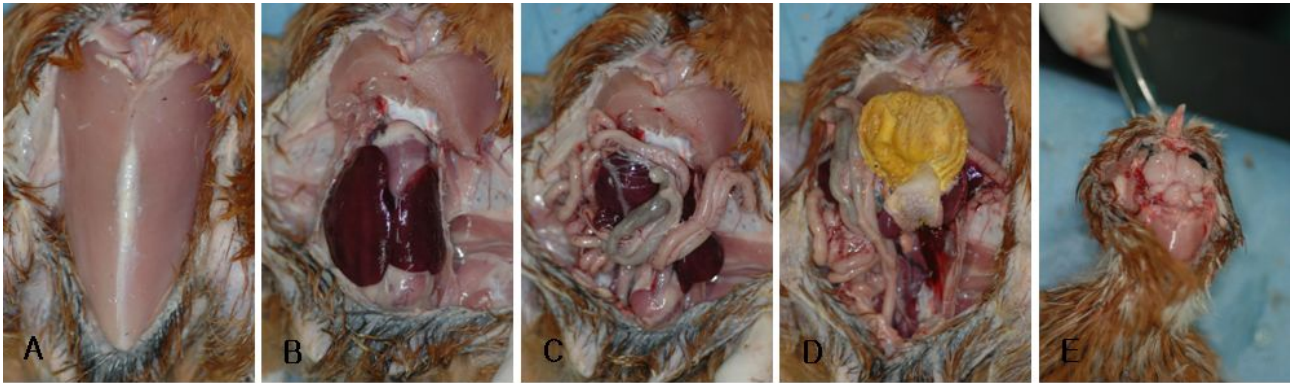
**Table 3.** Feed efficiency of chickens fed with diet containing CS682 (Day 0 to 28)

	Group		
	Control	0.1%	1%
Initial body weight (g/chicken)	43.78	44.39	43.78
Final body weight (g/chicken)	602.56	661.04	614.10
Weight gain (g/chicken/day)	19.96	22.02	20.37
Feed intake (g/chicken/day)	42.35	44.60	44.03
Feed efficiency (feed intake/weight gain)	2.12	2.02	2.16

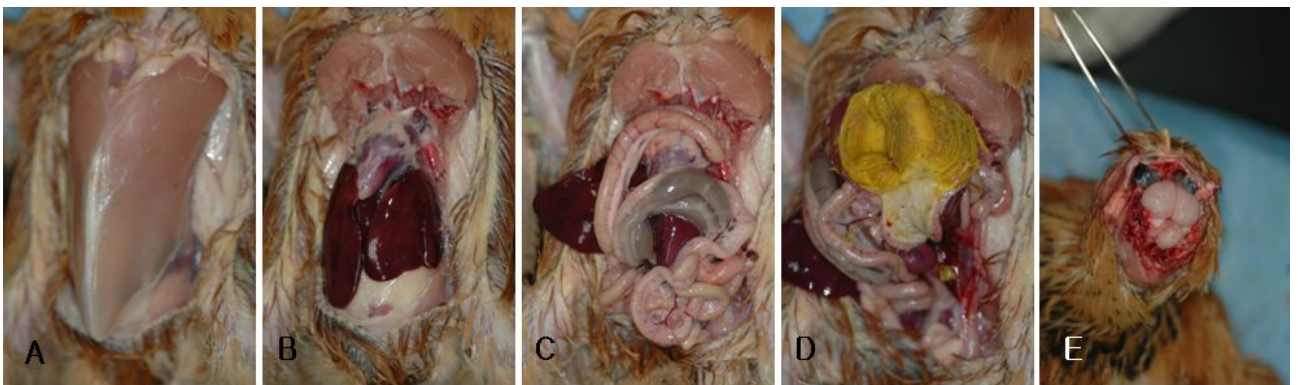
사료 첨가제의 안전성을 평가하기 위해 안락사 후 부검한 결과, 근육과 간, 심장, 장, 근위, 뇌 모두 각 군에서 특이적 소견은 관찰되지 않았음(Figure 2, 3, 4). 혈액검사 결과, 모든 항목의 수치는 정상범위에 있었으며 각 시험군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았음(Table 4). 혈청생화학치 또한 특이적으로 감소하거나 증가한 항목이 관찰되지 않았으며 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 5). 따라서 CS682의 사료첨가 급여는 1% 이하의 농도에서 육계에 특이적인 부작용을 초래하지 않는 안전한 물질로 판단됨.



**Figure 2.** Necropsy findings of the control group (A : muscles, B : heart and liver, C : intestine, D : gizzard, E : brain).



**Figure 3.** Necropsy findings of the 0.1% group (A : muscles, B : heart and liver, C : intestine, D : gizzard, E : brain).



**Figure 4.** Necropsy findings of the 1% group (A : muscles, B : heart and liver, C : intestine, D : gizzard, E : brain).

**Table 4.** CBC (complete blood count) of chickens (Day 28, n=10)

	Group		
	Control	0.1%	1%
RBC (M/ $\mu$ l)	2.60 $\pm$ 0.09	2.50 $\pm$ 0.23	2.61 $\pm$ 0.28
Hemoglobin (g/dl)	9.40 $\pm$ 0.48	9.07 $\pm$ 0.73	9.29 $\pm$ 1.02
Hematocrit (%)	24.70 $\pm$ 0.67	23.31 $\pm$ 1.71	25.51 $\pm$ 5.60
Leukocyte (K/ $\mu$ l)	9.83 $\pm$ 4.24	6.84 $\pm$ 5.28	9.48 $\pm$ 6.31
Neutrophil (K/ $\mu$ l)	1.44 $\pm$ 0.79	0.93 $\pm$ 1.13	1.54 $\pm$ 1.73
Monocyte (K/ $\mu$ l)	0.95 $\pm$ 0.48	0.65 $\pm$ 0.59	0.09 $\pm$ 0.76
Eosinophil (K/ $\mu$ l)	0.08 $\pm$ 0.06	0.05 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.18
Basophil (K/ $\mu$ l)	0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.04
Platelet (K/ $\mu$ l)	47.40 $\pm$ 5.41	45.50 $\pm$ 12.97	47.86 $\pm$ 7.84

**Table 5.** Blood chemistry of chickens (Day 28, n=10)

	Group		
	Control	0.1%	1%
ALB (g/dl)	1.32 $\pm$ 0.11	1.41 $\pm$ 0.11	1.41 $\pm$ 0.15
ALP (U/L)	2427.22 $\pm$ 1169.53	2836.22 $\pm$ 1513.10	3497.50 $\pm$ 1406.84
BUN (mg/dl)	4.09 $\pm$ 2.54	5.08 $\pm$ 1.92	4.26 $\pm$ 1.24
Calcium (mg/dl)	7.67 $\pm$ 1.07	7.91 $\pm$ 1.13	7.53 $\pm$ 1.17
Cholesterol (mg/dl)	134.98 $\pm$ 13.11	164.88 $\pm$ 10.28	152.72 $\pm$ 18.03
Creatine (mg/dl)	2.52 $\pm$ 0.49	2.49 $\pm$ 0.40	2.56 $\pm$ 0.22
Glucose (mg/dl)	250.40 $\pm$ 13.38	251.49 $\pm$ 10.58	271.62 $\pm$ 25.11
GPT (U/L)	1.27 $\pm$ 0.52	1.53 $\pm$ 0.53	1.46 $\pm$ 0.71
LDH (U/L)	329.86 $\pm$ 33.11	342.08 $\pm$ 25.48	340.23 $\pm$ 38.13
NEFA (mg/dl)	436.34 $\pm$ 140.65	440.84 $\pm$ 159.70	369.60 $\pm$ 155.44
Total protein (g/dl)	3.24 $\pm$ 0.24	3.47 $\pm$ 0.23	3.51 $\pm$ 0.30

## 10. 마우스를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 급성독성시험

CS682 순물질의 단회경구투여 급성독성을 평가하기 위해 암수 마우스에게 CS682 순물질을 0, 800, 2000 및 5,000 mg/kg의 용량으로 단회 경구투여함. 14일간의 시험기간 동안 사망동물을 관찰한 결과는 Table 1에 요약함. 수컷 5000 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 2마리, 투여 후 1일째에 3마리가 사망하였으며, 2000 mg/kg 투여군에서는 투여 후 1일째에 4마리가 사망함. 암컷 2000 및 5000 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 5마리 모두가 사망함. 따라서 본 시험조건에 의한 CS682의 단회 경구투여 반수치사량은 800 mg/kg과 2000 mg/kg 사이에 있는 것으로 나타남.

Table 2에서 보는바와 같이 시험물질의 투여와 관련된 주요 일반소견들은 운동성 감소(decreased locomotion)와 복와위(prone position), 혼수(coma), 횡와위(lying on side), 배와위(dorsal position) 및 사망이었음. 수컷 800 mg/kg 투여군에서는 투여 당일에 운동성감소가 일시적으로 1례 관찰되었음. 수컷 2000 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 운동성 감소(전례)와 복와위(2례)가 관찰되었고, 투여 후 1일째에 사망(4례)이 관찰되었음. 수컷 5000 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 운동성 감소(전례)와 복와위(4례), 혼수(1례), 횡와위(3례), 배와위(2례) 및 사망(2례)이 관찰되었고 투여 후 1일째에 사망(3례)이 관찰되었음. 암컷 800 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 운동성 감소가 일시적으로 2례 관찰되었음. 암컷 2000 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 운동성 감소(전례)와 복와위(2례) 및 사망(전례)이 관찰되었으며, 암컷 5000 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 운동성 감소(전례)와 복와위(전례), 빈사(2례), 횡와위(2례) 및 사망(전례)이 관찰되었음.

시험기간중 암수동물의 체중을 측정된 결과는 Table 3에 나타내었음. 대조군과 800 mg/kg 투여군의 암수동물과 2000 mg/kg 투여군에서 생존한 수컷동물은 시험기간 중 정상적인 체중변화를 나타내었음.

빈사처리 및 사망동물과 계획도살 동물의 부검 시 주요 장기의 육안적 이상 유무를 관찰한 결과(Table 4), 시험물질의 투여에 기인된 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았음.

부검 시 모든 암수동물의 간과 신장, 부신, 비장, 흉선, 폐 및 심장을 적출하여 장기중량을 측정된 결과(Table 5), 모든 장기에서 시험물질의 투여에 기인된 어떠한 중량변화는 인정되지 않았음.

결론적으로 마우스에 CS682 순물질의 단회 경구투여는 2000 mg/kg 이상의 용량에서 사망을 초래하였으며, 800 mg/kg 투여용량에서 투여당일에 일시적으로 미

약한 운동성 감소를 유발하였으나 특이적인 독성영향은 나타내지 않았음. 본 시험 조건하에서 마우스에 대한 CS682 순물질의 반수치사량은 800 mg/kg과 2000 mg/kg 사이로 확인됨.

Table 1. Mortality in male and female mice after a single oral administration of CS682 (n=5)

Dose (mg/kg)	Days after treatment														Mortality (%)	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male																
0	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
2000	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5 (80)
5000	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5 (100)
Female																
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5 (100)
5000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5 (100)

<sup>a</sup> Number of dead animals

Table 2. Clinical findings in male and female mice after single oral administration of CS682 (n=5)

Dose (mg/kg )	Findings	Days after treatment														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male																
0	Appears normal	5 <sup>a</sup>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
800	Appears normal	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Decreased locomotion	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	Appears normal	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Decreased locomotion	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prone position	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Death	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5000	Decreased locomotion	5	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Prone position	4	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Coma	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Lying on side	3	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Dorsal position	2	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Death	2	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Female																
0	Appears normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
800	Appears normal	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Decreased locomotion	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	Decreased locomotion	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Prone position	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Death	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5000	Decreased locomotion	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Prone position	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Coma	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Lying on side	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Death	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

<sup>a</sup> Number of animals with the clinical signs

Table 3. Changes of body weights in male and female mice after single oral administration of CS682 (n=5)

Sex	Days after treatment	Dose (mg/kg)			
		0	800	2000	5000
Male	0	26.9±1.91 <sup>a</sup>	25.6±0.80	27.3±2.54	26.8±1.72
	1	29.9±2.45	29.8±1.11	30.3	–
	3	30.9±1.10	31.6±1.37	29.3	–
	7	31.8±1.02	32.8±1.59	31.6	–
	14	33.3±2.00	34.7±1.63	35.6	–
Female	0	24.1±1.33	24.9±1.59	21.0±1.14	23.2±1.44
	1	26.5±1.46	26.1±1.55	–	–
	3	25.9±0.78	25.3±1.26	–	–
	7	26.3±0.76	25.7±1.82	–	–
	14	27.6±0.69	28.4±1.07	–	–

<sup>a</sup> Values are presented as means±S.D (g).

Table 4. Necropsy findings of necropsy in male and female mice after single oral administration of CS682 (n=5)

Dose (mg/kg)	Male	Female
0	0/5 <sup>a</sup>	0/5
800	0/5	0/5
2000	0/5	0/5
5000	0/5	0/5

<sup>a</sup> Number of animals with abnormal findings/total number of animals examined.



Table 5. Organ weights of male and female mice after single oral administration of CS682 (n=5)

Sex	Dose (mg/kg)	0	800	2000	5000
Male	No. of male rats	5	5	1	–
	Body weight at term	33.3±2.00 <sup>a</sup>	34.7±1.63	35.6	–
	Lung (g)	0.22±0.024	0.20±0.010	0.21	–
	per body weight (%)	0.66±0.044	0.58±0.035	0.59	–
	Adrenal glands (g)	0.006±0.0008	0.005±0.0007	0.006	–
	per body weight (%)	0.017±0.0021	0.015±0.0016	0.016	–
	Liver (g)	1.81±0.107	1.75±0.117	2.26	–
	per body weight (%)	5.43±0.205	5.04±0.308	6.35	–
	Spleen (g)	0.10±0.016	0.10±0.008	0.11	–
	per body weight (%)	0.30±0.042	0.29±0.021	0.31	–
	Kidney (g)	0.56±0.039	0.54±0.059	0.58	–
	per body weight (%)	1.67±0.061	1.57±0.157	1.63	–
	Thymus (g)	0.05±0.017	0.05±0.023	0.06	–
	per body weight (%)	0.16±0.043	0.15±0.077	0.17	–
Heart (g)	0.18±0.016	0.17±0.023	0.17	–	
per body weight (%)	0.54±0.045	0.49±0.048	0.48	–	
Female	No. of female rats	5	5	–	–
	Body weight at term	27.6±0.69	28.4±1.07	–	–
	Lung (g)	0.18±0.030	0.18±0.012	–	–
	per body weight (%)	0.64±0.096	0.63±0.027	–	–
	Adrenal glands (g)	0.008±0.0010	0.009±0.0006	–	–
	per body weight (%)	0.028±0.0041	0.031±0.0015	–	–
	Liver (g)	1.47±0.169	1.54±0.024	–	–
	per body weight (%)	5.31±0.565	0.39±0.169	–	–
	Spleen (g)	0.10±0.016	0.10±0.010	–	–
	per body weight (%)	0.37±0.060	0.35±0.029	–	–
	Kidney (g)	0.36±0.029	0.37±0.015	–	–
	per body weight (%)	1.32±0.118	1.30±0.071	–	–
	Thymus (g)	0.08±0.019	0.09±0.025	–	–
	per body weight (%)	0.30±0.066	0.30±0.081	–	–
Heart (g)	0.18±0.038	0.13±0.009	–	–	
per body weight (%)	0.65±0.138	0.44±0.030	–	–	

<sup>a</sup> Values are presented as means±SD.

## 제5절 : 제2협동과제 (CS682 고 생산균주 개발 및 사업화)

연구 책임자 : 우 진 석

### 1. Nargenicin의 생합성 유전자의 클론 및 생합성

클론된 pBR9의 염기서열분석

여러개의 분리된 클론중에 pBR9 및 pBR8을 염기서열 분석하였다. 크기는 총 39.40 kb로 총 26개의 orf를 분석.

클론된 pBR9을 이용한 nargenicin gene cluster의 확장

두개의 PCR primer set로 유전자 탐침을 확보하여 colony hybridization으로부터 2개의 cosmid (pBR62, pBR98 및 pBR118)를 얻었다. 각 얻어진 cosmid를 BamHI과 SmaI과 반응하여 기존에 분석된 pBR9와 비교하였음 .

Pyrrole group의 유전자 분석

그중에 orf13, orf14 및 orf15가 nargenicin 중에 pyrrole ring의 생합성 과정에 참여하는 유전자로 orf13 및 acyl-CoA dehydrogenase (ngnN3), orf14은 proline adenylation protein (ngnN1)에 해당하고, orf15은 proline carrier protein (ngnN2) 기능으로 분석되었음. 이들 유전자는 이미 알려져 있는 clorobiocin 및 coumermycin에 포함된 다른 pyrrole 생합성 유전자 집단과 많은 유사성을 보여줌 .

Nargenicin에 포함된 pyrrole 생합성 유전자의 확인.

NgnN1은 proline adenylation protein의 기능으로 분석이 되었으며, 이미 알려져 있는 GrsA를 이용하여 NgnN1 단백질의 크리스탈 구조를 만들어 비교하였고 ATP binding domain도 확인. 3개의 효소 (NgnN1, NgnN2 and NgnN3) 반응에 의해 합성된 결과물을 KOH로 반응하여 나온 결과물이 예상하고 있는 reference sample인 pyrrolyl-2-carboxylic acid와 일치하는 결과물을 HPLC에서 확인하였으며, 이 결과물을 Mass로 확인하였다. 따라서 3개의 효소가 생합성 과정에서 제시한 방법으로 합성되고 있음을 보여준다.

### 2. Nargenicin의 고생산성 균주개발

S-adenosylmethionine synthase (MetK1-sp)

SAM synthase 유전자는 이차대사를 증가시키는데 조절기작 및 methyl group의 공

급으로 중요한 역할을 함. *Streptomyces peucetius*에서 metK1-sp 유전자를 PCR 방법에 의해 클론 및 확보 하여 *Nocardia* 발현벡터인 pNV18에 재조합하여 pNVmerK18을 제작하였음.

제작된 pNV18 벡터 및 pNVmerK18벡터를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp NV18 및 *Nocardia* sp. metK18 균주를 제작하였음. 제작된 균주에서 Nargenecin 생산성을 비교하였음 비교한 결과 metK가 전이된 균주가 야생균주에 비해 2.2배의 생산성이 증가된 것을 볼 수 있음.

#### ACC 발현벡터에 의한 생산성 증가

제작된 malonyl-CoA 합성에 필요한 3개의 유전자 (*accA2*, *accB* 및 *accE*)가 재조합된 pNVacc를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp ACC18 균주를 제작하였음.

제작된 pNV18 벡터 및 pNVacc를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp NV18 및 *Nocardia* sp. ACC18 균주를 제작하였음. 제작된 균주에서 Nargenecin의 일차대사인 acetyl-CoA의 양과 malonyl-CoA의 양의 증가여부를 확인하였음. *Nocardia* sp. ACC18 균주인 경우 3일차의 경우 malonyl-CoA의 양이 엄청 증가한 것을 볼 수 있으며, 6일차의 경우 malonyl-CoA 뿐만 아니라 acetyl-CoA의 양도 증가되었음을 볼 수 있음.

제작된 pNV18 벡터 및 pNVacc 벡터를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp NV18 및 *Nocardia* sp. ACC18 균주를 제작하였음. 제작된 균주에서 Nargenecin 생산성을 비교하였음 비교한 결과 metK가 전이된 균주가 야생균주에 비해 3.2배의 생산성이 증가된 것을 볼 수 있음.

#### 대사공학에 의해 얻어진 균주에 precursor feeding에 의한 생산성 증가

야생균주인 *Nocardia* sp. CS682에 30 mM methyl oleate를 feeding 한 경우 4.62배, 15 mM sodium propionate 4.25배, 15 mM sodium acetate에는 2.81배 생산성 증가

있고, *Nocardia* sp. metK18 균주는 oleate를 feeding 한 경우 5.57배, 15 mM sodium propionate 5.01배, 15 mM sodium acetate에는 3.64배 생산성 증가, *Nocardia* sp. ACC18 균주는 30 mM methyl oleate를 feeding 한 경우 6.99배, 15 mM sodium propionate 6.46배, 15 mM sodium acetate에는 5.58배 생산성 증가를 보여준다.

### 3. Proline feeding에 의한 isonargenicin의 생산.

Isonargenicin은 일반적인 야생균주에서 Nargenicin A1에 비교하여 약 5% 정도 생산된다. *Nocardia* sp ACC18 균주 경우에 새로운 peak가 TLC에 확인이 되었음. 새로운 peak를 분리하여 구조를 확인한 결과 isonargenicin임을 NMR과 Mass에 의해 구조가 확인되었음. 특히 *Nocardia* sp ACC18 균주에 proline을 feeding을 하였을 경우 isonargenicin의 양이 급격히 증가되는 것을 볼 수 있음.

### 4. Nargenicin의 생합성 유전자의 클론

#### (1) *Nocardia* sp. CS.682의 library의 제작과 pyrrole-2-carboxyl moiety 탐침.

*Nocardia* sp. CS.682 균주 total 유전자로부터 cosmid 벡터인 pOJ446로 유전자 library를 제작하였음. 총 12000 colony를 확보 하였음.

#### - Polyketide synthase 유전자 비교에 의한 탐침의 합성

현재 수십 종의 폴리케타이드 화합물의 생합성 유전자의 염기서열이 보고되어 있으며 이들 생합성 유전자들 중 PKS 부분을 비교해 보면, 염기서열과 domain 구성이 매우 유사한 것을 알 수 있음. 특히 PKS domain 중 ketosynthase (KS) domain의 염기서열은 모두 종류의 PKS에서 약 70-80%의 높은 유사성을 보이므로 기존 PKS 유전자의 KS domain을 탐침으로 사용하면 목적하는 CS682 폴리케타이드 생합성 유전자 집단을 확보하기 위해 위에서 기술한 탐침을 제작하였음.

#### - CS682의 가지에 있는 pyrrole-2-carboxyl moiety 생합성 유전자 탐침의 합성

*Nocardia* sp. CS682 균주도 일반적인 *Streptomyces* 균주처럼 여러 개의 polyketide 생합성 유전자 집단이 있을 가능성이 있다. 따라서 CS682의 독특한 구조의 생합성 유전자를 사용하여 CS682의 생합성 유전자를 클론하기 위해 탐침을 합성 하였음 (Fig. 1).

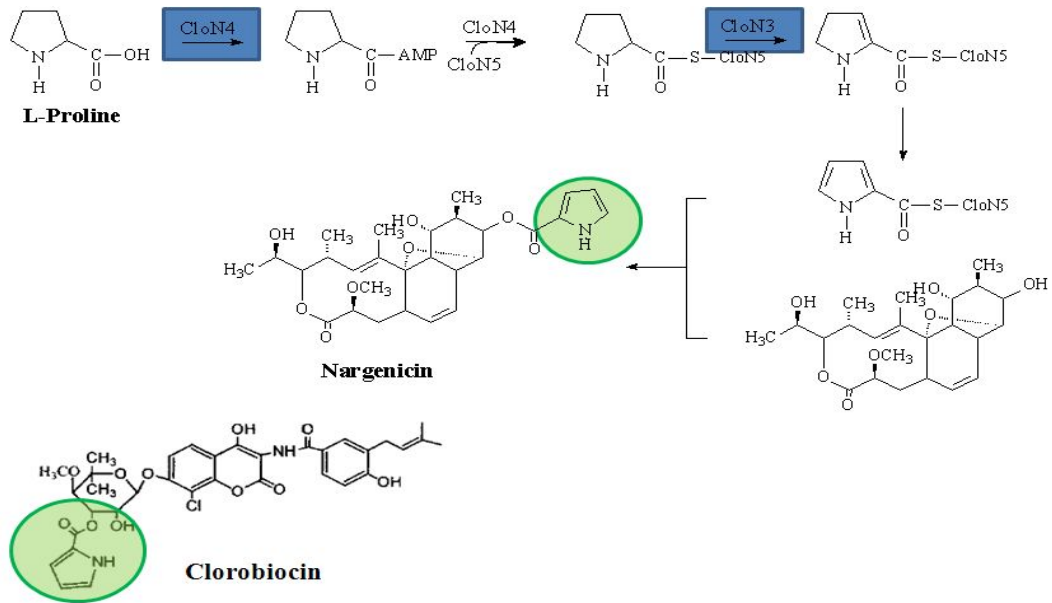


Fig. 1. Pyrrole-2-carboxyl moiety의 생합성 과정.

CS682는 pyrrole-2-carboxyl moiety를 가지고 있으며, 이 구조의 생합성은 이미 clorobiocin 등에 잘 알려져 있다. Pyrrole-2-carboxyl moiety는 L-proline으로부터 3단계 (Clon4, Clon5, Clon3)를 거쳐 생합성이 되며, 이들 유전자와 비교하여 DNA 탐침을 제작하기 위해 생합성 과정 유전자가 알려져 있는 Pyrrole-2-carboxyl moiety를 가지고 있는 천연물이 4가지가 있으며 (Fig. 2), 생합성 과정 중에 첫 번째 해당하는 AMP ligase를 탐침으로 하기 위해 polyketide 서열을 비교하여 6개의 유사성이 높은 부분을 결정하였음 (Fig. 3).

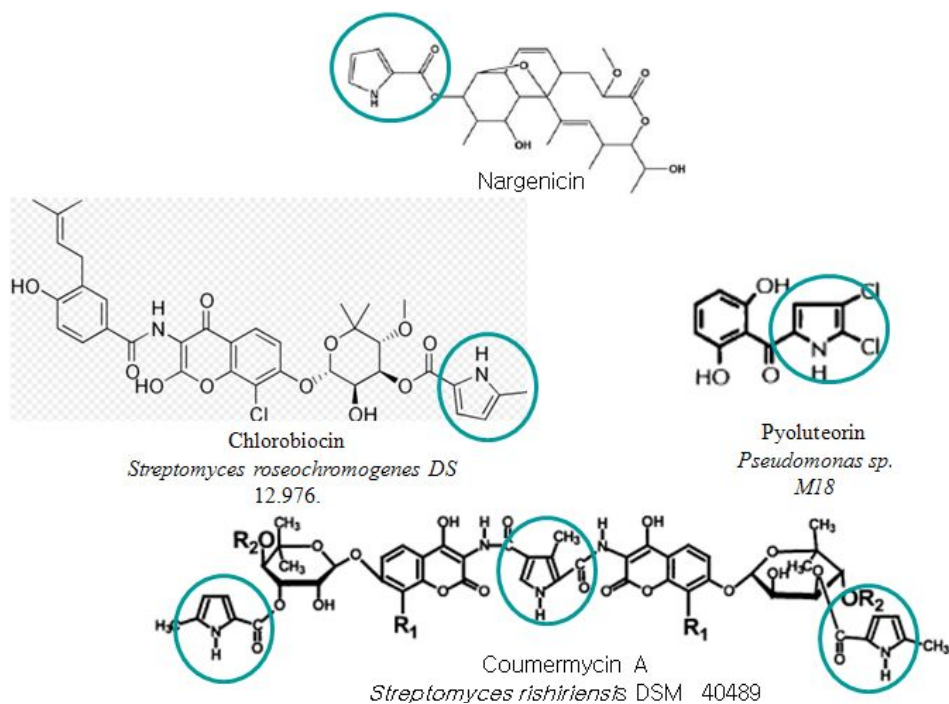


Fig. 2. Natural product including pyrrole-2-carboxyl moiety

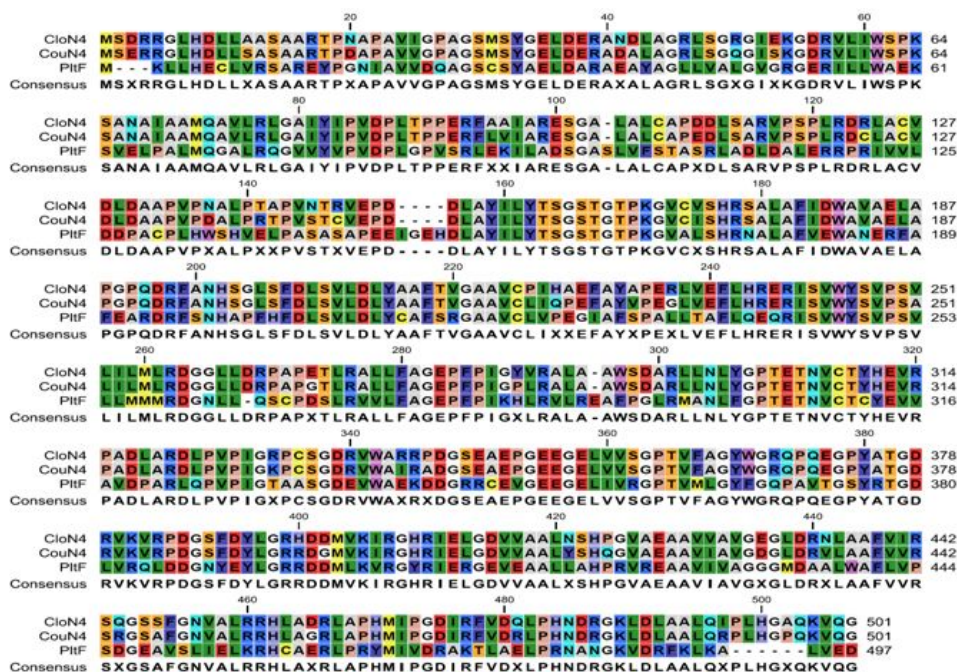


Fig. 3. Multiple alignment with CloN4 from *S. roseochromogenes* for DNA probe

제작된 PCR primer 중에 NocF:ACS GGS ACS CCS AAG GGS GT, NocR:GCA SAC GTT SGT CTC SGT SGG SCC가 성공적으로 PCR에 의해 유전자 단편을 얻었고 얻은 PCR 단편은 T-vector에 재조합하여 염기서열 분석 결과 CloN과 비교한 결과 86%의 유사성을 보여주었음 (Fig. 4).

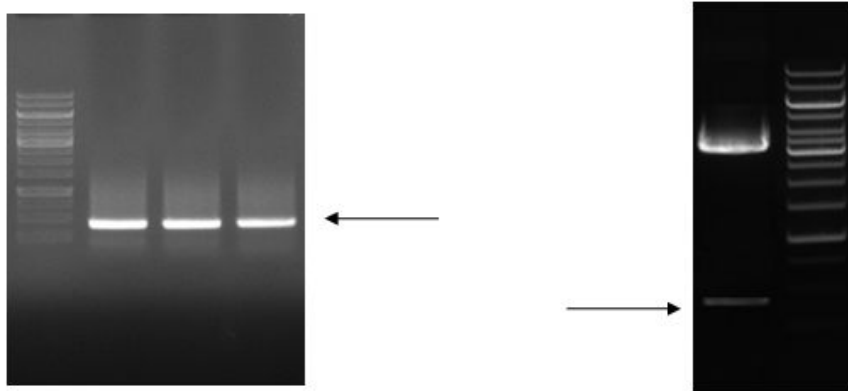
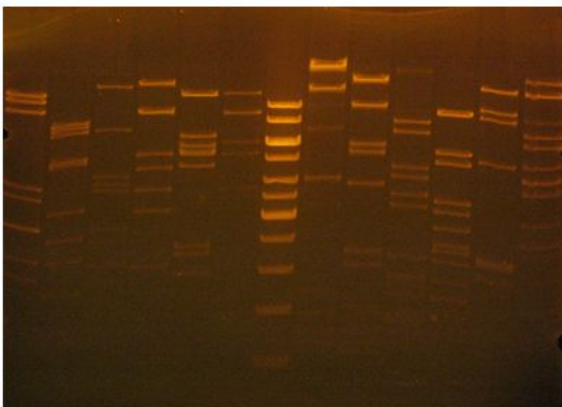


Fig. 4. PCR product from *Nocardia* sp. CS682 total DNA by the degenerate primers

(2). *Nocardia* sp. CS.682의 library의 screening

위에 확보된 유전자 탐침에 의해 13개의 cosmid를 Southern blot에 의해 다시 한 결과 61, 62, 54, 48 및 58 cosmid가 클론 되었으며 이들 중 cosmid 10과 52를 subcloning과 염기서열 분석을 하고 있음 (Fig. 5).

**Digestion of hybridized cosmids by *Bam*HI from second colony hybridization**



**Southern hybridization of selected cosmids**

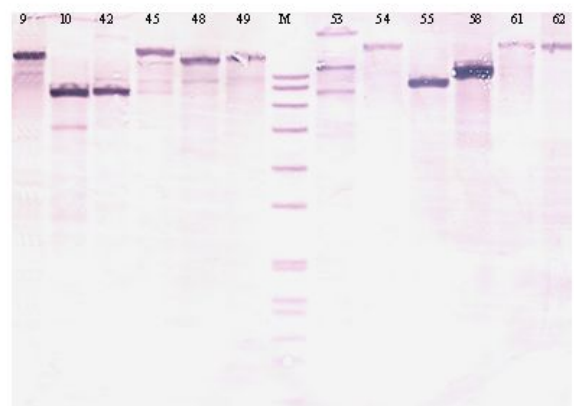


Fig. 5. *Nocardia* sp. CS.682의 library의 screening

(3) 클론된 pBR8 및 pBR9의 염기서열분석

여러개의 분리된 클론중에 pBR8 및 pBR9을 염기서열 분석. 크기는 총 53 kb로 총 26개의 orf를 분석.

Table 1. pBR9/pBR9 염기서열 분석

Gene	Proposed Function	Size	Homology	Similarity/Identity (%)
orf 1	Monooxygenase	492 bp	Monooxygenase [Mycobacterium marinum M]	53/33
orf 2	Acyl CoA dehydrogenase/Oxygenase/hydroxylase	1167 bp	Oxygenase LndZ5 [Streptomyces globisporus]	47/63
orf 3	Acetyl CoA carboxylase	1527 bp	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, beta subunit [Frankia sp. EAN1pec]	63/73
orf 4	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase	1365 bp	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit [Saccharomonospora viridis DSM 43017]	63/75
orf 5	Lipase/esterase	825 bp	Lipase/esterase [Amycolatopsis mediterranei U32]	56/70
orf 6	SARP family transcriptional regulator	756 bp	Transcriptional regulator, SARP family [Frankia sp. EUN1f]	50/67
orf 7	HxlR family transcriptional regulator	387 bp	HxlR family transcriptional regulator [Streptomyces pristinaespiralis ATCC 25486]	55/67
orf 8	Cyclase protein family	750 bp	Putative cyclase [Nocardia farcinica IFM 10152]	41/56
orf 9	Acetyl CoA carboxylase	558 bp	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein [Micromonospora sp. L5]	47/57
orf 10	Diguanylate cyclase	1077 bp	Diguanylate cyclase [Mycobacterium gilvum PYR-GCK]	39/54
orf 11	Carboxypeptidase	1260 bp	Peptidase M14 carboxypeptidase [Amycolatopsis mediterranei U32]	51/65
orf 12	<b>Condense enzyme (NgnN4)</b>	777 bp	Daunorubicin-doxorubicin polyketide synthase [Streptomyces peucetius]	36/49
orf 13	<b>Acyl CoA dehydrogenase (NgnN3)</b>	1128 bp	Prolyl carrier protein dehydrogenase [Streptomyces antibioticus]	64/76
orf 14	<b>Proline adenylation protein (NgnN1)</b>	1506 bp	Proline adenylation transferase [Streptomyces antibioticus]	67/75
orf 15	<b>Proline carrier protein (NgnN2)</b>	276 bp	Proline carrier protein [Streptomyces antibioticus]	41/65
orf 12	LuxR family transcriptional regulator	378 bp	Putative transcriptional regulator, LuxR family [Streptomyces hygroscopicus ATCC 53653]	61/76
orf 13	LysR family transcriptional regulator	1866 bp	LysR family transcriptional regulator [Streptomyces coelicolor A3(2)]	55/68
orf 14	Short chain dehydrogenase	849 bp	Short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase [Myxococcus xanthus DK 1622]	33/48
orf 15	Phytanoyl CoA dehydrogenase	627 bp	Phytanoyl-CoA dioxygenase [Micromonospora aurantiaca ATCC 27029]	45/59
orf 16	Cytochrom P450	1491 bp	PauC [Pseudonocardia autotrophica]	48/62
orf 17	O-methyltransferase	897 bp	Monensin 3-O-methyl transferase [Streptomyces cinnamomensis]	41/56
orf 18	Short chain dehydrogenase	843 bp	Putative short chain dehydrogenase [Nocardia farcinica IFM 10152]	43/57
orf 19	Monooxygenase	1266 bp	Shy18 [Streptomyces hygroscopicus subsp. yingchengensis]	55/67
orf 20	Cytochrome P450 superfamily protein	1269 bp	Cytochrome P450 superfamily protein [Mycobacterium avium subsp. avium ATCC 25291]	39/57
orf 21	Aldo/keto reductase	1047 bp	Aldo/keto reductase [Geodermatophilus obscurus DSM 43160]	54/68
orf 22	Polyketide synthase	25,000 bp		

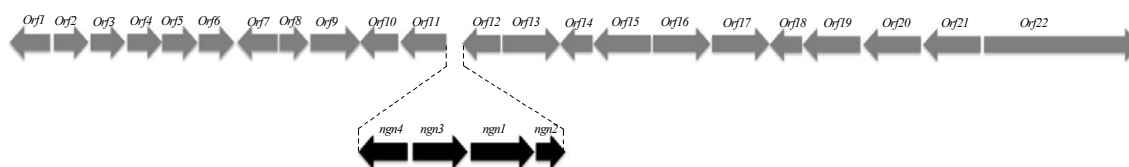


Fig. 6. Partial Nargenicin gene cluster obtained from Noc8 (pBR8) 및 Noc9 (pBR9) sequencing



(4) 클론된 pBR9을 이용한 nargenicin gene cluster의 확장  
nargenicin gene cluster가 총 26개 orf가 분석되었지만 nargenicin aglycone에 해당하는 polyketide synthase 예상되는 유전자 크기가 약 40 kb 중에 극히 일부 8kb가 오른쪽 끝 일부가 분석되었음. 따라서 오른쪽 끝을 더 확장하여 전체nargenicin aglycone에 해당하는 polyketide synthase 유전자 확보가 필요함. 오른쪽 끝에 해당되는 유전자 orf24 (monooxygenase)와 orf26 (PKS ) 유전자를 유전자 탐침을 얻기 위해 PCR primer를 제작하였음 (Fig. 7).

**Ngnmoxy (1280bp)**  
NgnmoxyF: GCAGGGTCAGGTTCTCTCGGCGCG  
NgnmoxyR: AATCAGCAGCAGCGAACGCTGCGC

**Ngnpks2 (1000bp)**  
Ngnpks1F: ATGCCGCTGCCTATCGACGGTGAC  
Ngnpks1R: GTAGATGTCGTCGCCGTCGCCAG

Fig. 7. 유전자 탐침을 얻기 위해 PCR primer

두개의 PCR primer set로 유전자 탐침을 확보하여 colony hybridization으로부터 2개의 cosmid (pBR62, pBR98 및 pBR118)를 얻음. 각 얻어진 cosmid를 BamHI과 SmaI과 반응하여 기존에 분석된 pBR9와 비교하였음 (Fig. 8).

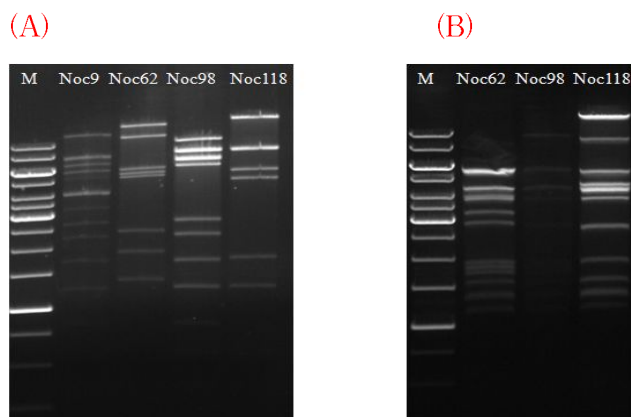


Fig. 8. (A) BamHI에 반응된 cosmid, (B) SmaI에 반응한 cosmid

(5) Pyrrole group의 유전자 분석

그중에 orf13, orf14 및 orf15가 nargenicin 중에 pyrrole ring의 생합성 과정에 참여하는 유전자로 orf13 및 acyl-CoA dehydrogenase (ngnN3), orf14은 proline adenylation protein (ngnN1)에 해당하고, orf15은 proline carrier protein (ngnN2) 기능으로 분석됨. 이들 유전자

는 이미 알려져 있는 clorobiocin 및 coumermycin에 포함된 다른 pyrrole 생합성 유전자 집단과 많은 유사성을 보여줌 (Fig. 9).

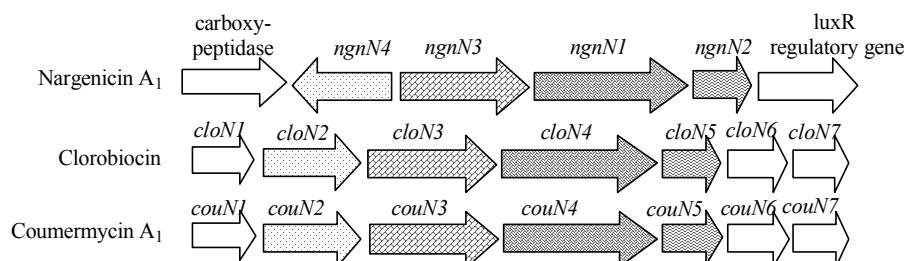


Fig. 9. Comparison of gene cluster responsible for biosynthesis of pyrrole-2-carboxylate of nargenicin A<sub>1</sub> (ngn), clorobiocin (clo) and coumermycinA<sub>1</sub> (cou) in *Nocardia* sp. CS682, *S. roseochromogenes* DS 12.976 and *S. rishiriensis* DSM40489, respectively (blackarrows).

Table 2. Comparison of amino acid sequence of NgnN1, NgnN2, NgnN3 and NgnN4 with the respective homologs

Genes	Organisms	Genebank accession numbers	Number of amino acids	Identity to NgnN1	Similarity to NgnN1
<i>ngnN1</i>	<i>Nocardia</i> sp.CS682	?	501	100	100
<i>idmJ</i>	<i>S. antibioticus</i>	ACN69986	496	67	75
<i>cloN4</i>	<i>S. roseochromogenes</i>	AF329398_23	501	57	69
<i>couN4</i>	<i>S. rishiriensis</i>	AF235050_12	501	58	69
<i>pltF</i>	<i>P. fluorescens Pf-5</i>	AF081920	498	50	65
				Identity to NgnN2	Similarity to NgnN2
<i>ngnN2</i>	<i>Nocardia</i> sp.CS682	?	91	100	100
<i>idmK</i>	<i>S. antibioticus</i>	ACN69987	91	42	66
<i>cloN5</i>	<i>S. roseochromogenes</i>	AF329398_24	89	40	62
<i>couN5</i>	<i>S. rishiriensis</i>	AF235050_13	89	39	65
<i>pltL</i>	<i>P. fluorescens Pf-5</i>	AAD24885	88	35	55
				Identity to NgnN3	Similarity to NgnN3
<i>ngnN3</i>	<i>Nocardia</i> sp.CS682	?	375	100	100
<i>idmI</i>	<i>S. antibioticus</i>	ACN69985	377	65	77
<i>cloN3</i>	<i>S. roseochromogenes</i>	AF329398_22	376	55	75
<i>couN3</i>	<i>S. rishiriensis</i>	AF235050_11	373	56	73
<i>pltE</i>	<i>P. fluorescens Pf-5</i>	YP_259897	380	51	67
				Identity to NgnN3	Similarity to NgnN3
<i>ngnN4</i>	<i>Nocardia</i> sp.CS682	?	258	100	100
<i>chlB3</i>	<i>S. antibioticus</i>	AAZ77676	347	35	49
<i>cloN2</i>	<i>S. roseochromogenes</i>	AF329398_21	355	30	43
<i>couN2</i>	<i>S. rishiriensis</i>	AF235050_10	355	30	43

분석된 유전자로부터 nargenicin에 포함된 pyrrole 기의 예상되는 생합성 과정은 그림과 같음(Fig. 10).

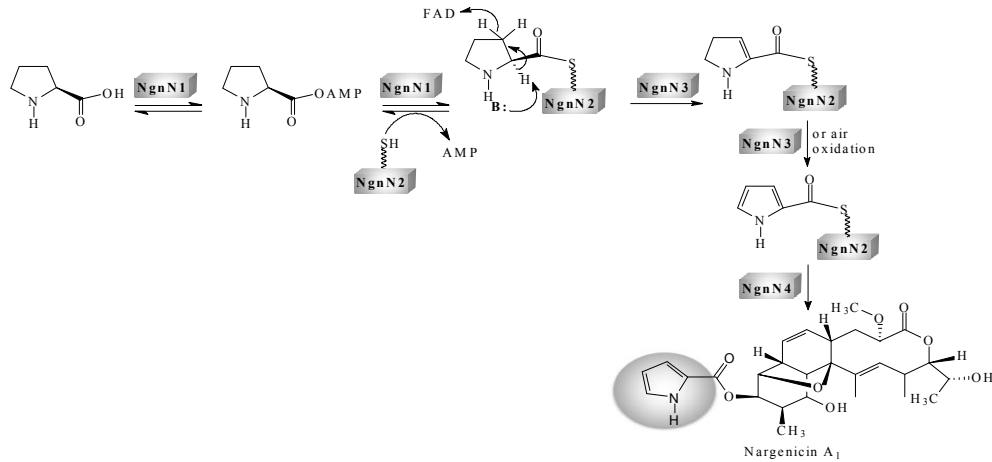


Fig.10. Schematic representation of conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP, catalyzed by NgnN1, NgnN2 and NgnN3.

(6) Nargenicin에 포함된 pyrrole 생합성 유전자의 확인.

NgnN1은 proline adenylation protein의 기능으로 분석이 되었으며, 이미 알려져 있는 GrsA를 이용하여 NgnN1 단백질의 크리스탈 구조를 만들어 비교하였고 ATP binding domain도 확인함(Fig. 11).

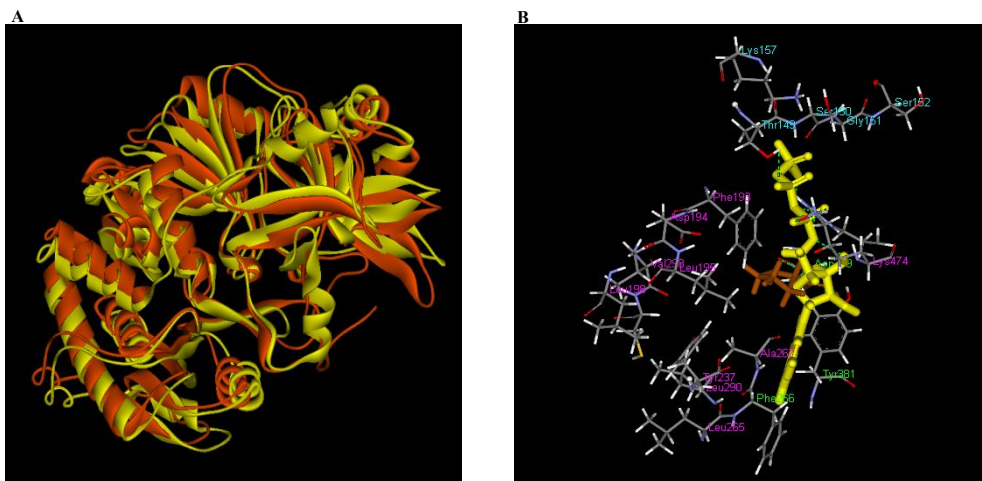


Fig. 11. A. Superimposition of NgnN1 model (yellow) over GRS A (orange). B. Docking of ATP (yellow) and proline (brown) into NgnN1 model. GSTLK (blue) represents the

amino acid of conserved nine-residue region involved in ATP binding and DLLYLALVCK (pink) are the specificity codes for NgnN1 that surrounds the proline moiety.

ngnN1, ngnN2 및 ngnN3 유전자의 기능을 확인하기 위해 각각을 발현하기 위해 다음과 같이 primer를 제작하여 각각의 PCR 결과물을 얻음 (Fig. 12).

**NgnN1F:** AATGAATTCACGGGAGATGGGCTTGTG  
**NgnN1R:** CCTAAGCTTGTGTCATGTTGTTGTACT

**NgnN2F:** GGGAGATCTATGACACAGGCCGAAC TG  
**NgnN2R:** ATTCTCGAGTCACGCCGACTGCTCGCG

**NgnN3F:** GCCGAATTCATGGATTTTGCCTGACT  
**NgnN3R:** CGTAAGCTTGGTTCACAAGCCCATCTC

**Sfp F:** CCCGAATTCATGAAGATTTACGGAATT  
**Sfp R:** ATACTGCAGTTATAAAAGCGCTTCGTA

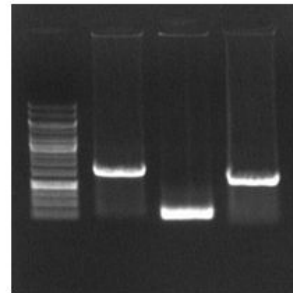


Fig.12. 제작된 각각의 primer와 PCR 결과물

각각의 PCR 결과물중 ngnN1과 ngnN3는 pET32에 재조합하였고, ngnN2는 pACYC-Duet에 재조합하여 각각의 발현 벡터를 제작. 제작된 발현벡터는 대장균에서 발현하여 soluble한 단백질을 얻음 (Fig. 13).

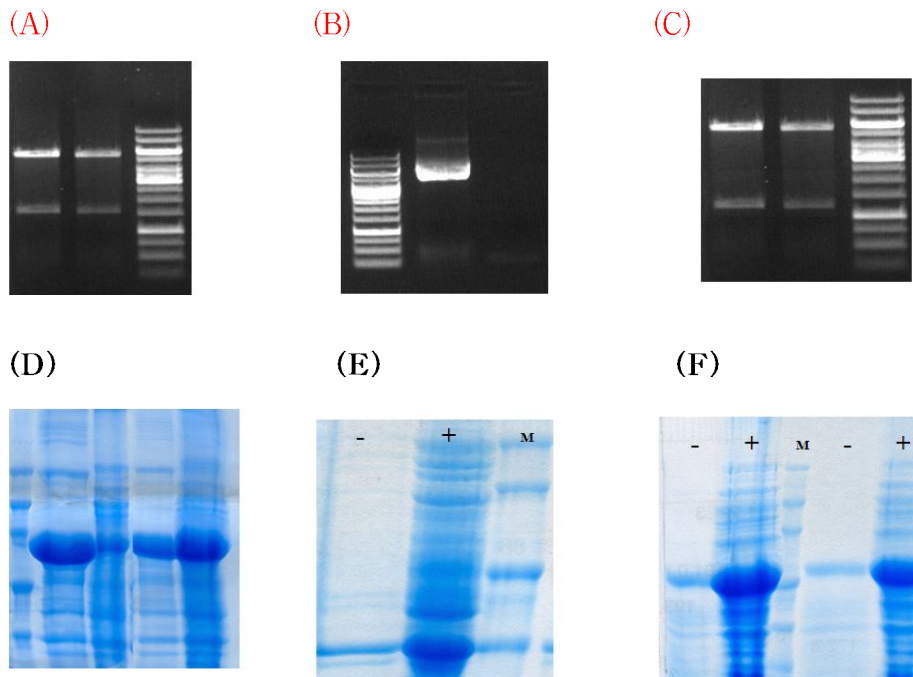


Fig. 13. (A)는 pET32에 재조합된 *ngnN1*, (B) pACYC-Duet에 재조합된 *ngnN2*, (C) pET32에 재조합된 *ngnN3*, (D) *ngnN1* 유전자 발현된 단백질, (E) *ngnN2* 유전자 발현된 단백질, (F) *ngnN3* 유전자 발현된 단백질.

Table 3. 사용된 plasmid와 균주

Plasmids	or strains	Description	Source
<b>Plasmids</b>			
pGEM-T	Easy	<i>E. coli</i> cloning vector, <i>amp<sup>r</sup></i>	Promega
pOJ446		<i>E. coli-Streptomyces</i> shuttle cosmid for construction of the genomic library, <i>ap<sup>r</sup></i>	Invitrogen
pBR9		pOJ446 based cosmid harboring <i>ngnN1- ngnN4</i>	This study
pET32a(+)		Vector for protein expression in <i>E.coli</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	Novagen
pACYCDuet™-1		Vector for protein expression in <i>E.coli</i> , <i>cm<sup>r</sup></i>	Novagen
pNgnN1-32a		pET32a(+) based recombinant plasmid harboring <i>ngnN1</i>	This study
pNgnN2-DT1		pACYCDuet™-1 based recombinant plasmid harboring <i>ngnN2</i>	This study
pNgnN3-32a		pET32a(+) based recombinant plasmid harboring <i>ngnN3</i>	This study
pSfp-32a		pET32a(+) based recombinant plasmid harboring <i>sfp</i>	This study
<b>Strains</b>			
<i>Nocardia</i> sp.	CS682	Wild type strain, nargenicin A <sub>1</sub> producer	<a href="#">Sohng et al. 2008</a>
<i>E. coli</i>	XL1 Blue	Host for general cloning	Stratagene
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	Host for protein expression	Novagen

<i>E. coli</i> /pNgnN1-32a	<i>E. coli</i> BL21 carrying pNgnN1-32a	This study
<i>E. coli</i> /pSfp-32a	<i>E. coli</i> BL21 carrying pSfp-32a	
<i>E. coli</i> /pNgnN2Sfp-DT1	<i>E. coli</i> /BL21 carrying pNgnN2-DT1 and pSfp-32a	This study
<i>E. coli</i> /pNgnN3-32a	<i>E. coli</i> /BL21 carrying pNgnN3-32a	This study

3개의 효소 (NgnN1, NgnN2 and NgnN3) 반응에 의해 합성된 결과물을 KOH로 반응하여 나온 결과물이 예상하고 있는 reference sample인 pyrrolyl-2-carboxylic acid와 일치하는 결과물을 HPLC에서 확인하였으며, 이 결과물을 Mass로 확인함. 따라서 3개의 효소가 생합성 과정에서 제시한 방법으로 합성되고 있음을 보여줌.

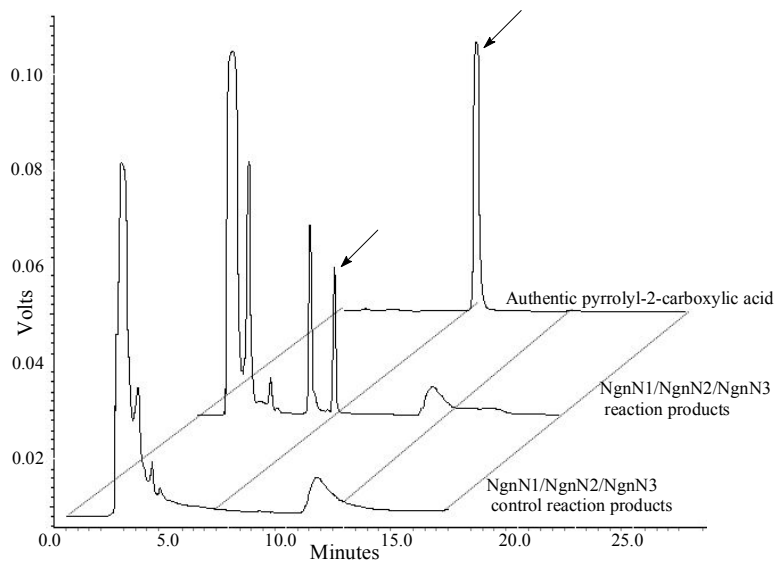


Fig. 14. HPLC analysis of NgnN1, NgnN2 and NgnN3 reaction products released by KOH treatment. The peak corresponding to the pyrrole-2-carboxylic acid is indicated by arrow.

## 5. 대사공학에 의한 nargenicin 생산성 증가

*Nocardia sp.* CS.682 균주는 다른 토양 미생물과 달리 세포벽이 더 두껍고 바깥쪽에 mycolic acid와 함께 짧은 beta-hydroxy 및 긴 alpha hydroxy 사슬을 가진 탄소 길이가 60-90정도를 가지고 있는 탄화 수소 사슬이 있는 균주임. 따라서 chemical reagent와 lysosomal component를 사용하는 protoplast에 의한 전이 방법은 어려움 (Fig. 15).

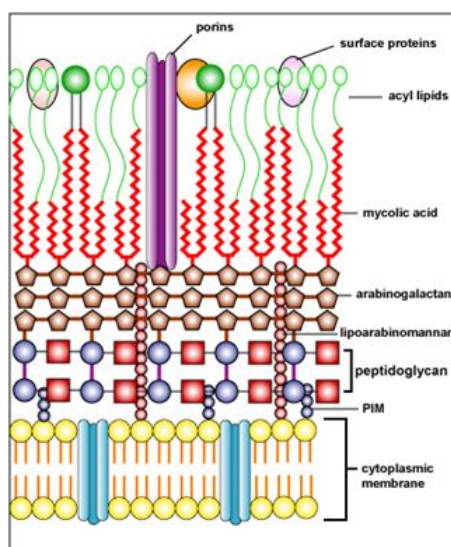


Fig.15. *Nocardia*의 세포벽.

### (1) *Nocardia sp.* CS682의 transformation 확립

다른 방법으로 electroporation 방법으로 수행하였다. 사용된 유전자는 SAM< 유전자가 삽입된 pNV18 재조합 유전자로 수행 방법은 다음과 같음.

- ◆ We tried transformation of *Nocardia sp.* CS682 at different conditions (such as, different field strengths, pulse lengths) using Sauton Broth and Brain heart broth media and finally optimized the following electroporation conditions for our strain.
- ◆ *Nocardia sp.* CS682 were incubated in 50 ml of Brain heart broth for 4 days at 37°C as a seed culture.
- ◆ 100ul of seed culture was transferred into 5ml of fresh Brain heart broth and

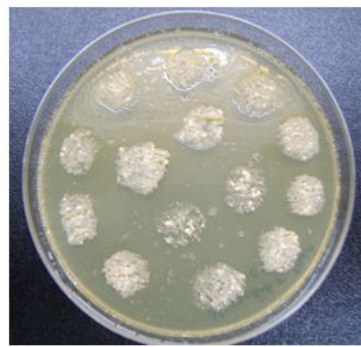
incubated at 37°C for 2 days.

- ◆ Cells were harvested, washed twice with 5 ml of ice-cold water, and then resuspended in 100  $\mu$ l of ice-cold 10% glycerol.
- ◆ The suspension was transferred to a chilled electroporation cuvette (0.4cm ) and mixed with 10  $\mu$ l of DNA.
- ◆ After pulsing at 12.25 kV/cm with an Electro Cell Porator (Bio Rad Micropulser), the suspension was added to 1ml of BHI broth and incubated for 2 h at 37°C.

수행 결과 성공적으로 pNV18 재조합 유전자가 전이 되었음 (Fig. 16).



*Nocardia* sp. CS682 on Brain heart agar plate containing 500  $\mu$ g/ml of neomycin



*Nocardia* sp. CS682 transformants on Brain heart agar plate containing 500  $\mu$ g/ml of neomycin

Fig. 16. *Nocardia* sp. CS682 transformants showed well growth in Brain heart media containing 500  $\mu$ g/ml neomycin.

## (2) S-adenosylmethionine synthase (MetK1-sp)

SAM synthase 유전자는 이차대사를 증가시키는데 조절기작 및 methyl group의 공급으로 중요한 역할을 함. *Streptomyces peucetius*에서 metK1-sp 유전자를 PCR 방법에 의해 클론 및 확보 하여 *Nocardia* 발현벡터인 pNV18에 재조합하여 pNVmerK18을 제작하였음. (Fig. 17).



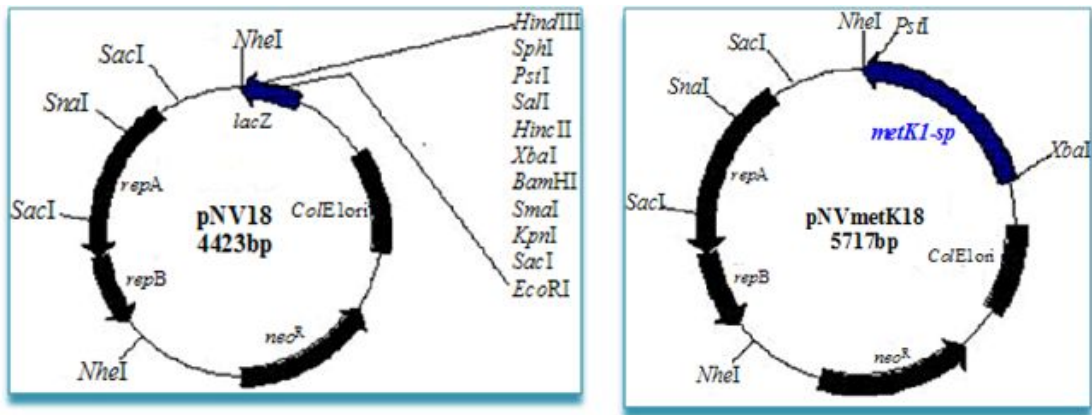


Fig. 17. *Nocardia-E. coli* shuttle vector, pNV18 and recombinant plasmid pNVmetK18 harboring *metK1-sp*

제작된 pNV18 벡터 및 pNVmerK18 벡터를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp. NV18 및 *Nocardia* sp. metK18 균주를 제작하였음. 제작된 균주에서 Nargenicin 생산성을 비교하였음. 비교한 결과 *metK*가 전이된 균주가 야생균주에 비해 2.2배의 생산성이 증가된 것을 볼 수 있음.

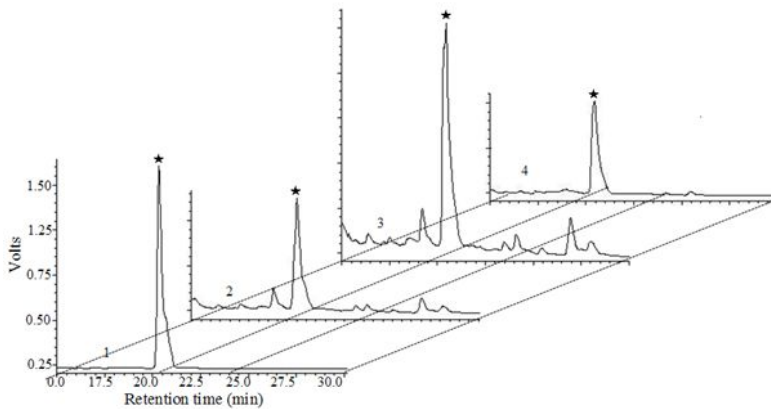


Fig. 18. 2 HPLC chromatogram of compounds isolated from *Nocardia* sp. CS682 and its transformants. 1. Nargenicin A<sub>1</sub> standard, 2. Nargenicin A<sub>1</sub> produced by *Nocardia* sp. NV18, 3. Nargenicin A<sub>1</sub> produced by *Nocardia* sp. metK18, 4. Nargenicin A<sub>1</sub> produced by *Nocardia* wild type. The experiment was averaged from 4 different extractions. The peak corresponding to nargenicin A<sub>1</sub> is indicated by star.

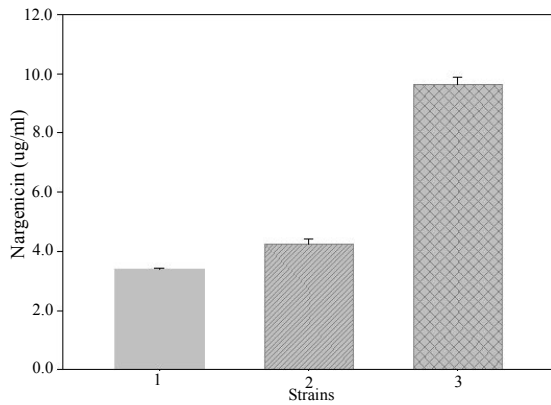


Fig. 19. Comparison of nargenicin A<sub>1</sub> production from *Nocardia* sp. CS682 and its transformants. 1. Nargenicin A<sub>1</sub> produced by *Nocardia* wild type, 2. Nargenicin A<sub>1</sub> produced by *Nocardia* sp. NV18, 3. Nargenicin A<sub>1</sub> produced by *Nocardia* sp. metK18. The experiment was averaged from 4 different extractions.

Table 4. Vectors and recombinant plasmids used in this study

Plasmids or strains	Description	Source
<b>Plasmids</b>		
pGEM-T Easy	<i>E. coli</i> cloning vector, <i>amp</i> <sup>r</sup>	Promega
pACC152	pSET152 based recombinant plasmid harboring acetyl-CoA carboxylase ( <i>accA2, accB, accE</i> )	This study
pMetK25	pIBR25 based recombinant plasmid harboring <i>metK1-sp</i>	This study
pNV18	<i>Nocardia-E. coli</i> shuttle vector, <i>neo</i> <sup>r</sup>	Chiba et al. 2007
pNVmetK18	pNV18 harboring <i>metK1-sp</i>	This study
pNVACC	pNV18 harboring acetyl-CoA carboxylase	This study
pMBE101	C o l E 1, SCP2*, <i>actI-ORF4, pactIII-I, amp</i> <sup>r</sup> - <i>tsr</i> <sup>r</sup> , expression vector	Unpublished data
<b>Strains</b>		
<i>Nocardia</i> sp. CS682	Wild type strain, nargenicin A <sub>1</sub> producer	Sohng et al. 2008
<i>Nocardia</i> sp. NV18	<i>Nocardia</i> sp. CS682 harboring pNV18	This study
<i>Nocardia</i> sp. metK18	<i>Nocardia</i> sp. CS682 harboring pNVmetK18	This study
<i>Nocardia</i> sp. ACC18	<i>Nocardia</i> sp. CS682 harboring pNVacc	This study

### (3) afsR 및 ACC 발현벡터에 의한 생산성 증가

Malonyl-CoA의 생합성 유전자 집단을 재조합하기 위해 먼저 방선균에서 생산성을 확인하기 위해 유전자를 재조합하여 pNVacc (ACCase 유전자 집단)을 제작 하였음.

제작된 malonyl-CoA 합성에 필요한 3개의 유전자 (*accA2, accB* 및 *accE*)가 재조합된 pNVacc를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp. ACC18 균주를 제작 하였음 (Fig. 20).

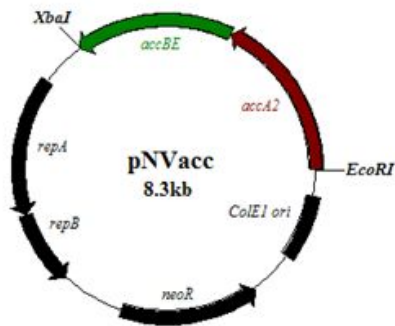


Fig. 20. 일차대사 유전자 (ACC) 발현벡터 제작.

제작된 pNV18 벡터 및 pNVacc를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp NV18 및 *Nocardia* sp. ACC18 균주를 제작하였음. 제작된 균주에서 Nargenecin의 일차대사인 acetyl-CoA의 양과 malonyl-CoA의 양의 증가여부를 확인하였음. *Nocardia* sp. ACC18 균주인 경우 3일차의 경우 malonyl-CoA의 양이 엄청 증가한 것을 볼 수 있으며, 6일차의 경우 malonyl-CoA 뿐만 아니라 acetyl-CoA의 양도 증가되었음을 볼 수 있음.

Table 5. Acetyl-CoA and malonyl-CoA extracted from *Nocardia* sp. CS682 and its transformants in BHI media

Culture time	Strains	Acetyl-CoA	Malonyl-CoA
3 days	<i>Nocardia</i> sp. CS682	3.01 ± 0.2	0.002 ± 0.002
	<i>Nocardia</i> sp NV18	3.25 ± 0.2	0.003 ± 0.002
	<i>Nocardia</i> sp ACC18	3.61 ± 0.2	4.62 ± 0.2
6 days	<i>Nocardia</i> sp. CS682	7.12 ± 0.03	2.04 ± 0.3
	<i>Nocardia</i> sp NV18	7.05 ± 0.3	2.31 ± 0.03
	<i>Nocardia</i> sp ACC18	13.12 ± 0.02	9.15 ± 0.02

Values are represented as  $\mu\text{moles/g}$  dry cell weight

제작된 pNV18 벡터 및 pNVacc 벡터를 *Nocardia* sp. CS682에 전이하여 *Nocardia* sp NV18 및 *Nocardia* sp. ACC18 균주를 제작하였음. 제작된 균주에서 Nargenecin 생산성을 비교하였음 비교한 결과 metK가 전이된 균주가 야생균주에 비해 3.2배의 생산성이 증가된 것을 볼 수 있음 (Fig.21 및 Fig. 22).

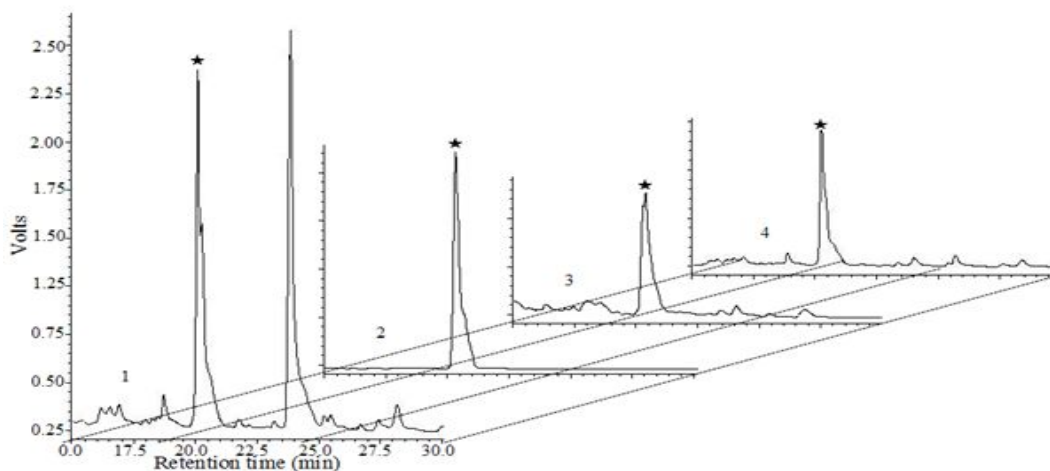


Fig. 21. HPLC chromatogram of compounds isolated from *Nocardia* sp. CS682 and its transformants. 1. Nargenicin A1 produced by *Nocardia* sp ACC18. 2. Nargenicin A1 standard 3. Nargenicin A1 produced by *Nocardia* sp NV18, 4. Nargenicin A1 produced by *Nocardia* wild type. The peak corresponding to nargenicin is indicated by star.

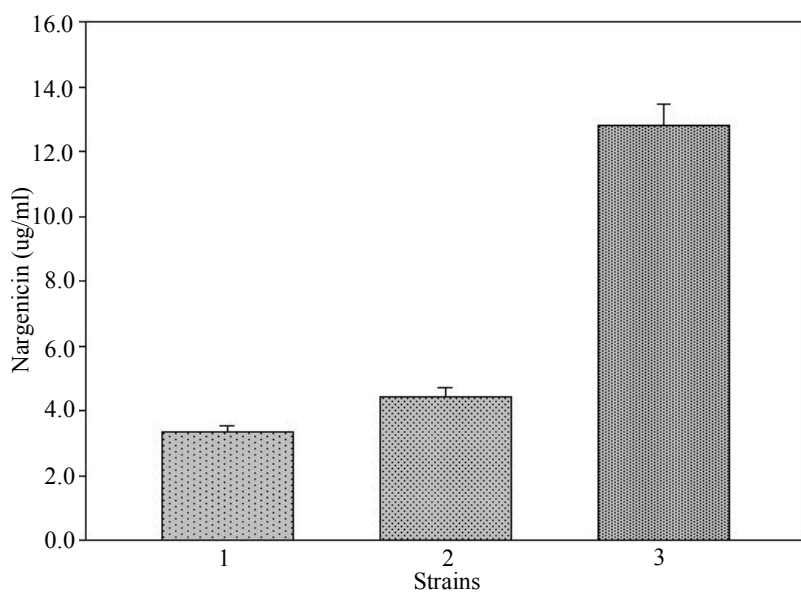


Fig. 22. Comparison of nargenicin A1 production by *Nocardia* sp. CS682 and its transformants. 1. Nargenicin A1 produced by *Nocardia* wild type, 2. Nargenicin A1 produced by *Nocardia* sp NV18, 3. Nargenicin A1 produced by *Nocardia* sp ACC18. The experiment was averaged from 4 different extractions.

(4) 대사공학에 의해 얻어진 균주에 precursor feeding에 의한 생산성 증가

Nargenicin은 polyketide 계열의 항생제로서 loading domain에 propionyl-CoA, 5개의 malonyl-CoA, 3개의 methyl-malonyl-CoA에 의해 nargenicin backbone인 macrolide가 합성됨

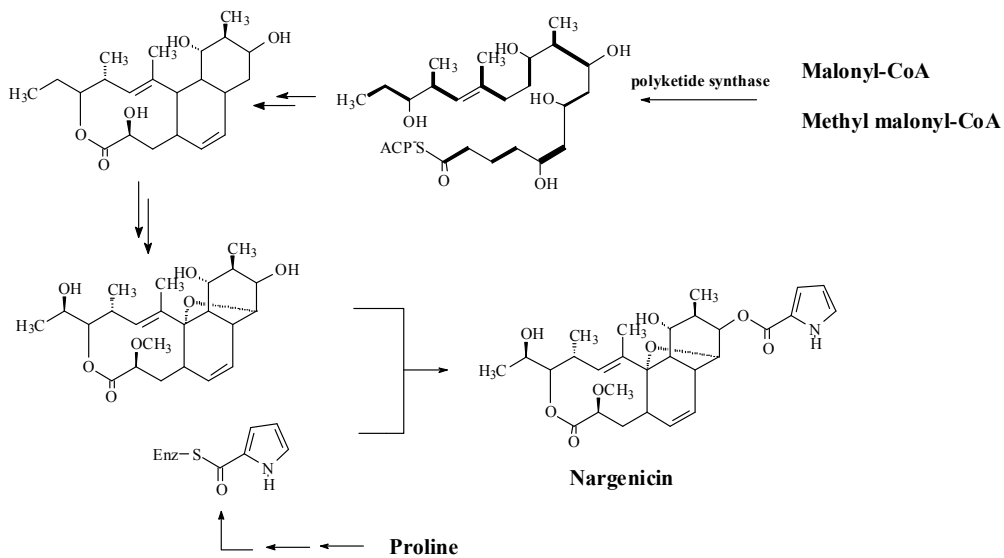


Fig.23. Nargenicin aglycone의 생합성 과정.

Nargenicin의 생산성을 증가시키기 위해서는 malonyl-CoA, methyl-malonyl-CoA 및 propionyl-CoA 양을 늘려주어야 함. malonyl-CoA는 acetate나 혹은 methyl oleate가 분해되면서 precursor를 공급할 수 있으며, propionate는 methyl-malonyl-CoA 및 propionyl-CoA 양을 늘려주는데 영양을 줄 수 있음.

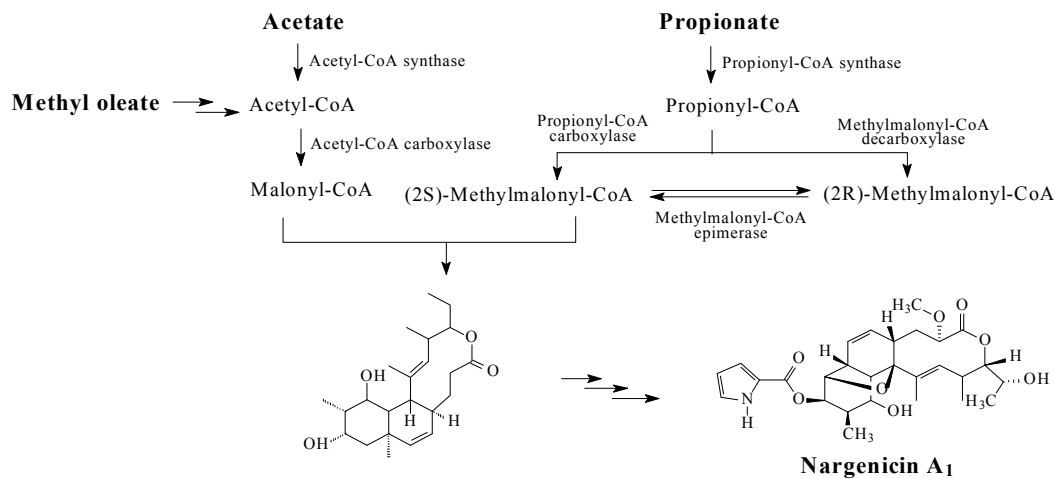


Fig. 24. acetyl-CoA 및 propionyl-CoA의 precursor.

◆ 야생균주 및 변이 균주에 precursor feeding에 의한 nargenicin 생산성 증가

야생균주인 *Nocardia* sp. CS682에 methyl oleate를 feeding의 경우 30 mM이 가장 생산성이 높았으며 이 경우 4.62배, sodium propionate를 feeding한 경우 15 mM에서 최적이었으며 생산성은 4.25배, sodium acetate를 feeding한 경우 역시 15 mM에서 생산성 높았고 2.81배 생산성 증가를 보여주고 있어 methyl oleate의 feeding이 가장 좋은 효과를 보여주고 있음. *Nocardia* sp. metK18 균주는 oleate를 feeding한 경우 5.57배, 15 mM sodium propionate 5.01배, 15 mM sodium acetate에는 3.64배 생산성 증가, *Nocardia* sp. ACC18 균주는 30 mM methyl oleate를 feeding한 경우 6.99배, 15 mM sodium propionate 6.46배, 15 mM sodium acetate에는 5.58배 생산성 증가를 보여줌.

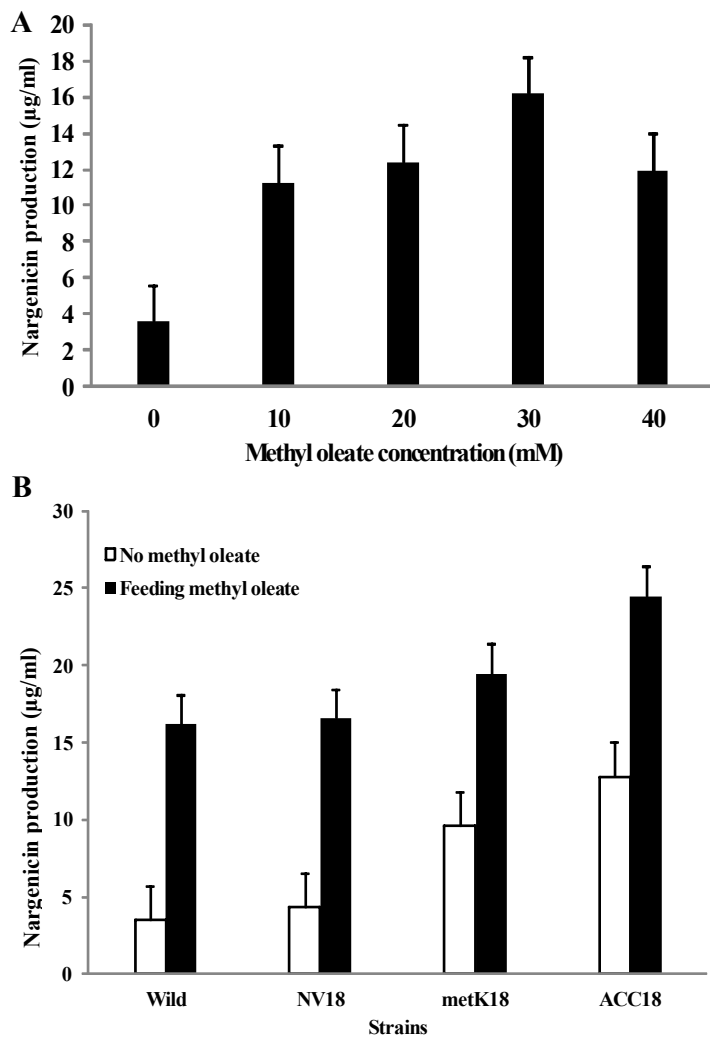


Fig. 25. (A). Nargenicin A<sub>1</sub> production in *Nocardia* sp. CS682 when feeding various concentrations of methyl oleate. (B). Comparison of nargenicin A<sub>1</sub> production in *Nocardia* sp. CS682 and its recombinant strains: *Nocardia* sp. NV18, *Nocardia* sp. metK18, and *Nocardia* sp. ACC18 when feeding 30 mM methyl oleate.

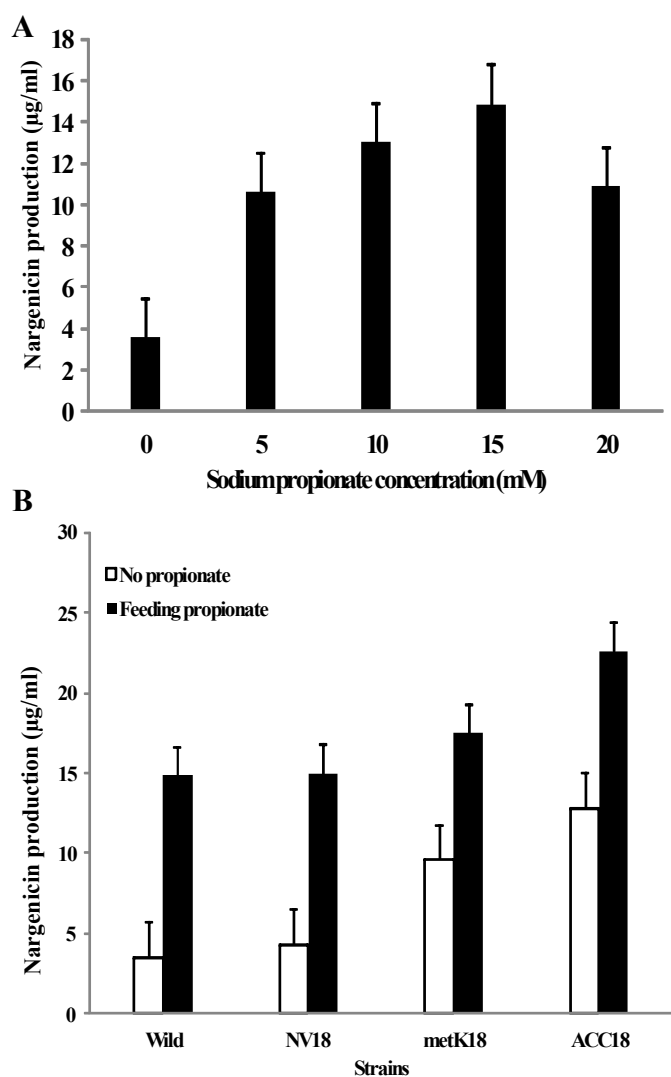


Fig. 26. (A). Nargenicin  $A_1$  production in *Nocardia* sp. CS682 when feeding various concentrations of sodium propionate. (B). Comparison of nargenicin  $A_1$  production in *Nocardia* sp. CS682 and its recombinant strains: *Nocardia* sp. NV18, *Nocardia* sp. metK18, and *Nocardia* sp. ACC18 when feeding 15 mM propionate.



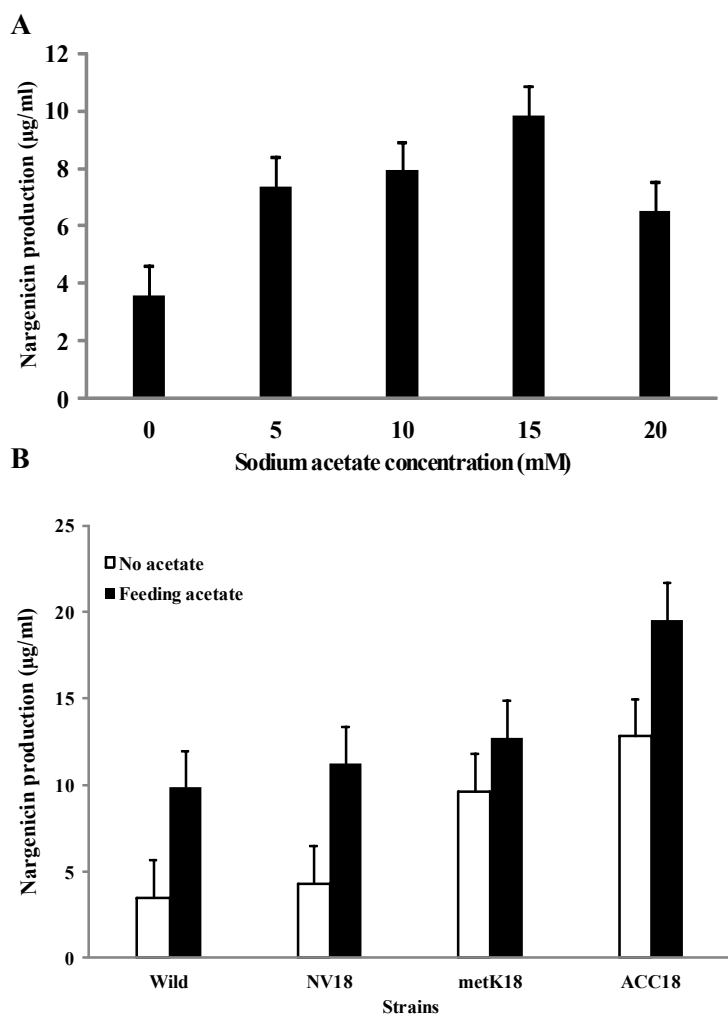


Fig. 27. (A). Nargenicin A<sub>1</sub> production in *Nocardia* sp. CS682 when feeding various concentrations of sodium acetate. (B). Comparison of nargenicin A<sub>1</sub> production in *Nocardia* sp. CS682 and its recombinant strains: *Nocardia* sp. NV18, *Nocardia* sp. metK18, and *Nocardia* sp. ACC18 when feeding 15 mM acetate.

6. Proline feeding에 의한 isonargenicin의 생산.

Isonargenicin은 일반적인 야생균주에서 Nargenicin A1에 비교하여 약 5% 정도 생산됨. *Nocardia* sp ACC18 균주 경우에 새로운 peak가 TLC에 확인이 되었음 (Fig. 28). 새로운 peak를 분리하여 구조를 확인한 결과 isonargenicin임을 NMR과 Mass에 의해 구조가 확인 되었음 (Fig.29-233). 특히 *Nocardia* sp ACC18 균주에 proline을 feeding을 하였을 경우 isonargenicin의 양이 급격히 증가되는 것을 볼 수 있음 (Fig. 30).

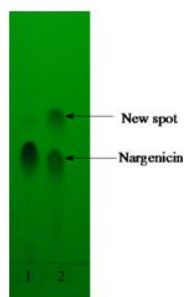


Fig. 28. TLC assay of compounds isolated from *Nocardia* sp. ACC18.1, Standard nargenicin 2, isolates from *Nocardia* sp. ACC18.

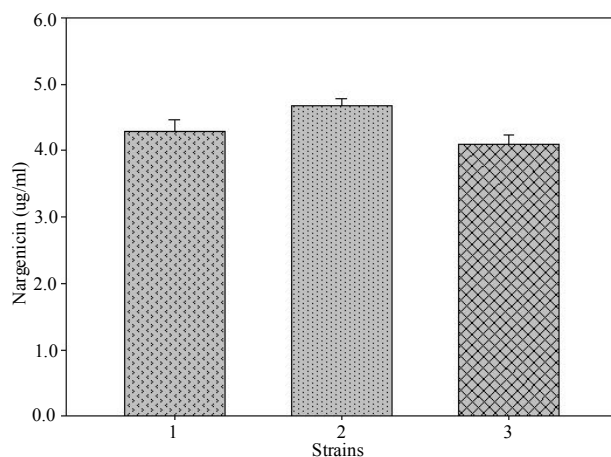


Fig. 29. Comparison of nargenicin production by *Nocardia* sp. CS682 and its transformants after feeding proline. 1. Nargenicin produced by *Nocardia* wild type, 2. Nargenicin produced by *Nocardia* sp. NV18, 3. Nargenicin produced by *Nocardia* sp. ACC18.

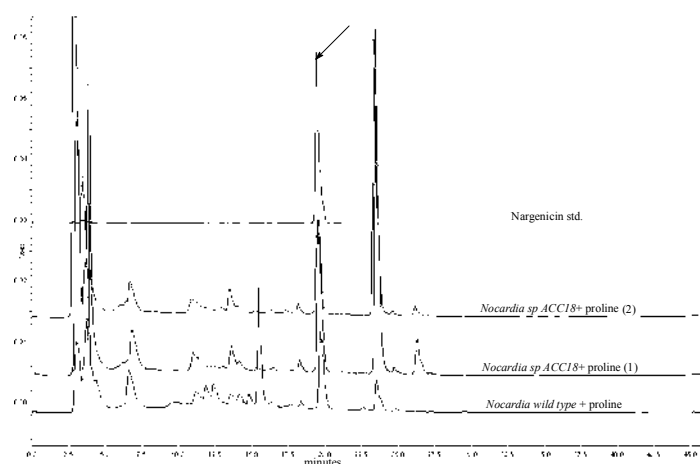


Fig. 30. HPLC chromatogram of compounds isolated from *Nocardia* sp. CS682 and its transformants after feeding proline. The peak corresponding to nargenicin is indicated by an arrow head.

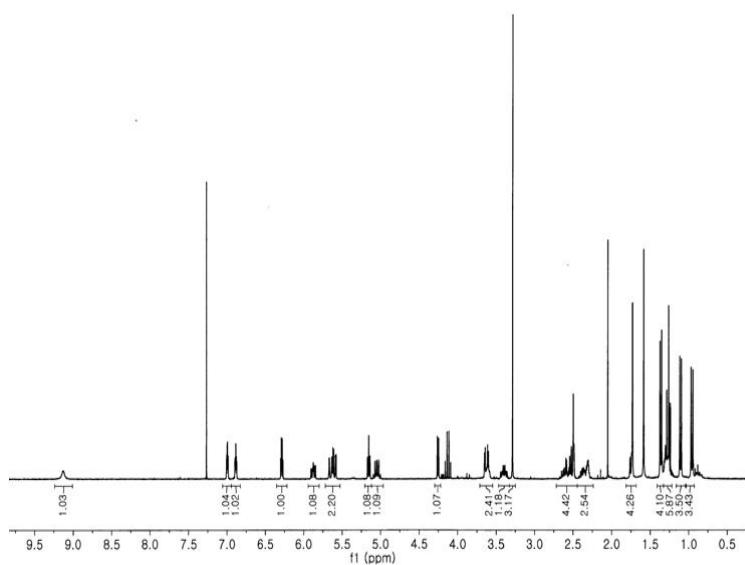


Fig. 31. <sup>1</sup>H-NMR of isonargenicin.

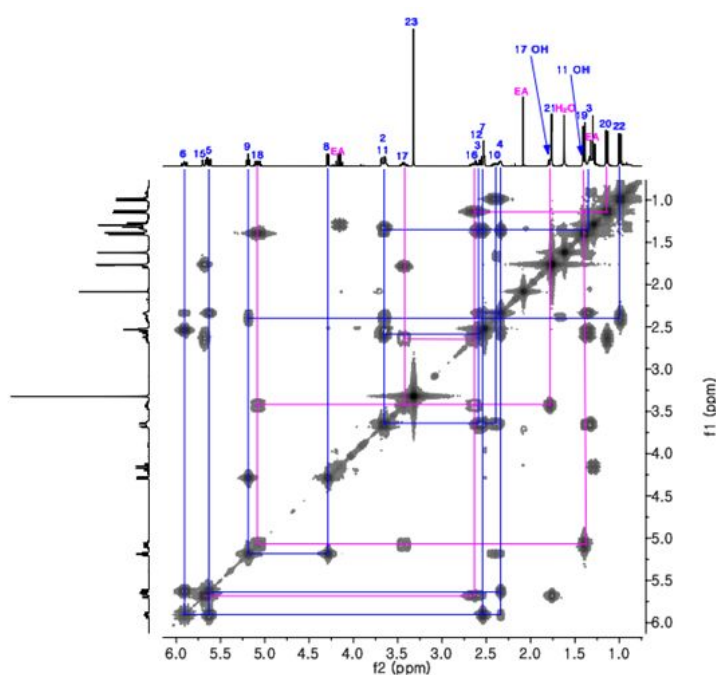


Fig. 32. COSY-NMR of isonargenicin

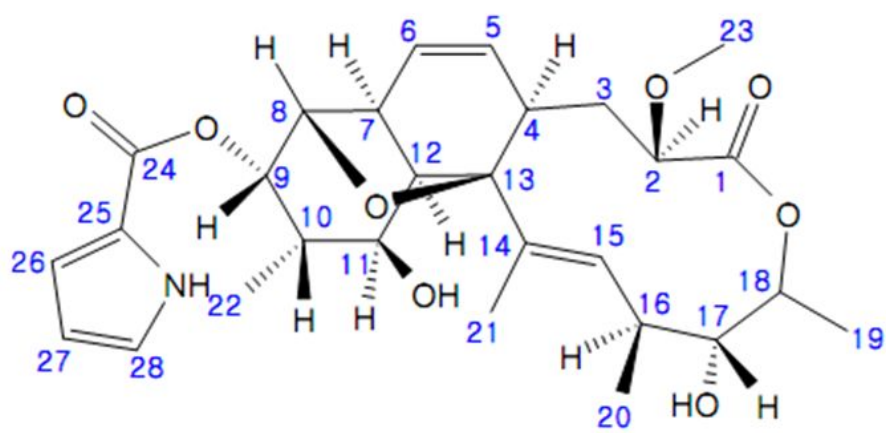


Fig. 33. 분석된 isonargenicin

Table 6. The *in vitro* antimicrobial activities (Minimum Inhibitory Concentration, MIC,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of Isonargenicin was compared to that of nargenicin

	Organism(24 h ( $10^6$ CFU/ml))	Nargenicin	N-ISO
1	<i>Alacligenes faecalis</i> ATCC 1004	>92	>92
2	<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212	>92	>92
3	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	>92	>92
4	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	0.18	5.78
5	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.18	0.36
6	<i>Mycrobacterium smegmatis</i> ATCC 9341	>92	>92
7	<i>Salmonella typhimrium</i> KCTC 1925	>92	>92
8	<i>Escherrichia coli</i> KCTC 1923	>92	>92
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC	>92	>92
10	MRSA 693E	0.18	5.78
11	MRSA 4-5	0.18	5.78
12	MRSA 5-3	0.18	5.78
13	VRE 82	>92	>92
14	VRE 89	>92	>92
15	VRE 98	>92	>92

## 제6절 : 3협동과제 (CS682 발효물의 사양시험)

연구 책임자 : 백 인 기

### 1. 산란계 1차 사양시험

#### 1) 시험사료

시험사료는 CP 16.2%, ME 2,760 kcal/kg 그리고 기타영양소는 NRC(1994) 영양소 요구량에 따름. 처리에 따라 사료 내 발효된 CS682의 건조물을 1/60으로 희석한 것을 0.1%, 1%로 첨가하였으며, 대조구 중 positive에는 antibiotics(avilamix premix avilamycin 0.02%)를 0.03%첨가함. (Table 1). 사료 배합은 사료의 안정성을 고려하여 7일 간격으로 배합하였으며, 미량원료는 premixer로 예비배합 후 실험사료와 200kg 용량의 수직형 배합기로 10분간 배합하였음.

#### 2) 시험 설계, 시험기간 및 사양방법

시험동물은 Hy-Line Brown 86주령 산란계 480수(4처리× 120수)를 공시하였으며, 중앙대학교 부속농장 2단 2열 A형 케이지에 수용하여 randomized block design으로 배치하였다. 물과 사료는 자유 채식하였고 점등은 16시간을 유지함. 사양 시험기간은 2008년 8월 28일부터 2008년 10월 02일까지 5주(35일)사육하였음.

#### 3) 조사항목 및 분석 방법

##### ① 생산성(production) : 산란율, 난중, 연파란, 사료섭취량, 사료요구율

산란율(hen-day egg production)은 매일 오후 4시에 집란 후 측정하였고, 평균 난중은 이상란(연파란)을 제외한 무게를 측정하여 측정치 주별 평균으로 계산하였음. 사료섭취량(Feed intake)은 주(week)당 1회 측정(급여량-잔량)함. 사료 요구율(Feed conversion ratio)은 [사료 섭취량, g / 100g 계란]으로 계산하였음.

##### ② 난품질(egg quality) : 난각강도, 난각두께, Haugh unit, 난황색, 난각색

총 6회(0, 1, 2, 3, 4, 5 weeks)에 걸쳐 주당 1회씩, 회당 총 200개(반복당 10, 처리당 50)의 계란을 임의로 선택하여 난각강도, 난각두께, 난각색, 난황색, Haugh unit 등의 품질검사를 실시함. 난각강도는 Texture Analyzer(Stable Micro System., UK)를 이용하여 측정하였고, 난각두께는 Dial Pipe Gauge(Model 7360, Mitutoyo Co, Kwasaki 213, Japan)를 이용하여 측정하였음.

Haugh unit는 HU formula(Eisen et al., 1962)에 기초해 난중(W g)과 난후 난백고 (H mm) (FHK 卵白測定臺, FHK Co., Japan)를 측정하여  $100\log(H-(1.7\times W^{0.37})+7.57)$ 의 공식에 의해서 계산함.

난각색과 난황색은 Color Fan (Egg shell ; Samyang Co, Korea, Egg yolk; Roche Co, Switzerland)을 이용하여 측정하였음.

### ③ 난황글로부린(IgY)

난중, 난각 강도, 난각색, 난황색, 난백고를 측정 후 Hatta의 방법(Hatta et al., 1988, 1990)에 따라 paper tissue를 이용하여 난백을 제거하고 난황막을 분리한 난황을 mixing 한 후 1일 냉장 보관(2~8℃)하였음. 측정일에 난황 5g을 증류수 5 mL(1:1)로 희석하고 30초 동안 homogenizer를 이용하여 균질화하였음. 그 다음 0.1%  $\lambda$ -carraginnan 20 mL(1:2, 4배 희석)을 넣어 30분간 정치, 10,000 rpm으로 15 min간 원심분리하여 수용성 부분(WSF)을 획득 한 다음 희석(1:20,000)하여 공시하였음. 난황 수용성 분획(WSF) 내 IgY의 농도는 sandwich ELISA방법을 이용하여 측정 계산 하였음. IgY standard reference 값은 Chicken IgY(Chicken IgY ELISA Kit ; Alphadiagnostic. cat#6030)를 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 ng/mL을 사용하여 작성하였음. 매 측정시 마다 회귀 방정식을 사용하여 값을 환산함.

### ④ 혈액성상 분석 및 IgG 측정

사양종료 직후 처리당 10수씩 총 40 수를 심장에서 혈액 5ml씩 EDTA가 처리된 vacutainer에 채혈한 후 24시간 안에 혈액분석기(HEMAVET® HV950FS, Drew Scientific, Inc.)로 분석하였고, 1,500rpm으로 20분간

원심분리한 후 혈청을 따로 분리하여 IgG 분석전 까지 냉동(-50℃)보관 하였음. IgG분석은 Chicken IgG ELISA Quantitation Kit(BETHUL Laboratorise, Inc. USA)를 이용하여 측정함.

#### ⑤ 장내미생물 분석

사양 시험 종료 직후 처리 당 10수씩 경추탈골에 의해 도계한 후 ileocecal junction 상부 10cm씩 일정하게 절개하여 그 안에 있는 모든 내용물을 멸균된 용기에 담아 분석전까지 -50℃에 보관하였음. 채취한 장내용물 약 1g을 멸균된 15ml test tube에 담고 멸균된 증류수 9ml을 첨가하여 희석 ( $10^{-1}$ )시킨 후  $10^{-2}$ ~ $10^{-8}$ 까지 단계적으로 희석하였음. 네 종류의 선택 평판에 희석된 샘플을 1ml씩 접종시키고 혐기적(Gaspack System, BBL Microbiology system, Becton Dickinson&Co.,Cockeysville, MD 2130, USA) 또는 호기적으로 배양하였음. 선택배지의 배양조건은 TABLE2 와 같다. 배양 후 미생물의 수를 각 평판의 colony-forming unit(CFU)으로 계산 후  $\log_{10}$ 으로 환산하였음.

#### ⑥ 통계분석

시험에서 얻어진 자료의 통계처리를 위하여 각 반복당 주당 평균 생산성을 SAS(1996) GLM(General Linear Model) Procedure를 이용하여 산란생산성, 계란 품질 및 혈액성장, 장내미생물, IgG, IgY를 분석하였으며, F-test 결과 유의성( $P>0.05$ )이 있을 경우 처리구 평균간의 차이를 Duncan's multiple range test로 검정하였음.



**Table 1. Formula and composition of basal diet**

Ingredients	Laying Hens
	%
Corn grain	61.71
Soybean meal	18.40
Rapeseed meal	1.50
Perilla meal	2.50
Corn gluten meal	2.78
Animal fat	2.18
Salt dehydrated	0.20
DCP(18.5%)	1.00
Limestone(2mm)	9.08
LIQ-Methionine	0.11
LIQ-Choline chloride (50%)	0.08
Vitamin premix <sup>1</sup>	0.15
Mineral premix <sup>2</sup>	0.15
PHYTASE-5000	0.01
SINTOX <sup>3</sup>	0.15
<b>Total</b>	100.0
Calculated composition	
ME (kcal/kg)	2,760
Crude protein (%)	16.00
Fat	4.63
Fiber	2.77
Ash	13.05
Ca (%)	3.80
available P (%)	0.30

<sup>1</sup> Vitamin premix provided per kilogram of diet: vitamin A, 13,500 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 3,150 IU; vitamin E, 22.5 IU; menadione, 3.0 mg; vitamin B<sub>12</sub>, 0.0225 mg; riboflavin, 6.0 mg; pantothenic acid, 12.75 mg; niacin, 30 mg; thiamine, 2.25 mg; pyridoxine, 4.5 mg; folic acid, 0.9 mg; and biotin, 0.1155 mg.

<sup>2</sup> Mineral premix provided per kilogram of diet: copper, 5.25 mg; iodine, 0.9 mg; iron, 60 mg; manganese, 82.5 mg; selenium, 0.195 mg; and zinc, 75 mg.

<sup>3</sup> Sintox per kilogram of diet : toxin binder (silica powder ; SiO<sub>2</sub> 48.0%, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 18.0%).

Table 2. Medium and culturing condition of microorganism

Microorganism	Selective media	Incubating condition	Incubation time(hour)
<i>Lactobacilli</i>	MRS agar	Aerobic	48h
<i>E.coli</i>	Desoxycholate agar	Aerobic	24h
<i>Cl.perfrigens</i>	TSC & SFP	Anaerobic	24h
<i>Salmonella typhimurium</i>	XLD agar	Aerobic	24h

1. Lactobacilli selective agar : DIFCO<sup>TM</sup> Lactobacilli MRS Broth + Bacto<sup>TH</sup> Agar
2. E. coli selective agar : DIFCO<sup>TM</sup> Desoxycholate agar
3. Cl. perfrigens selective agar : CM0587 Oxoid perfrigens agar base + supplement
4. S.typhimurium selctive agar : DIFCO<sup>TM</sup> XLD agar

\* 결과

① 생산성(production) 및 난품질(egg quality)

처리에 따른 생산성 및 난품질의 결과는 table 3에 요약.

**Table 3. Laying Performance of birds fed experimental diets 0~5 phases**

parameter	Treatments				SEM
	T1 control -negative	T2 control - antibiotics	T3 0.1 % level	T4 1% level	
<b>performance</b>					
Henday egg production,%	66.90	68.57	65.26	66.30	1.43
Henhouse egg prodection, %	66.90	68.57	64.41	65.71	1.42
Egg weight, g	68.32	67.83	68.55	68.30	0.52
Broken & sott egg, %	0.23 <sup>ab</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.05
Feed intake, g/day	113.84	112.52	116.80	118.23	1.61
Feed conversion g/100g egg mass	2.46	2.41	2.61	2.59	0.06
<b>Egg quality</b>					
Egg shell strength, (kg/mm <sup>2</sup> )	2.77 <sup>b</sup>	2.96 <sup>a</sup>	3.02 <sup>a</sup>	2.99 <sup>a</sup>	0.08
Egg shell thickness, (mm)	34.79 <sup>b</sup>	34.98 <sup>ab</sup>	35.09 <sup>ab</sup>	35.63 <sup>a</sup>	0.36
Egg yolk color	9.23 <sup>b</sup>	9.30 <sup>ab</sup>	9.35 <sup>ab</sup>	9.48 <sup>a</sup>	0.10
Egg shell color	10.28	10.25	10.58	10.52	0.18
Haugh unit	81.43	81.71	82.50	81.53	0.75

T1 : control diet,  
T2 : control diet +avilamycine 6ppm,  
T3 : control diet +fermented CS 682 0.1% level  
T4 : control diet +fermented CS 682 1.0% level

생산성적인 측면에서는 발효된 CS682 0.1%첨가구가 Henday egg production, Henhoused egg production, 연파란율이 유의적으로 감소됨을 보임. 난품질에서는 발효된 CS682 1.0% 첨가구가 난각강도, 난각두께, 난황색이 유의적으로 증가됨을 보임.

② 난황글로부린(IgY) 및 IgG

처리에 따른 IgG 및 IgY의 결과는 table 4에 요약.

**Table 4. Immunoglobulin**

parameter	Treatments				SEM
	T1 control -negative ve	T2 control - antibiotics	T3 0.1 % level	T4 1% level	
Immunoglobulin G (IgG)mg/ml	6.05	5.96	5.89	5.68	0.24
Immunoglobulin Y (IgY)mg/ml	8.59	9.24	9.43	8.73	0.22

면역적인 성분인 혈액속의 IgG 성분에서는 유의적인 차이는 없었으나 대조구가 가장 높은 경향을 나타냈으며, 난황속에 IgY 성분에서도 유의적인 차이는 없었으나 발효된 CS682 0.1% 첨가구가 비교적 높은 경향을 나타냄.

③ 혈액성상

처리에 따른 혈액성상 결과는 table 5에 요약.

백혈구에서는 HE와 SI(stress index), EO, BA가 유의적인 차이가 있었는데, 발효된 CS682 1.0%처리구가 HE, SI, EO, BA가 유의적으로 증가하였고, 대조구들(negative, positive)은 그와 반대로 유의적으로 감소함을 보임. 적혈구에서는 발효된 CS682 처리구들에서 RBC가 유의적으로 증가하였으며, MCV와 MCH가 유의적으로 감소함을 보임.

**Table 5. Leukocytes and erythrocytes in blood from Laying Hens fed experimental diets.**

parameter	Treatments				SEM
	T1 control -negative	T2 control - antibiotics	T3 0.1 % level	T4 1% level	
Leukocytes					
WBC (K/ $\mu\ell$ )	12.04	10.72	12.27	15.36	1.90
HE (K/ $\mu\ell$ )	1.82 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b</sup>	1.91 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>	0.65
LY (K/ $\mu\ell$ )	8.94	8.35	9.00	10.14	1.01
SI (NE/LY)	0.20 <sup>ab</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.16 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.04
MO (K/ $\mu\ell$ )	1.14	0.95	1.12	1.38	0.22
EO (K/ $\mu\ell$ )	0.12 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.18 <sup>ab</sup>	0.40 <sup>a</sup>	0.11
BA (K/ $\mu\ell$ )	0.02 <sup>b</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.06 <sup>ab</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.05
Erythrocytes					
RBC (M / $\mu\ell$ )	2.76 <sup>b</sup>	2.81 <sup>ab</sup>	2.82 <sup>a</sup>	2.99 <sup>a</sup>	0.08
Hb (g/dl)	9.99	10.76	10.33	10.73	0.31
HCT (%)	25.32	25.62	24.99	26.55	0.75
MCV (fL)	91.57 <sup>a</sup>	91.06 <sup>ab</sup>	88.97 <sup>b</sup>	88.88 <sup>b</sup>	0.94
MCH (pg)	36.30 <sup>b</sup>	38.32 <sup>a</sup>	36.72 <sup>b</sup>	35.96 <sup>b</sup>	0.60
MCHC (g/dl)	39.64 <sup>b</sup>	42.05 <sup>a</sup>	40.19 <sup>ab</sup>	40.45 <sup>ab</sup>	0.85

T1 : control diet, T2 : control diet +avilamycine 6ppm, T3 : control diet +fermented CS 682 0.1% level, T4 : control diet +fermented CS 682 1.0% level

WBC : White blood cell, NE : Neutrophil, LY : Lymphocyte, MO : Monocyte, EO : Eosinophil, SI : Stress indicator, RBC : Red blood cell, Hb : hemoglobin, HCT : Hematocrit, MCV : Mean corpuscular volume, MCH : Mean corpuscular hemoglobin, MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration.

<sup>a-b</sup>Means with the different supercripts differ significantly (P < 0.05)

④ 장내미생물

처리에 따른 장내미생물 결과는 table 6에 요약하였다.  
 각 처리간에 유의적인 차이는 없었다.

**Table 6. Microflora in small intestine**

parameter	Treatments(cfu log <sub>10</sub> /g)				SEM
	T1 control -negative e	T2 control - antibiotics	T3 0.1 % level	T4 1% level	
<i>Lactobacilli</i>	6.38	7.22	7.22	6.70	0.290
<i>E.coli</i>	3.94	3.9	4.56	3.54	0.585
<i>Cl.perfringens</i>	1.22	1.66	1.32	0.76	0.549
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.68	1.18	1.14	1.92	0.290

2. 육계 사양 시험(cage)

1) 시험사료

시험사료는 CP 21.02%, ME 3,100 kcal/kg 그리고 기타영양소는 NRC(1994) 영양소 요구량에 따름.(Table1)

2) 시험 설계, 시험기간 및 사양방법

시험동물은 2일령 평균체중이 40.5±0.1g인 육계(ROSS ®)2,40수(암, 수 각 120수)를 공시하였으며, 4주간 사양시험을 실시함. 시험설계는 처리에 따라 사료 내 발효된 CS682의 건조물을 1/60으로 희석한 것을 0.25%, 0.5%, 0.75%, 0.1%를 첨가하였으며, 대조구 중 positive에는 antibiotics(avilamix premix avilamycin 0.02%)를 0.03% 첨가하함. 총 6처리를 하여 처리 당 4반복, 반복 당 10수씩 완전 임의배치하였음. (Table 1). 사료 배합은 사료의 안정성을 고려하여 7일 간격으로 배합하였으며, 미량원료는 premixer로 예비배합 후 시험사료와 200kg 용량의 수직형 배합기로 10분 간 배합하였음.

### 3) 조사항목 및 분석 방법

#### ① 생산성(증체량, 사료섭취량, 사료효율, 폐사율, 생산지수)

증체량은 시험개시 시 2주째, 시험종료 시에 각각 측정하였음. 사료섭취량은 체중측정 시 사료급여량에서 잔량을 제하여 산출하였으며, 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출하였음. 생산지수 측정은 다음의 식을 이용하여 산출함.

$$\text{Production index} = \{(\text{average wt.} \times \text{survivability}) / (\text{shipping age} \times \text{feed conversion ratio})\} \times 100$$

#### ② 혈구성분분석(적혈구, 백혈구)

사양시험 종료 직후 총 40수(처리당 2수, 반복당 8수)를 선발하여 경추 탈골에 의해 희생시킨 직후 심장에서 혈액을 채취하였으며, 항응고제(EDTA)가 처리된 진공채혈관(vacutainer)에 3ml씩 2회 담아 혈액의 응고를 방지함. 24시간 안에 혈구분석기(HEMACYTE;OSI, Oxford Science, Inc)를 이용하여 혈구조성(Leukocytes, Erythrocytes)을 분석하였고, 이호성구(HE)값과 림프구(LY)값을 이용하여 stress indicator를 측정하였음.

③ 면역글로불린(혈장 IgG)혈구조성 분석 후 25,000×g 로 20min 원심분리(sigma-4, Aldrich Corporation, ST. Louis, Missouri, USA)하여 혈장을 따로 분리한 후 분석 전까지 냉동 보관함. 혈장 내 IgG의 농도는 Manchini(1965)에 의해 개발된 single radial immune-diffusion test(RID test)법에 준하여 측정.

#### ④ 소장 내 미생물 균총

혈액 채취 후 개체들의 회맹장 (ileo-cecal junction)의 상부10cm씩 일정하게 절개하여 그 안에 있는 모든 내용물을 멸균된 용기에 담아 분석전까지 -50에서 보관함.

UltraCleans™FecalDNAKit(MOBIO, Carlsbad, CA)장 내용물을 0.25g씩 bead tube에 담은 후 DNA를 추출. 이 DNA products를 이용하여 real-time PCR로 분석하였는데, SYBR Green PCR technology 방법을 이용했으며, specific-species 16S rRNA primers는 *C.perfringens* group (F: 5'-ATGCAAGTCGACCGAG/DG-3', R: 5'-TATCGGGTATTA A T C T ( C / T ) C C T T T - 3' ) , *E.coli* subgroup (F: 5'-G T T A A T A C C T T T G C T C A T T G A - 3' , R: 5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3') *Lactobacillus* spp.(F: 5'-AGCAGTAGG GAATCTTCCA-3', R: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'), *Salmonella* spp.(F: 5' -

TTA TTA GGA TCG CGC CAG GC -3', R: 5' - GGA CCA CGA TCA CCG  
ATC A - 3')을 사용함.

⑤ 통계분석

시험에서 얻어진 자료의 통계처리를 위하여 각 반복당 주당 평균 생산성을 SAS(1996) GLM(General Linear Model) Procedure를 이용하여 분석하였으며, F-test 결과 유의성( $P > 0.05$ )이 있을 경우 처리구 평균간의 차이를 Duncan's multiple range test로 검정함



**Table 1. Formula and composition of basal diet**

<b>Ingredients</b>	<b>Broiler</b>
	%
Corn 301 USA	56.60
SEM 45%-IMP	28.20
Corngluten-Loc	5.60
Yellow grease	4.20
Limestone-F	1.20
DCP	2.20
Carrier(whebran)	1.242
Salt	0.21
Lysine HCL	0.107
Methionine 99%	0.171
Daeyang 44	0.27
Total	100.0
Calculated composition	
ME(Kcal/kg)	3100.06
DM(%)	88.00
CP(%)	21.02
FAT(%)	6.44
Fiber(%)	3.11
ASH(%)	6.24
CA(%)	1.02
P(%)	0.77
Met+ Cys	0.85

Table 2. Performance of broiler chicks fed experimental diets(4wks)

Parameter	w k	Treatments <sup>1</sup>						SEM
		control	antibiotics	CS682-0.25%	CS682-0.50%	CS682-0.75%	CS682-1.00%	
Weight gain, g/ bird	0-2	425.5 <sup>b</sup>	426.2 <sup>b</sup>	445.63 <sup>a</sup>	435.53 <sup>ab</sup>	438.6 <sup>ab</sup>	422.38 <sup>b</sup>	2.992
	3-4	675.5	766.58	748.5	735.8	737.8	772.13	15.833
	0-4	1060.4	1151.2	1153.6	1129.6	1124.0	1154.0	15.179
Feed intake, g/ bird	0-2	626.3	664.0	631.8	673.0	672.5	647.4	8.999
	3-4	1325.8	1357.9	1347.5	1342.6	1305.6	1305.5	19.075
	0-4	1669.6	2021.9	1979.3	2115.6	1978.1	1952.9	22.900
Feed conversion	0-2	1.63 <sup>ab</sup>	1.73 <sup>a</sup>	1.56 <sup>b</sup>	1.63 <sup>ab</sup>	1.74 <sup>a</sup>	1.70 <sup>a</sup>	0.018
	3-4	1.93 <sup>a</sup>	1.78 <sup>ab</sup>	1.80 <sup>ab</sup>	1.83 <sup>ab</sup>	1.77 <sup>ab</sup>	1.69 <sup>b</sup>	0.028
	0-4	1.82	1.72	1.72	1.74	1.71	1.69	0.019
Mortality, %	0-2	0	2.5	0	2.5	2.5	0	1.021
	3-4	2.5	0	0	0	0	0	0.884
	0-4	2.5	2.5	0	2.5	2.5	0	1.021
Production Index <sup>2</sup>	0-4	205.13	234.40	240.30	226.60	229.28	243.63	5.865

<sup>1</sup>Treatments: Control(C); control diet, Antibiotics; C + Avilamycine 6ppm, CS682-0.25%; C + *Actinomyces* fermentCS6820.25%, CS682-0.5%;C+*Actinomyces* ferment CS682 0.5%, CS682-0.75%; C+*Actinomyces* ferment CS682 0.75%, CS682-1.0%;C+*Actinomyces* ferment CS682 1.0%

<sup>2</sup>Production index: Production index ={(average wt.× survivability)/ (shipping age × feed conversion ratio)} × 100

<sup>a-b</sup>Means with the different superscripts differ significantly ( $p<0.05$ )

**Table 3.** Table 5. Leukocytes and erythrocytes in blood from Laying Hens fed experimental diets

Parameter <sup>s</sup>	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	Control	Antibiotics	CS682-0.25%	CS682-0.50%	CS682-0.75%	CS682-1.00%	
<b>Leukocytes<sup>2</sup></b>							
WBC (K/ $\mu$ l)	28.55	29.95	26.94	26.96	28.74	27.35	1.111
NE (K/ $\mu$ l)	8.61	9.74	8.36	8.36	9.14	8.6	0.619
LY (K/ $\mu$ l)	15.66	15.35	14.23	14.31	14.86	14.19	0.489
SI (NE/LY)	0.55	0.65	0.59	0.59	0.63	0.61	0.046
MO (K/ $\mu$ l)	3.01	3.08	2.68	2.80	3.04	2.89	0.108
EO (K/ $\mu$ l)	1.00	1.36	1.24	1.41	1.30	1.30	0.139
BA (K/ $\mu$ l)	0.30	0.450	0.450	0.53	0.44	0.44	0.067
<b>Erythrocyte<sup>s</sup></b>							
RBC (M/ $\mu$ l)	2.58	2.43	2.51	2.49	2.43	2.43	0.049
Hb (g/dl)	7.63	7.13	7.40	7.30	7.30	7.23	0.188
HCT (%)	26.81	25.14	25.95	25.59	25.93	24.60	0.537
MCV (fL)	105.20 <sup>ab</sup>	104.13 <sup>ab</sup>	103.81 <sup>ab</sup>	103.29 <sup>b</sup>	106.95 <sup>a</sup>	101.94 <sup>b</sup>	0.751
MCH (pg)	29.88	29.55	59.59	29.48	30.14	29.99	0.521
MCHC (g/dl)	28.38	28.38	28.49	28.54	28.18	29.41	0.418
PLT	25.25	27.0	29.13	29.63	30.63	22.31	2.368

<sup>1</sup>Treatments: Control(C); control diet, Antibiotics; C + Avilamycine 6ppm, CS682-0.25%; C + *Actinomyces*fermentCS6820.25%,CS682-0.5%;C+*Actinomyces*fermentCS6820.5%,CS682-0.75%;C+*Actinomyces*fermentCS6820.75%,CS682-1.0%;C+*Actinomyces*fermentCS6821.0% <sup>2</sup>Leukocytes: WBC; White blood cell, HE; Heterophi, LY; Lymphocyte, MO; Monocyte, EO; Eosinophi, SI; Stress indicator,

<sup>3</sup>Erythrocytes:RBC;Redbloodcell,Hb;hemoglobin,HCT;Hematocrit,MCV;Meancorpuscularvolume,MCH;Meancorpuscularhemoglobin,MCHC;Meancorpuscularhemoglobinconcentration.

<sup>a-b</sup>Means with the different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ )

### 3. 산란계 2차 사양 시험

#### 1) 시험사료

시험사료는 CP 16.2%, ME 2,750 kcal/kg 그리고 기타영양소는 NRC(1994) 영양소 요구량에 따름. 처리에 따라 대한뉴팜에서 제조한 발효건조물을 0.05%, 0.1%, 0.2% 로를 첨가하였으며, 대조구 중 positive에는 antibiotics(avilamix premix avilamycin 0.02%)를 0.03%첨가함. (Table 1). 사료 배합은 사료의 안정성을 고려하여 7일 간격으로 배합하였으며, 미량원료는 premixer로 예비배합 후 실험사료와 200kg 용량의 수직형 배합기로 10분간 배합함.

#### 2) 시험 설계, 시험기간 및 사양방법

시험동물은 Hy-Line Brown 22주령 산란계 1000수(5처리× 200수)를 공시하였으며, 중앙대학교 부속농장 2단 2열 A형 케이지에 수용하여 randomized block design으로 배치함. 물과 사료는 자유 채식하였고 점등은 16시간30분을 유지하였고, 5주(35일)사육함.

#### 3) 조사항목 및 분석 방법

##### ① 생산성(production) : 산란율, 난중, 연파란, 사료섭취량, 사료요구율

산란율(hen-day egg production)은 매일 오후 4시에 집란 후 측정하였고, 평균 난중은 이상란(연파란)을 제외한 무게를 측정하여 측정치 주별 평균으로 계산하였음. 사료섭취량(Feed intake)은 주(week)당 1회 측정(급여량-잔량)하였음. 사료 요구율(Feed conversion ratio)은 [사료 섭취량, g / 100g 계란]으로 계산함.

##### ② 난품질(egg quality) : 난각강도, 난각두께, Haugh unit, 난황색, 난각색

총 6회(0, 1, 2, 3, 4, 5 weeks)에 걸쳐 주당 1회씩, 회당 총 200개(반복당 10, 처리당 50)의 계란을 임의로 선택하여 난각강도, 난각두께, 난각색, 난황색, Haugh unit 등의 품질검사를 실시함. 난각강도는 Texture Analyzer(Stable Micro System., UK)를 이용하여 측정하였고, 난각두께는 Dial Pipe Gauge(Model 7360, Mitutoyo Co, Kwasaki 213, Japan)를 이용하여 측정함. Haugh unit는 HU formula(Eisen et al., 1962)에 기초해 난중(W g)과 농후 난백고 (H mm) (FHK 卵白測定臺, FHK Co.,

Japan)를 측정하여  $100\log(H-(1.7 \times W^{0.37})+7.57)$ 의 공식에 의해서 계산함. 난각색은 색차계를 이용하여 측정하였고, 난황색은 Color Fan 을 이용하여 측정함.

### ③ 난황글로부린(IgY)

난중, 난각 강도, 난각색, 난황색, 난백고를 측정 후 Hatta의 방법(Hatta et al., 1988, 1990)에 따라 paper tissue를 이용하여 난백을 제거하고 난황막을 분리한 난황을 mixing 한 후 1일 냉장 보관( $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ )하였다. 측정일에 난황 5 g을 증류수 5 mL(1:1)로 희석하고 30초 동안 homogenizer를 이용하여 균질화하였음. 그 다음 0.1%  $\lambda$ -carraginnan 20 mL(1:2, 4배 희석)을 넣어 30분간 정치, 10,000 rpm으로 15 min간 원심분리하여 수용성 부분(WSF)을 획득 한 다음 희석(1:20,000)하여 공시하였음. 난황 수용성 분획(WSF) 내 IgY의 농도는 sandwich ELISA방법을 이용하여 측정 계산함. IgY standard reference 값은 Chicken IgY(Chicken IgY ELISA Kit ; Alphadiagnostic. cat#6030)를 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 ng/mL을 사용하여 작성함. 매 측정시 마다 회귀 방정식을 사용하여 값을 환산.

### ④ 혈액성상 분석 및 IgG 측정

사양종료 직후 처리 당 10수씩 총 40 수를 심장에서 혈액 5ml씩 EDTA가 처리된 vacutainer에 채혈한 후 24시간 안에 혈액분석기(HEMAVET<sup>®</sup> HV950FS, Drew Scientific, Inc.)로 분석하였고, 1,500rpm으로 20분간 원심분리한 후 혈청을 따로 분리하여 IgG 분석전 까지 냉동( $-50^{\circ}\text{C}$ )보관하였다. IgG분석은 Chicken IgG ELISA Quantitation Kit(BETHUL Laboratorise, Inc. USA)를 이용하여 측정함.

### ⑤ 소장 내 미생물 균총

혈액 채취 후 개체들의 회맹장 (ileo-cecal junction)의 상부10cm씩 일정하게 절개하여 그 안에 있는 모든 내용물을 멸균된 용기에 담아 분석전까지  $-50^{\circ}\text{C}$ 에서 보관함. UltraCleans<sup>TM</sup>FecalDNAKit(MOBIO, Carlsbad, CA)장 내용물을 0.25g씩 bead tube에 담은 후 DNA를 추출. 이 DNA products를 이용하여 real-time PCR로 분석하였는데, SYBR Green PCR technology 방법을 이용했으며, specific-species 16S rRNA primers는 *Cl.perfringens*group(F:5'-ATGCAAGTCGAGCGA(G/T)G-3', R:5'-T A T G C G G T A T T A A T C T ( C / T ) C C T T T - 3' ) , *E.coli* subgroup (F:5'-G T T A A T A C C T T T G C T C A T T G A - 3' ,

R:5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3')*Lactobacillus*spp.(F:5'-AGCAGTAGG  
GAATCTTCCA-3', R: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'),*Salmonella* spp.(F: 5' -  
TTA TTA GGA TCG CGC CAG GC -3', R: 5' - GGA CCA CGA TCA CCG  
ATC A - 3')을 사용함.

⑥ 통계분석

시험에서 얻어진 자료의 통계처리를 위하여 각 반복당 주당 평균 생산성을 SAS(1996) GLM(General Linear Model) Procedure를 이용하여 분석하였으며, F-test 결과 유의성( $P > 0.05$ )이 있을 경우 처리구 평균간의 차이를 Duncan's multiple range test로 검정함.

**Table 1.** Composition and nutrient content of the basal (control) diet.(1000birds)

Composition	Amount
Ingredients	----- % -----
Corn, ground	41.45
Wheat, ground	15.00
SBM - 44	25.00
DDGS <sup>1</sup>	5.00
Canola meal	2.00
Animal fat	0.50
Molasses	0.50
Granular Ark Shell	1.00
Dicalcium phosphate	0.70
Limestone	8.70
Premix <sup>2</sup>	0.15
Total	100.00
Nutrient	
ME <sup>3</sup> ,kcal/kg	2,750
CP, %	16.5
Fat, %	2.90
Ash, %	13.40
Ca, %	3.90
Available P, %	0.33
Lys, %	0.90
Met, %	0.45

1 DDGS: Distiller's dried grains with soluble.

2 Provided per kg of diet: vitamin A, 7,000,000 IU; vitamin D3,1,500,000IU;vitaminE,10,000IU;vitaminK3,1,000mg,vitaminB1,1,200mg;vitaminB2,3,000mg;vitaminB6,6,000mg;vitaminB12,18mg;folicacid,400mg;biotin,40mg;Mg,150mg;Zn,60,000mg;Mn,90,000mg;Fe,40,000mg;Cu,8,000mg;Co,100mg;I,1,000mg;Se,250mg.

3 Calculated value.

**Table 2. Laying Performance of birds fed experimental diets 0~5 phases(1000birds)**

item	Treatments					sem
	T1 control	T2 Antibiotics	T3 CS682-0.05%	T4 CS682-0.1%	T5 CS682-0.2%	
<b>performance</b>						
Henday egg production,%	94.43	94.50	94.52	95.36	94.40	0.416
Henhouse egg production, %	94.43	94.50	94.30	95.36	94.21	0.427
Egg weight, g	67.88	68.26	67.50	67.91	67.81	0.235
Broken & sodd egg, %	0.11	0.12	0.15	0.12	0.05	0.032
Feed intake, g/day	113.41	111.76	110.70	112.87	111.60	2.079
Feed conversion g/100g egg mass	1.77	1.74	1.74	1.75	1.75	0.036
<b>Egg quality</b>						
Egg shell strength, (kg/mm <sup>2</sup> )	4.22	4.29	4.29	4.32	4.34	1.528
Egg shell thickness, (mm)	35.88	35.82	36.00	36.29	36.38	0.221
Egg shell color (Hunter L)	52.25 <sup>a</sup>	51.32 <sup>b</sup>	51.44 <sup>b</sup>	51.25 <sup>b</sup>	51.87 <sup>b</sup>	0.637
a	18.57	14.81	14.80	14.76	14.60	7.134
b	19.69	19.41	19.53	19.44	19.83	0.856
Egg yolk color	8.67 <sup>b</sup>	8.84 <sup>ab</sup>	8.91 <sup>ab</sup>	8.96 <sup>a</sup>	9.05 <sup>a</sup>	0.071
Haugh unit	95.02 <sup>b</sup>	96.32 <sup>a</sup>	96.23 <sup>ab</sup>	96.49 <sup>a</sup>	95.78 <sup>ab</sup>	0.378

<sup>a-b</sup>Means with the different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ )



Table3. Leukocytes and erythrocytes in blood from Broiler fed experimental diets.

Parameters	Treatments					SEM
	control	antibiotics	CS682-0.05%	CS682-0.10%	CS682-0.20%	
<b>Leukocytes</b>						
<del>WBC</del> (K/ $\mu$ l)	17.29	18.08	19.46	16.06	17.55	1.734
NE (K/ $\mu$ l)	1.80	1.39	2.32	2.17	2.13	0.389
LY (K/ $\mu$ l)	13.93	15.30	14.13	12.13	11.67	1.809
<del>NE</del> (LY)	0.14	0.11	0.24	0.19	0.19	0.048
MO (K/ $\mu$ l)	1.95 <sup>a</sup>	1.20 <sup>a</sup>	1.43 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.249
EO (K/ $\mu$ l)	0.18	0.19	0.37	0.31	0.42	0.091
BA (K/ $\mu$ l)	0.04 <sup>b</sup>	0.07 <sup>ab</sup>	0.13 <sup>ab</sup>	0.12 <sup>ab</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.041
<b>Erythrocyte</b>						
<del>RBC</del> (M)	2.28 <sup>b</sup>	2.58 <sup>a</sup>	2.37 <sup>ab</sup>	2.21 <sup>b</sup>	2.45 <sup>ab</sup>	0.083
Hb (g/dl)	6.82	7.10	6.68	6.86	7.28	0.274
HCT (%)	18.82 <sup>b</sup>	24.98 <sup>a</sup>	22.72 <sup>ab</sup>	21.16 <sup>ab</sup>	24.08 <sup>a</sup>	1.591
MCV (fL)	82.28	97.06	95.98	95.32	80.08	9.576
MCH (pg)	30.02 <sup>ab</sup>	27.50 <sup>b</sup>	28.18 <sup>ab</sup>	31.08 <sup>a</sup>	29.82 <sup>ab</sup>	0.933
<del>MCHC</del>	40.68	28.46	29.54	33.18	30.38	4.222

WBC : White blood cell, HE : Heterophil, LY : Lymphocyte, MO : Monocyte, EO : Eosinophi, SI : Stress indicator, RBC : Red blood cell, Hb : hemoglobin, HCT : Hematocrit, MCV : Mean corpuscular volume, MCH : Mean corpuscular hemoglobin, MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration.

<sup>a-b</sup> Means with the different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

#### 4. 육계 2차 사양 시험(Floor)

##### 1) 시험사료

시험사료는 CP 21.02%, ME 3,100 kcal/kg 그리고 기타영양소는 NRC(1994) 영양소 요구량에 따름.(Table1)

##### 2) 시험 설계, 시험기간 및 사양방법

시험동물은 2일령 평균체중이  $40.5 \pm 0.1$ g인 육계(ROSS ®)1000수(암, 수 각 500수)를 공시하였으며, 5주간 사양시험을 실시함. 시험설계는 처리에 따라 대한뉴팜에서 제조한 발효건조물을 0.05%, 0.1%, 0.2% 로를 첨가하였으며, 대조구 중 positive에는 antibiotics(avilamix premix avilamycin 0.02%)를 0.03%첨가하였음. (Table 1). 총 5처리를 하여 처리 당 4반복, 반복 당 50수씩 완전 임의 배치함. (Table 1). 사료 배합은 사료의 안정성을 고려하여 7일 간격으로 배합하였으며, 미량원료는 premixer로 예비배합 후 실험사료와 200kg 용량의 수직형 배합기로 10분간 배합함.

##### 3) 조사항목 및 분석 방법

###### ① 생산성(증체량, 사료섭취량, 사료효율, 폐사율, 생산지수)

증체량은 시험개시 시 2주째, 시험종료 시에 각각 측정하였다. 사료섭취량은 체중측정 시 사료급여량에서 잔량을 제하여 산출하였으며, 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출함. 생산지수 측정은 다음의 식을 이용하여 산출.

$$\text{Production index} = \{(\text{average wt.} \times \text{survivability}) / (\text{shipping age} \times \text{feed conversion ratio})\} \times 100$$

###### ② 혈구성분분석(적혈구, 백혈구)

사양시험 종료 직후 총 40수(처리당 2수, 반복당 8수)를 선발하여 경추 탈골에 의해 희생시킨 직후 심장에서 혈액을 채취하였으며, 항응고제(EDTA)가 처리된 진공채혈관(vacutainer)에 3ml씩 2회 담아 혈액의 응고를 방지함. 24시간 안에 혈구분석기(HEMACYTE;OSI, Oxford Science, Inc)를 이용하여 혈구구성(Leukocytes, Erythrocytes)을 분석하였고, 이호성구(HE)값과 림프구(LY)값을 이용하여 stress indicator를 측정함.

### ③ 면역글로불린(혈장 IgG)혈구조성

분석 후 25,000×g 로 20min 원심분리(sigma-4, Aldrich Corporation, ST. Louis, Missouri, USA)하여 혈장을 따로 분리한 후 분석 전까지 냉동 보관함. 혈장 내 IgG의 농도는 Manchini(1965)에 의해 개발된 single radial immune-diffusion test(RID test)법에 준하여 측정.

### ④ 소장 내 미생물 균총

혈액 채취 후 개체들의 회맹장 (ileo-cecal junction)의 상부10cm씩 일정하게 절개하여 그 안에 있는 모든 내용물을 멸균된 용기에 담아 분석전까지 -50에서 보관하였음.

UltraCleans™FecalDNAKit(MOBIO, Carlsbad, CA)장 내용물을 0.25g씩 bead tube에 담은 후 DNA를 추출. 이 DNA products를 이용하여 real-time PCR로 분석하였는데, SYBR Green PCR technology 방법을 이용했으며, specific-species 16S rRNA primers는 *C.perfringens* group (F: 5'-ATGCAAGTCGAGCGA(G/DG-3', R: 5'-TATCGGGTATTA A T C T ( C / T ) C C T T T - 3' ) , *E. coli* subgroup (F: 5'-G T T A A T A C C T T T G C T C A T T G A - 3' , R: 5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'), *Lactobacillus* spp.(F: 5'-AGCAGTAGG GAATCTTCCA-3', R: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'), *Salmonella* spp.(F: 5' - T T A T T A G G A T C G C G C C A G G C - 3' , R: 5' - G G A C C A C G A T C A C C G A T C A - 3')을 사용함.

### ⑤ 통계분석

시험에서 얻어진 자료의 통계처리를 위하여 각 반복당 주당 평균 생산성을 SAS(1996) GLM(General Linear Model) Procedure를 이용하여 분석하였으며, F-test 결과 유의성(P>0.05)이 있을 경우 처리구 평균간의 차이를 Duncan's multiple range test로 검정함.

### \* 결과

- 생산성(증체량, 사료섭취량, 사료효율, 폐사율, 생산지수)

처리에 따른 생산성의 결과는 Table 2에 요약함.

- 혈액성상

처리에 따른 혈액성상 결과는 Table3에 요약

Table 2. Formula and composition of experimental basal diet

Ingredients	%
Corn	23.40
Wheat	38.87
Soybean meal	27.10
Rape seed meal	3.00
Animal fat	4.50
Lysine 78%	0.26
Threonine 10%	0.25
NSP enzyme	0.05
Phytase	0.05
Anticoccidial drug	0.05
Sodium hydrogen carbonate	0.20
Dicalcium phosphate	1.30
Sodium chloride	0.26
Broiler premix <sup>1</sup>	0.10
Calcium carbonate	0.61
Total	100
Calculated composition	%
ME, kcal/kg	3,100
Calcium	0.09
Phosphorus	0.58
Available. Phosphorus	0.40
Lysine	1.13
Methionine	0.50
Methionine + Cystine	0.85
Threonine	0.74
Tryptophan	0.25
Arginine	1.28

<sup>1</sup>Contains per kg: vitamin A, 9,000IU; vitamin D<sub>3</sub>,2,500IU; vitamin E,20IU, vitamin K,1.2mg; thiamin,1.2mg; riboflavin,4mg; niacin,20mg; pteridoxin,8mg; choline,1,200mg; biotin,0.5mg; folic acid,0.5mg; Mg,0.15mg; Cu,10mg; Mn,105mg; Se,0.25mg; Zn,75mg; I,1mg; Fe,50mg; Co,0.1mg.

**Table2. Performance of broiler chicks fed experimental diets(5wks)**

Parameter	wk s	Treatments					SEM
		control	antibiotics	CS682- 0.05%	CS682- 0.10%	CS682-0.20 %	
Weight gain, g/ bird	0-3	851.2	864.6	848.6	837.5	846.5	24.814
	3~5	817.1	878.9	888.7	874.08	866.1	37.906
	0-5	1706.9	1836.7	1756.1	1754.7	1756.3	40.195
Feed intake, g/ bird	0-3	1245.6	1240.0	1247.7	1231.8	1262.6	24.622
	3~5	1171.7	1235.9	1155.9	1171.6	1146.2	68.717
	0-5	2417.3	2474.9	2403.6	2403.4	2408.7	60.931
Feed conversion	0-3	1.47	1.43	1.47	1.47	1.49	0.029
	3~5	1.40	1.26	1.29	1.27	1.25	0.092
	0-5	1.47	1.39	1.41	1.41	1.41	0.046
Mortality, %	0-3	1.9ab	0.95ab	1.43ab	2.37a	0.48b	0.562
	3~5	0.95	0.95	0.48	0	0	0.407
	0-5	2.85a	1.90ab	1.90ab	2.37ab	0.48b	0.715
Production Index	0-5	309.88	330.93	338.86	320.18	326.80	18.478

<sup>a-b</sup> Means with the different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ )

Table 3. Leukocytes and erythrocytes in blood from Broiler fed experimental diets.

Parameters	Treatments					SEM
	control	antibiotics	CS682-0.05%	CS682-0.10%	CS682-0.20%	
<b>Leukocytes</b>						
WBC (K/ $\mu$ l)	32.25	31.38	33.54	33.07	33.35	0.819
NE (K/ $\mu$ l)	10.85	10.08	11.03	11.06	11.03	0.416
LY (K/ $\mu$ l)	15.90	16.03	16.89	16.23	16.62	0.326
SI (K/ $\mu$ l)	0.69	0.63	0.66	0.68	0.66	0.024
MO (K/ $\mu$ l)	3.21	3.28	3.45	3.36	3.46	0.184
EO (K/ $\mu$ l)	1.69	1.57	1.63	1.75	1.76	0.103
BA (K/ $\mu$ l)	0.61	0.56	0.60	0.68	0.67	0.053
<b>Erythrocyt</b>						
RBC (M / $\mu$ l)	2.81	2.78	2.91	2.94	2.92	0.066
Hb (g/dl)	8.90	8.84	9.01	8.80	8.93	0.181
HCT (%)	27.74	27.51	29.04	28.59	29.34	0.645
MCV (fL)	98.93	99.08	100.01	97.31	100.45	0.354
MCH (pg)	31.74	31.81	31.21	30.19	30.58	0.407
MCHC (g/dl)	32.08	32.09	31.20	31.06	30.46	0.377

WBC : White blood cell, HE : Heterophi, LY : Lymphocyte, MO : Monocyte, EO : Eosinophi, SI : Stress indicator, RBC : Red blood cell, Hb : hemoglobin, HCT : Hematocrit, MCV : Mean corpuscular volume, MCH : Mean corpuscular hemoglobin, MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration.

<sup>a-b</sup>Means with the different supercripts differ significantly (P < 0.05)

## 제 4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 목표 달성도

구분	세부 과제명	세부연구 목표	달성도 (5)	연구개발 수행내용
1차 년도	제 1세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CS682 균주 동정</li> <li>• CS682 생산 발효조건 최적화 : 1L flask, 7L fermentor</li> <li>• 세포독성 평가</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CS682 균주 동정 완료</li> <li>- 배지조성에 따른 효과분석</li> <li>- Inoculum size, aeration, agitation 효과</li> </ul>
	제 2세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포분화유도 효능 검증</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CS682가 HL-60세포주의 분화에 미치는 영향 분석</li> <li>- CS682 단독 또는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>나 ATRA와 병용처리 하였을 때 HL-60세포주의 형태 분석</li> <li>- CS682가 유도한 HL-60 세포주 분화의 cytofluorometric analysis</li> <li>- 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>나 ATRA가 유도하는 HL-60 세포주의 분화에서의 CS682의 시간에 따른 효과 분석</li> <li>- CS682와의 병용처리에 의한 분화유도 경로 탐색</li> </ul>
	제 3세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemoselective 반응들의 최적화 방법모색 및 model study</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- D-mannitol을 이용한 selective monosilylation과 Birch 유형의 탈보호반응</li> <li>- acetol을 이용한 선택적 축합반응</li> <li>- CS682를 이용한 monosilylation &amp; ester화 반응</li> </ul>
	제 1협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CS682 발효물의 육계 기능성검증 및 급성독성평가</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험물질의 투여에 기인된 사망동물은 관찰되지 않음</li> <li>- CS682 발효물질 0.1% 및 1.0% 첨가군은 대조군에 비해 증체량 및 사료효율이 크게 증가</li> </ul>
	제 2협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Nocardia</i> sp. CS.682의 유전자 조작의 setup</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Nocardia</i> sp. CS.682의 protoplast 제조</li> <li>- <i>Nocardia</i> multi-vector 시스템 확보: pNV18/19</li> <li>- CS682 고생산을 위한 SAM synthase 유전자의 재조합</li> <li>- <i>Nocardia</i> sp. CS.682의 total DNA의 확보</li> <li>- 여러 가지 macrolide의 분리</li> </ul>
2차 년도	제 1세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CS682 생산발효조건인 scale-up</li> <li>• CS682 추출, 정제 공정 확립</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 중형발효조(50, 500L,)에서 CS682 발효조건 최적화</li> <li>- 최적분리공정: Solvent extraction, column chromatography,</li> </ul>

				crystallization - CS682 유도체 개발, 생물학적 활성시험을 위한 충분한 CS682 확보
제 2세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>항산화효능 검증 및 기작 규명</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>자유전자소거능 확인</li> <li>환원력 시험</li> </ul>	
제 3세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>4-Lipophilic pocket-2,3-dideoxycarbasugar의 합성 및 CS-682와의 coupling</li> <li>Glucose 와 CS-682와의 배당체 합성 <ul style="list-style-type: none"> <li>Fluorosugar 와 CS-682와의 배당체 합성</li> </ul> </li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-2차년도 연구목표인 cs-682와 축합하기 위해서 deoxysugar을 성공적으로 합성하였으며 cs-682와 축합에 성공함</li> <li>-benzylated glucose의 합성과 축합 및 탈 보호 반응</li> <li>-fluorosugar의 합성 및 cs-682와의 배당체화 반응</li> </ul>	
제 1협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>이유자돈에 대한 기능성을 검증 및 적정용량 산출</li> <li>아급성독성 시험을 수행하여 제품의 등록자료 및 안전성 확보</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-CS682 발효물의 기능성을 이유자돈에게 급여하여 성장촉진 및 질병예방기능을 확인하였고, 적정용량을 산출하였음</li> <li>-랫드를 이용한 아급성독성 시험을 수행하여 1000 mg/kg 용량까지의 경구투여는 안전하다는 것과 무해용량을 산출하였음</li> </ul>	
제 2협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>CS682 생합성 유전자 확보</li> <li>일차대사 생합성 유전자 확보</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Nocardia sp. CS.682의 library preparation</li> <li>-Nocardia sp. 형질전환 set-up: Protoplast transformation</li> <li>-SAM synthase (metK)의 재조합 (pNSAM18)</li> <li>-Nocardia sp. Trnsformation</li> <li>-metK 및 afsR (조절기작 유전자) 발현백터 제작</li> <li>-metK, afsR 및 malonyl-CoA (ACC) 발현백터의 제작</li> <li>-metK, afsR 및 malonyl-CoA (PCC) 발현백터의 제작</li> </ul>	
제 3협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>육계 평가 시험</li> <li>산란계 평가 시험</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-육계 시험 시행</li> <li>-산란계 사양시험 완료</li> </ul>	
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>제 1세부 <ul style="list-style-type: none"> <li>CS682의 대형 발효조 (1톤, 5톤)에서 대량 생산</li> <li>최적 대량정제공정 개선 CS682 확보</li> </ul> </li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-대형 발효탱크에서 적용하며, 배양시기별, inoculum size와 aeration을 조정하여 1톤, 5톤 발효탱크에서 배양하면서 세포의 성장과 항생물질의 생산성에 미치는 영향을 조사</li> <li>-동물시험 및 유도체합성 등에 소요되는 다량의 순물질확보를 위해 각종 분리정제 방법을 이용하여 대량분리정제법을 확립</li> </ul>	
제 2세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>CS682의 암억제 효능 및 기전연구</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-암세포주를 이용한 다양한 세포 증식억제 효과</li> <li>-Apoptosis 작용기작 확인</li> </ul>	



	제 3세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효화합물의 유도체 합성을 위한 model study 연구</li> <li>• TMSOTf을 이용한 선택적 축합 및 가수분해 반응</li> <li>• CS-682의 C12, C11, C9의 선택적 보호 및 제거 연구</li> <li>• 4-Lipophilic pocket-2,3-dideoxycarbasugar의 합성 및 CS-682와의 coupling</li> <li>• 측쇄를 가진 핵산유도체 합성 및 CS-682와의 축합</li> <li>• Fluorosugar 와 CS-682와의 배당체 합성</li> </ul>	100	<p>-D-mannitol을 이용한 selective monosilylation과 Birch 유형의 탈보호반응</p> <p>-TMSOTf을 이용한 선택적 축합반응, 전위반응, 선택적 가수분해, 및 제거반응</p> <p>-CS682를 이용한 monosilylation &amp; ester화 반응</p> <p>-3차년도 연구목표인 cs-682와 축합하기위해서 5-membered hetero cycle을 성공적으로 합성 하였으며 cs-682와 축합에 성공함</p> <p>-protected nucleic acid의 합성과 축합 및 탈보호반응</p> <p>-fluorosugar의 합성 및 cs-682와의 배당체화 반응</p>
	제 1협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 육성돈에 대한 기능성 검증 및 적정용량 산출</li> <li>• 급성독성 시험을 수행하여 제품의 등록자료 및 안전성 확보</li> </ul>	100	<p>-CS682 발효물의 기능성을 육성돈에게 급여하여 성장촉진 및 질병예방기능을 확인하였고, 적정용량을 산출</p> <p>-랫드를 이용한 급성독성 시험을 수행하여 1000 mg/kg 용량까지의 경구투여는 안전하다는 것과 무해용량을 산출</p>
	제 2협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전사조절 유전자 확보</li> <li>• 전사조절 유전자 확인</li> </ul>	100	<p>-SAM synthase 유전자 및 afsR 유전자의 확보</p> <p>-CS682 생합성 유전자 내의 조절기작 유전자의 확보</p> <p>-확보된 SAM synthase 유전자 및 afsR를 발현 벡터에 재조합 및 Nocardia sp. 에 전이하여 생산성 조사.</p> <p>-CS682 생합성 유전자 내의 조절기작 유전자도 발현 벡터에 재조합 및 Nocardia sp. 에 전이하여 생산성 조사.</p>
	제 3협동	산란계 평가시험(확대시험) 육계 평가시험(확대시험, Floor)	100	<p>-육계 2차 사양시험 완료</p> <p>-산란계 2차 사양시험 완료</p>
4차년도	제 1세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 향미생물 효능검정</li> <li>• 향암제 배출억제 효능검정</li> <li>• CS682 대량생산 / 유효물질 대량 분리정제</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• -CS682, CS682 유도체, CS682 발효액, 발효액 추출물의 항균 활성검정</li> <li>- CS682, CS682 유도체, CS682 발효액, 발효액 추출물의 화학감작 효과</li> <li>-1.5 톤 발효조에서 CS682의 대량생산연구 유효물질의 대량 분리정제방법 확립</li> </ul>
	제	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 면역증강효과검증</li> </ul>	100	Mediators determination:

	2세부			<ul style="list-style-type: none"> <li>-NO production, cytokine assay</li> <li>-Immunomodulatory properties               <ul style="list-style-type: none"> <li>: NBT assay for phagocytosis, lipid peroxidation</li> </ul> </li> <li>-Analysis of immunomodulatory factor gene expression</li> </ul>
	제 3세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효화합물의 유도체 합성을 위한 1, 2, 3 복소환 축합연구</li> <li>• TMSOTf 및 PLE를 이용한 선택적 축합 및 가수분해 반응</li> <li>• C11의 가수분해 및 single 5-환의 heterocycle의 축합</li> <li>• C11 및 C9의 dual 5-환의 heterocycles의 축합</li> <li>• C9의 single 5-환의 heterocycle의 축합</li> <li>• C9 및 C18의 dual 5-환의 heterocycles의 축합</li> <li>• C18의 single 5-복소환 축합</li> <li>• C18, C11의 dual 복소환 축합</li> <li>• C18, C11, C9 triple 복소환 축합</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• -nargenicin 및 nodusmicin을 이용한 single, dual, triple 5-복소환 축합연구 수행완료</li> <li>-TMSOTf 및 PLE를 이용한 선택적 축합반응, 전위반응, 선택적 가수분해, 및 제거반응 수행완료</li> <li>-4차년도 연구목표인 CS682와 축합하기 위해서 5-membered heterocycle의 C11 혹은 C11-C9의 두곳에 성공적으로 합성을 성공함</li> <li>-4차년도 연구목표인 CS-682와 축합하기 위해서 5-membered heterocycle의 C9 혹은 C9-C18의 두곳에 성공적으로 합성을 성공함</li> <li>-4차년도 연구목표인 cs-682와 축합하기 위해서 5-membered heterocycle의 C18 혹은 C11-C18의 두곳에 그리고 C18, C11, C9 세곳에 성공적으로 합성을 성공함</li> </ul>
	제 1협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 육성돈에 대한 기능성 검증 및 적정용량 산출</li> <li>• 아급성독성 시험을 수행하여 제품의 등록자료 및 안전성 확보</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-CS682 발효물의 육성돈에 대한 기능성 검증 및 적정용량 산출</li> <li>-CS682 순물질의 아급성독성시험을 수행하여 제품의 등록자료 및 안전성 확보</li> </ul>
	제 2협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Target 화합물의 생합성 경로확인</li> <li>• 생합성 전구체의 이중속주 내 농도증가를 통한 생산성 향상</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• -Nargenicin 생합성 유전자 확보</li> <li>-Proline 생합성 과정 확인</li> <li>-MetK 유전자에 의한 생산성 2배 증가</li> <li>-ACC 유전자 (malony-CoA)에 의한 생산 3.2배 증가</li> <li>-Isonargenicin 분리 및 생산</li> </ul>
5차년도	제 1세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,500L(2.5 톤) 발효탱크를 이용한 산업용 생산 조건 검토</li> <li>• 항생제 대체물의 동결건조, 소분, 포장 등의 품질관리방안 검토</li> <li>• 시제품제작 및 상품화</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2.5 톤 발효조에서 CS682의 대량생산연구 유효물질의 대량 분리정제방법 확립</li> <li>- 시제품의 소분, 포장 등의 품질방안 검토</li> <li>- 시제품 제작 및 상품화</li> </ul>
	제 2세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rat의 basophilic cell line인 RBL-2H3 세포주를 사용</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Histamine 및 세포독성 cytokine 측정 및 western blotting</li> <li>-β-hexosamidase 세포독성 cytokine 측정</li> </ul>

		<p>Histamine 및 세포독성 cytokine 측정 및 western blotting</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RBL-2H3 세포주를 사용 <math>\beta</math>-hexosaminidase 세포독성 cytokine 측정 및 western blotting</li> </ul>		<p>및 western blotting</p>
제 3세부		<ul style="list-style-type: none"> <li>선별된 nargenicin의 C9 5-복소환 축합체의 대량합성연구</li> <li>선별된 nargenicin의 C11 5-복소환 축합체의 대량합성연구</li> <li>선별된 nargenicin의 C12 5-복소환 축합체의 대량합성연구</li> <li>선별된 nargenicin의 C9, C11, C12 double 및 triple 5-복소환 축합체의 대량합성연구</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>C9 5-복소환 축합체의 대량합성 연구 완료</li> <li>-C11 5-복소환 축합체의 대량합성연구 완료</li> <li>-C12 5-복소환 축합체의 대량합성연구 완료</li> <li>-C9, C11, C12 double 및 triple 5-복소환 축합체의 대량합성연구 완료</li> </ul>
제 1협동		<ul style="list-style-type: none"> <li>동물 및 재료준비</li> <li>육계 기능성검증시험</li> <li>마우스 급성독성시험</li> <li>보고서 작성</li> </ul>	100	- 육계 기능성 검증 및 마우스 급성 독성 시험
제 2협동		<ul style="list-style-type: none"> <li>대사공학과 돌연변이법의 접목을 통한 최종 고생산성 균주의 확립</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Target 화합물의 생합성 경로의 속도결정단계 진단 및 증폭</li> <li>-생합성 전구체의 이중속주 내 농도증가를 통한 생산성 향상</li> <li>-Malonyl-CoA 세포내 농도 증가 전략</li> <li>-CoA 및 acetyl-CoA의 세포내 농도 증가 전략</li> </ul>

## 제2절 관련분야에의 기여도

항생제 내성균과 관련된 병원성 슈퍼 박테리아의 출현에 따라 사회적 관심이 증대되었으며, 항생제 내성 감소 종합 안전관리대책을 수립해 2005년부터 사료내 항생제 무첨가 정책이 본격 추진됨.

당초 계획은 2012년에 사료에 항생제 첨가를 금지하는 것으로 하였으나, 6개월 앞당겨 2011년 하반기부터 전면 시행 되었음

국내 항생제 사용 현황을 살펴보면 2010년 배합사료용 항생제 사용량은 2005년과 비교하여 1/3 수준으로 감소되었으며, 소의 경우 항생제 사용량이 1/16 수준으로 감소함

그럼에도 불구하고 우리나라의 항생제 사용량은 덴마크와 비교하여 10배 가까이 높은 수준으로 항생제 감축을 위한 노력을 기울여야 하는 상황임

< 육류 1톤당 항생제 사용량(kg/톤)>

	한국	미국	덴마크	일본
항생제 사용량	0.44 kg/톤	0.3	0.05	0.4
비교년도	2009	2007	2008	2004

(사) 대한양돈협회, 월간 양돈, 2011

최근 청정하고 위생적인 축산물에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 가축의 사육과정에서 사용되고 있는 항생제에 대한 부정적인 시각이 대두되면서, 항생제 사용의 대안으로 유용미생물을 이용한 사료 첨가제 제조 기술이 주목받기 시작함

본 연구 결과 *Nocardia* sp. CS682이 생산하는 항균물질은 항생제 잔류의 문제점이 없고 사양실험 결과 낮은 독성을 가지고 있어 체내 축적 되지 않음. 또한 동물의 성장을 촉진 시키며 면역 증강의 효과를 보임.

CS682의 경우 CS682는 소교세포의 활성을 증가시키는 LPS에 의한 손상 (NO와 NO생성관 관련된 iNOS 발현, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성 감소)을 억제시키며 폐암세포주에서 항암 효과를 보임.

또한 proinflammatory cytokine인 Th-1 type cytokine (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) 의 분비를 증가시켜 세포매개성면역반응 촉진, anti-inflammatory cytokine인 Th-2 cytokine (IL-6, IL8)의 분비를 억제시켜 체액성 면역반응을 억제시키며 산화적 스트레스에 의한 간세포 손상에 대해 보호 효과(ALT, LDH 분비량 감소 활성산소 생성 감소 및 HO-1의 발현량 증가)를 나타냄을 확인하였음.

대량 배양 및 분리 정제 조건을 확립하여 순물질의 확보가 용이해 졌으며, 발효화합물의 유도체 개발과 돌연변이와 생합성 유전자를 조절하여 많은 양의 유효 물질을 생산할 수 있는 균주를 개발하였음.

이러한 기술 개발을 바탕으로 본 연구팀은 항생제 대체제 사료첨가제인 DCS682 상품을 출시하여 축산농가에 보급함으로써 항생제 잔류가 없고 가축 질병 예방과 동물의 성장을 촉진시키는데 기여하고 사료 첨가제 시장에 항생제 대체제의 새로운 모델을 제시함.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1절 연구개발 성과

#### 1. 논문 실적- 61편

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2012	An organic solvent-tolerant lipase from <i>Streptomyces</i> sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media	맨더 푸남	유진철		Process Biochemistry	47(4)	국외	SCI
2012	Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel <i>Streptomyces</i> enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model.	심카다 제야랩	유진철		Thrombosis Research.	129 (2)	국외	SCI
2012	Metabolic Engineering of <i>Nocardia</i> sp. CS682 for Enhanced Production of Nargenicin A(1)	Maharjan S	송재경	유진철	Appl Biochem Biotechnol	166 (3)	국외	SCI
2012	A novel cold-adapted lipase, LP28, from a	심카다 제야랩	유진철		Bioprocess and Biosystems Engineering	35(1)	국외	SCI

	mesophilic <i>Streptomyces</i> strain.							
2012	A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated <i>Streptomyces</i> sp. CS326.	조승식	유진철	송재경	Bioprocess and Biosystems Engineering.	35(1)	국외	SCI
2012	A newly isolated <i>Streptomyces</i> sp. CS392 producing three antimicrobial compounds	조승식	유진철		Bioprocess and Biosystems Engineering	35(1)	국외	SCI
2012	An organic solvent-tolerant alkaline lipase from <i>Streptomyces</i> sp. CS268 and its application in biodiesel production.	맨더 푸남	유진철		Biotechnology and Bioprocess Engineering.	17(1)	국외	SCI
2012	Identification and biochemical biosynthesis of pyrrole moiety of nargenicin A1 from <i>Naocardia</i> sp. CS682	Sushila Maharjan	송재경	유진철	Applied Microbiology and Biotechnology	93(2)	국외	SCI
2011	Synthesis of novel difluoro-cyclopropyl guanine nucleosides and their phosphonate analogues as potent antiviral agents. 2011.	이화	홍준희		Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.	30 (11)	국외	SCI
2011	Purification and characterization of a novel, highly	김희창	김성준	유진철	<i>Process Biochemistry</i>	46(8)	국외	SCI

	potent fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces tenuipes</i> .							
2011	Improvement of clavulanic acid production in <i>Streptomyces clavuligerus</i> by genetic manipulation of structural biosynthesis genes.	Jnawali HN,	송재경	유진철	Biotechnol. Lett	33(6)	국외	SCI
2011	2'-Spirocyclopropyl-carbocyclic Nucleoside as a Novel Scaffold for Potent Anti-HCV Agents.	이화	홍준희	유진철	<i>Bull. Korean Chem.</i>	32(4)	국내	SCI
2010	Synthesis and some properties of 4'-phenyl-5'-norcarbocyclic adenosine phosphonic acid analogues	류련금	홍준희	유진철	Bull. Korean Chem.soc	29 (05)	국내	SCI
2010	The Prolyl Isomerase Pin1 Induces LC-3 Expression and Mediates Tamoxifen Resistance in Breast Cancer	남궁광모	최홍석	유진철	J. Biol. Chem.	285 (31)	국외	SCI
2010	Functional characterization of KanP, a methyltransferase from the kanamycin biosynthetic gene	Nepal KK,	송재경	유진철	Microbiological research	165 (7)	국외	SCI



	cluster of Streptomyces kanamyceticus							
2010	Effects and action mechanism of Diospyros kaki on the differentiation of human leukemia HL-60 cells	김승현	김태성	유진철	Oncology Reports	23(1)	국외	SCI
2010	A new thermolabile alkaline phospholipase D from Streptomyces sp. CS628	심카다 제야랩	유진철	송재경	Biotechnology and Bioprocess engineering	15(4)	국외	SCI
2010	An oxidant and organic solvent resistant alkaline metalloprotease from Streptomyces olivochromogenes	심카다 제야랩	유진철		Appl. Biochem. Biotechnol.	162 (5)	국외	SCI
2010	Biosynthetic approach for the production of new aminoglycoside derivative	Nepal KK,	송재경	유진철	Journal of Bioscience and Bioengineering	110 (1)	국외	SCI
2010	Synthesis of SATE Prodrug of 6'-Fluoro-6'-methyl-5'-noradeno sine Nucleoside Phosphonic Acid as a New Class of Anti-HIV Agent.	이화	홍준희	유진철	Bull. Korean Chem. Soc	31(9)	국내	SCI
2010	Synthesis and Anti-HIV Activity of Novel 4'-Ethyl-5'-norcarbocyclic Adenosine				Bull. Korean Chem. Soc	31 (11)	국내	SCI

	Phosphonic Acid Analogues.							
2010	Protein engineering of glucose-1-phosphate thymidyltransferase for solubility and activity	Bijay Singh	송재경	유진철	Protein Engineering Disign and Selection		국외	SCI
2010	Identification of the duplicated genes for S-adenosyl-L-methionine synthetase(metK1-sp and metK2-sp) in Streptomyces peucetius var. caesius ATCC 27952	Oh TJ	송재경	유진철	Journal of Applied Microbiology	109 (2)	국외	SCI
2010	Analysis and identification of genes for mycothiol biosynthesis in Streptomyces peucetius ATCC 27952	Chang Beom Lee	송재경		J. Biomole. Reconstru.	6	국내	비SCI
2010	Effect of CS682, a fermentation product of Korean soil bacteria on growth performance in chickens and pigs	김후경	강성수	강성수	J of the science	20(7)	국내	비SCI
2010	방선균 발효물 CS682의 급여가 산란계의 생산성,	이아름	백인기	유진철	생환연 논문집	5(1)	국내	비SCI

	혈액성상, 면역글로불린 및 장내미생물 함량에 미치는 영향							
2009	Nargenicin attenuates lipopolysaccharide-i nduced inflammatory responses in BV-2 cells	유진철	전홍성		Neuroreport.	20 (11)	국외	SCI
2009	Nargenicin enhences 1,25-dihydroxyvita min D3-and all trans retinoic acid-induces leukemia cell differentiation via PKC/beta1/MAPK pathways	김승현	김태성	유진철 외	Biochemical Pharmacolog y	77 (11)	국외	SCI
2009	Cloning and characterization of CalS7 from Micromonospora echinospora sp. calichensis as a glucose-1-phosphat e nucleotidyltransfera se.	심카다 제야렘	유진철	송재경	Biotechnol. Lett.	31(1)	국외	SCI
2009	A novel alkalo- and thermostable phospholipase D from <i>Streptomyces olivochromogenes</i>	심카다 제야렘	유진철	송재경	Biotechnol. Lett	31(3)	국외	SCI

2009	Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> - and all-trans retinoic acid-induced leukemia cell differentiation by <i>Panax ginseng</i> .	김승현	김태성	유진철	Biosci. Biotechnol. Biochem.	73(5)	국외	SCI
2009	Quantitative analysis of nargenicin in <i>Nocardia</i> sp.CS682 culture by high performance liquid chromatography	조승식	송재경	유진철	Arch. pharm. Res	32(3)	국내	SCI
2009	Monoclonal antibody production and immunochemical detection of polyether antibiotics	이효정	유진철		Arch. pharm. Res	32(3)	국내	SCI
2009	A Novel Ca <sup>2+</sup> -Dependent Phospholipase D from <i>Streptomyces tendae</i> , Possessing Only Hydrolytic Activity	맨더 푸남	유진철	송재경	Arch. pharm. Res	32 (10)	국내	SCI
2009	Selective synthesis of 1(α),2(β)-C-dimethyl carbocyclic adenosine analogue as potential anti-HCV agent	이화	홍준희	유진철	Bull. Korean Chem. soc	30 (9)	국내	SCI
2009	SYNTHESIS AND ANTI-HCV EVALUATION OF	이화	홍준희	유진철	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.	28 (9)	국외	SCI

	4( <i>a</i> )-ETHYL AND 2( <i>β</i> )-METHYL-CARBODINE ANALOGUES							
2009	Characterization of RbmD (glycosyltransferase in ribostamycin gene cluster) through neomycin production reconstituted from the engineered <i>Streptomyces fradiae</i> BS1	Nepal KK	송재경	유진철	Mol. Cells	27(1)	국외	SCI
2009	A novel fibrinolytic protease from <i>Streptomyces</i> sp. CS684	심카다 제야랩	유진철		Process Biochemistry	45(1)	국외	SCI
2009	Construction of expression vector for <i>metK1-sp</i> in <i>Nocardia</i> sp. CS682 to enhance the production of nargenicin	Dinesh Kaju	송재경		J.Biomole. Reconstru	6	국내	비SCI
2009	Short synthesis and antiviral activity of acyclic phosphonic acid nucleoside analogues.	Liu LJ,	홍준희	유진철	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.	28(2)	국외	SCI
2009	Subacute toxicity of CS682, a fermentation product of Korea soil bacteria, in Rats	신인식	김종춘	유진철 외	Labolatory Animal Research	25(1)	국내	확진
2009	Construction of expression vector for <i>metK1-sp</i> in <i>Nocardia</i> sp.	Dinesh Kaju	Jae Kyun		Journal of Biomolecule	6(1)	국내	비SCI

	CS682 to enhance the production of nargenicin		g Sohng		Reconstruct ion			
2009	Analysis and identification of genes for mycothiol biosynthesis in <i>Streptomyces peucetius</i> ATCC 27952	Chang Beom Lee	Jae Kyun g Sohng		Journal of Biomolecul e Reconstruct ion	6(1)	국내	비 SCI
2008	Production, isolation and biological activity of nargenicin from <i>Nocardia</i> sp. CS682	송재경	유진철		Arch. Pharm. Res.	31 (10)	국내	SCI
2008	Functional characterization of <i>orf6</i> and <i>orf9</i> genes involved in the biosynthesis of L-oleandrose from <i>Streptomyces antibioticus</i> Tü99.	Binod Babu Pageni	송재경	유진철	Biotechnol. Biopross. Eng.	13(6)	국외	SCI
2008	Novel synthesis and anti-HIV activity of 4'-branched exomethylene carbocyclic nucleosides using a ring-closing metathesis of triene.	이화	홍준희	유진철	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.	27 (12)	국외	SCI
2008	Efficient synthesis of 4'-cyclopropylated carbovir analogues with use of ring-closing metathesis from glycolate.	Liu LJ,	홍준희	유진철	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.	27 (10)	국외	SCI
2008	Efficient transformation of	Dinesh Koju	송재경		Journal of Biomolecul e Reconstructio	5(2)	국내	비S CI

	the nargenicin producer <i>Nocardia</i> sp. CS682				n			
2008	Isolation and study of the antimicrobial activity of nargenicin from <i>Nocardia</i> sp. CS682	Dinesh Koju	송재경	이해찬	Journal of Biomolecule Reconstruction	5(1)	국내	비SCI
2008	Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin 3-and all- <i>trans</i> retinoic acid-induced differentiation of Human leukemia HL-60 cells by blood shell, <i>Scapharca broughtonii</i>	김승현	김태성	유진철	J. Food Biochem.	32(1)	국외	SCI
2008	Stimulation of interleukin-4 production in ELA T cells via increased NF-AT binding activity by <i>Scapharca broughtonii</i>		김태성	유진철	Journal of Shellfish Research	27(2)	국외	SCI
2007	Stereoselective synthesis of novel cyclohexane version of carbosvir	이화	홍준희		Bull. Korean Chem.Soc.	28 (10)	국내	SCI
2007	Single Oral Dose Toxicity Evaluation of CS682, a Fermentation Product of Korean	이종찬	김종춘	유진철, 강성수, 안태환	Laboratory Animal Research	23(4)	국내	학진

	Soil Bacteria, in Rats							
2007	Modulation of parkin gene expression in noradrenergic neuronal cells	김승	전홍성	유진철	Int. J. Devl Neurosci	25(8)	국외	SCI
2007	Biosynthesis of dTDP-6-deoxy-D-allose, Biochemical characterization of dTDP-4-keto-6-deoxyglucose reductase (GerK1) from Streptomyces sp. KCTC 0041BP.	Ta Thi Thu Thuy	송재경	유진철	Glycobiology	17(2)	국외	SCI
2007	Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages via suppression of nuclear factor-κB binding activity by <i>Phyllostachy nigra</i> var. <i>henonis</i> .	김승현	김태성	유진철	Immunopharmacol. Immunotoxicol.	29(1)	국외	SCI
2007	Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> - and all-transretinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells by <i>Phyllostachys nigra</i> var. <i>henonis</i> .	김승현	김태성	유진철	Immunopharmacol. Immunotoxicol.	29(1)	국외	SCI
2007	Purification and biochemical properties of phospholipase D (PLD57) from	심카다 제야렘	유진철		Arch. Pharm. Res.	30 (10)	국내	SCI



	Streptomyces sp. CS-57.							
2007	Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from <i>Streptomyces</i> sp. CS684.	유진철	성치남		J. Microbiol.	45(1)	국외	SCI
2007	Inhibition of mouse macrophages interleukin-12 production : suppression of nuclear factor-kB binding activity by <i>Scapharca broughtonii</i> .	김승현	김태성	유진철	Arch. Pharm. Res	30(3)	국내	SCI
2007	Cloning and Expression of the Glucose-1-Phosphate Thymidyltransferase Gene(schS6) from <i>Streptomyces</i> sp.SCC-2136.	한지만	유진철		J. Microbiol. Biotechnol.	17(4)	국외	SCI

2. 특허 출원 - 14건

출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2008	새로운 노카르디아속 균주 및 이의 메티실린 및 반코마이신 내성 균주에 대한 항생물질	유진철 외6명	대한민국	10-2008-0018949
2008	나르제니신을 포함하는 염증성 신경 퇴행성 질환의 치료용 제약 조성물	유진철, 김성준, 전홍성	대한민국	10-2008-0130684
2008	나르제니신을 포함하는 항암제 조성물	유진철, 김태성, 김승현	대한민국	10-2008-0107486
2008	고성능 액체 크로마토그래피에 의한 나르제니신의 정량분석 방법	유진철, 송재경, 조승식	대한민국	10-2008-0107490
2008	새로운 노카르디아속 균주 및 이의 메티실린 내성 포도상구균 균주에 유효한 화합물을 포함하는 가축사료 첨가제	유진철 외9명	대한민국	10-2008-0043926
2009	스트렙토마이세스속 균주 유래의 혈전용해 효소	유진철, 조승식, 박성주	대한민국	10-2009-0111797
2009	인삼 추출물을 포함하는 항암제 조성물	유진철 외4명	대한민국	10-2009-0106758
2009	노카르디아속 균주로부터 항균 활성 화합물의 발효 및 분리 정제 방법	유진철, 조승식	대한민국	10-2009-0111798
2010	랄스도니아속 균주가 분비하는 바이오디젤 생산에 유용한 지방분해효소	조선대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0116858
2010	스트렙토마이세스속 균주 유래의 혈전용해효소	유진철외 2명	대한민국	10-2010-0116868
2011	신규한 바실러스 아틸로리퀴페시언스 배양물 및 그의 용도	유진철외 2명	대한민국	10-2011-0029387
2011	스트렙토마이세스 속 유래의 신규한 지질분해 효소 및 그의 생산 방법	유진철 외 6명	대한민국	10-2011-0140000
2011	중온성 스트렙토마이세스속 유래의 바이오디젤 생산을 촉매하는 신규 냉온-적응성 지질분해효소 및 그의 생산 방법	유진철, 조승식, 최윤희	대한민국	10-2011-0140964
2011	항균 화합물을 생산하는 신규한 스트렙토마이세스속 균주	유진철, 조승식, 최윤희	대한민국	10-2011-0140010

3. 특허 등록 - 6건

등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2007	소화촉진용 솔잎 발효액	유진철 외7인	대한민국	특허 제 10-0752573호
2007	피조개 추출물을 포함하는 약제학적 조성물	유진철 외 6명	대한민국	특허 제 10-0807196
2008	플라보노이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 화학 감작제	유진철 외4인	대한민국	특허 제 10-0839985
2011	나르제니신을 포함하는 염증성 신경퇴 행성 질환의 치료용 제약 조성물	유진철, 김성준, 전홍성	대한민국	특허 제 10-1022564호
2011	새로운 노카르디아 속 균주 및 그의 발 효 배양물의 용도	유진철, 이효정 외 9명	대한민국	특허 제 10-1040468호
2011	노카르디아속 균주로부터 항균활성 화 합물의 발효 및 분리정제 방법	유진철, 조승식	대한민국	특허 제 10-1088600호

4. 학술대회 발표 - 62건

일자	제목	저자	학회명	장소
2007.05. 11-12	Selective trifluoromethylation: application for the synthesis of nucleoside analogues	김애홍, 리화, 신청과, 고옥현, 홍준희		Kimdaejung Convention Center, Gwangju
2007.11. 07-08	Stereocontrolled synthesis of a novel cyclohexenyl nucleoside analogue.	이화, 김애홍, 고옥현, 홍준희.	2007 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2008.10 23-24	Synthesis of novel 4'-ethenyl or ethynyl carbocyclic nucleoside analogues of Stavudine.	이화, 류련금, 박복선, 오창현, 고옥현, 홍준희	2008 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2009.05. 07.-08	Synthesis of novel C-nucleoside analogues. 2009 (1), 207-207. 2009/05/07-08	박복선, 류련금, 이화, 고옥현, 홍준희.	2009 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	Daejeon Convention center
2010.04 15-16	Design and synthesis of SATE derivatives of 2'- or 4'-modified carbocyclic nucleoside phosphonates.	이화, 류련금, 신광환, 오창현, 홍준희.	2010 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	Dae-gu exco convention center
2010.06. 24.-25	Identification and production of antimicrobial compound from <i>Streptomyces</i> sp. CS392.	Jin Cheol Yoo, Seung Sik CHO, Poonam MANDER	2010 International Symposium & Annual Meeting New Frontiers in Microbiology and Biotechnology.	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.06. 24.-25	A novel low molecular weight fibrinolytic enzyme from <i>Streptomyces</i> sp. CS628.	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada	2010 International Symposium & Annual Meeting New Frontiers in Microbiology and Biotechnology.	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.06. 24.-25	Identification, partial purification and characterization of lipase from <i>Ralstonia</i> sp. CS274 and its application in biodiesel production.	Jin Cheol Yoo, Seung Sik CHO, Hah-Young Yoo.	2010 International Symposium & Annual Meeting New Frontiers in Microbiology and Biotechnology.	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.06. 24.-25	Identification, production and characterization of an extracellular lipase from <i>Streptomyces</i> sp. CS133.	Jin Cheol Yoo, Da Jeong PARK.	2010 International Symposium & Annual Meeting New Frontiers in Microbiology and Biotechnology.	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.06. 24.-25	Characterization of antibacterial substance-producing <i>Bacillus</i> sp. 6-3 isolated from Korean pickle-Kimchi.	Jin Cheol Yoo, Yun Hee CHOI.	2010 International Symposium & Annual Meeting New Frontiers in Microbiology and	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan

			Biotechnology.	
2010.09. 14-18	The biosynthetic gene cluster for a polyether antibiotic, laidlomycin, from <i>Streptomyces</i> sp. KCTC 10631 BP.	JY Hwang, NPK Hanh, JC Yoo, CN Seong, DH Nam.	14th International biotechnology Symposium and exhibition.	Rimini, Italy
2010.10. 14-15	A new glycosylated fibrinolytic protease from <i>Streptomyces</i> .	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada	International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.10. 14-15	In vitro and In vivo fibrinolytic activity of a low molecular weight fibrinolytic protease from a <i>Streptomyces</i> strain.	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada, Seung Sik Cho	International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.10. 14-15	Anti-inflammatory action of an antimicrobial substance, CRY, Isolated from a <i>Streptomyces</i> strain.	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho	International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.10. 14-15	Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ production by CS384.	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi.	International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.10. 14-15	Production and purification of a potent antimicrobial compound from <i>Bacillus subtilis</i> CS5.	Jin Cheol Yoo, PoonamMander	International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.10. 14-15	Production and purification of a fibrinolytic enzyme from <i>Streptomyces</i> sp. CS624	Jin cheol Yoo, PoonamMander, Yun Hee Choi	International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.10. 14-15	Identification and characterization of <i>Streptomyces</i> sp. CS392 producing antibiotics against methicillin and vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> .	Jin Cheol Yoo, Da Jeong Park, Poonam Mander	International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies	Seoul KyoYuk MunHaw HoeKwan
2010.10. 21-22	A cold adaptive acidophilic lipase from <i>Streptomyces</i> .	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada, Da Jeong Park, Poonam Mander	2010 PROCEEDINGS of the fall international convention of the pharmaceutical society of korea.	Ramada plaza Cheongju Hotel
2010.10. 21-22	Anti-oxidative and anti-microbial compounds produced by soil bacteria.	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho	2010 PROCEEDINGS of the fall international convention of the pharmaceutical society of korea	Ramada plaza Cheongju Hotel
2010.10. 21-22	Anti-inflammatory antibiotics produced by <i>Streptomyces</i> strain.	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi	2010 PROCEEDINGS of the fall international convention of the	Ramada plaza Cheongju

			pharmaceutical society of korea	Hotel
2011.03.17-18	An alkaline thermostable intracellular phospholipase D derived from <i>Streptomyces</i> sp. CS57.	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada	Bioenergy korea Conference 2011 International Symposium.	Kimdaejung Convention Center, Gwangju
2011.03.17-18	A novel cold-adapted lipase, LP28, from a mesophilic <i>Streptomyces</i> strain.	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada, Hah Young Yoo, Don Hee Park, Seung Wook Kim	Bioenergy korea Conference 2011 International Symposium.	Kimdaejung Convention Center, Gwangju
2011.03.17-18	An organic solvent-tolerant alkaline lipase from <i>Streptomyces</i> sp. CS268 and its application in biodiesel production.	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho, Poonam Mander	Bioenergy korea Conference 2011 International Symposium.	Kimdaejung Convention Center, Gwangju
2011.03.17-18	Catalytic proficiency of a lipase from a newly isolated <i>Streptomyces</i> sp. CS133 with solvent-tolerance and biodiesel production capacity.	Jin Cheol Yoo, Poonam Mander, Yun Hee Choi	Bioenergy korea Conference 2011 International Symposium.	Kimdaejung Convention Center, Gwangju
2011.03.17-18	Characterization of antimicrobial compounds from Soil Actinomycetes.	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho	Bioenergy korea Conference 2011 International Symposium.	Kimdaejung Convention Center, Gwangju
2011.03.17-18	Anti-inflammatory activity of antibiotics isolated from Korean soil Actinomycetes.	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi	Bioenergy korea Conference 2011 International Symposium.	Kimdaejung Convention Center, Gwangju
2011.04.21-22	Synthesis and some properties of lipophilic 4'-groups in 5'-norcarbocyclic nucleosides on antiviral activities.	류런금, 이화, 신광환, 김은애, 오창현, 홍준희.	2011 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	Busan Bexco convention center
2011.05.12-13	Inducible Nitric oxide synthase and Cyclooxygenase-2 Inhibitor Isolated from Newly Screened <i>Sterptomyces</i> Strain	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi, Da Jeong Park	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.05.12-13	Purification and immunomodulatory activity of a polysaccharide from <i>Streptomyces</i> sp. CS468	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.05.12-13	Isolated of a Novel <i>Lactobacillus</i> strain Secreting Broad-spectrum of Antibacterial compound	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi, Jung Wan Ha	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.05.12-13	Purification and characterization of a novel peptide antibiotic from Newly isolated <i>Bacillus</i> sp. CS61	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.05.12-13	Isolation and characterization of a compound effective against	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi,	2011 International Meeting of Microbiology of Society	Oryong Hall in Gwangju

	Vancomycin-resistant Enterococcus(VRE) and Staphylococcus aureus(VRSA) from <i>Bacillus subtilis</i> CS19	Jin Hee Park	of Korea	
2011.05.12-13	Beneficial effect of an Antimicrobial and Anti-inflammatory agent on 12-O-tetradecanoylphorbol acetate induced Ear Edema in Mice	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.05.12-13	Protective effect of compound C3, produced by <i>Streptomyces</i> sp. CS392, in Dextran Sodium sulfate induced Mice Colitis	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.05.12-13	In vivo efficacy of a new low molecular weight fibrinolytic enzyme from bacteria	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.05.12-13	Purification, Biochemical properties and In vivo fibrinolytic activity of an extracellular protease secreted by a <i>Streptomyces</i> strain	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada, Poonam Mander	2011 International Meeting of Microbiology of Society of Korea	Oryong Hall in Gwangju
2011.10.05~08	An alkaline lipase from <i>Streptomyces</i> sp. CS273 with organic solvent tolerance property and its application in Biodiesel production	Jin Cheol Yoo, Poonam Mander	2011 KSBB Fall meeting& International Symposium	Songdo Concensia, Incheon
2011.10.05~08	Synergistic antimicrobial effect of nargenicin isolated from <i>Nocardia</i> sp. CS682 with other commercial antibiotics	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi,	2011 KSBB Fall meeting& International Symposium	Songdo Concensia, Incheon
2011.10.05~08	Identification and characterization of <i>Lactobacillus</i> sp. CS0A producing antibacterial compound against Gram-positive and Gram-negative pathogenic microorganisms	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho, Jaya Ram Simkhada Yun Hee Choi, Da Jeong Park, Jin Hee Park	2011 KSBB Fall meeting& International Symposium	Songdo Concensia, Incheon
2011.10.13~14	A potent antimicrobial peptide from <i>Bacillus</i> sp. CS32	Jin Cheol Yoo, Da Jeong Park	2011 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	Seoul Kyoyuk munHwa HoeKwan, Seoul, Korea
2011.10.13~14	A lipase from <i>Streptomyces</i> sp. CS133 with organic solvent tolerance property and its application in production of biodiesel from vegetable oils	Jin Cheol Yoo, Poonam Mander	2011 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	Seoul Kyoyuk munHwa HoeKwan, Seoul, Korea
2011.10.13~14	Anti-inflammatory Effects of CS384 in Murine Macrophage Raw 264.7 cells	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi, Seung Sik Cho	2011 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	Seoul Kyoyuk munHwa

				HoeKwan, Seoul, Korea
2011.11. 07-09	An extremely alkaliphilic xylanase from <i>Streptomyces</i> : strain isolation, enzyme production and biochemical characterization	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada	2011 PRoCEEDINGS of the Fall International Concentration of The Pharmaceutical Society of Korea	Songdo Concensia, Incheon
2011.11. 07-09	A Polysaccharide Produced by a New <i>Streptomyces</i> Strain Modulates Immunological Activity in Raw264.7 Cells	Jin Cheol Yoo Yun Hee Choi, Seung Sik Cho, Da Jeong Park	2011 PRoCEEDINGS of the Fall International Concentration of The Pharmaceutical Society of Korea	Songdo Concensia, Incheon
2011.11. 07-09	Isolation, production and purification of antimicrobial substance produced by <i>Bacillus subtilis</i> strain PA5	Jin Cheol Yoo, Poonam Mander	2011 PRoCEEDINGS of the Fall International Concentration of The Pharmaceutical Society of Korea	Songdo Concensia, Incheon
2011.11. 07-09	Design and synthesis of various 6'-modified novel nucleoside analogues as potent antiviral agents.	류련금, 신광환, 김은애, 홍준희.	2011 PRoCEEDINGS of the Fall International Concentration of The Pharmaceutical Society of Korea	Songdo Concensia, Incheon
2012.4. 11.-13	A novel hyperalkaline xylanase from a newly isolated <i>Streptomyces</i> strain	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho, Jaya Ram Simkhada, Yun Hee Choi	2012 KSBB SPRING MEETING & INTERNATIONAL SYMPOSIUM	Changwon Exhibition Convention Center
2012.4. 11.-13	An extracellular alkaline xylanase active in broad range of temperature originated from a microbial source	Jin Cheol Yoo, Pradeep G.C.	2012 KSBB SPRING MEETING & INTERNATIONAL SYMPOSIUM	Changwon Exhibition Convention Center
2012.4. 11.-13	An alkaline and moderately thermostable xylanase from a soil isolated	Jin Cheol Yoo, Md.Arifur Rahman	2012 KSBB SPRING MEETING & INTERNATIONAL SYMPOSIUM	Changwon Exhibition Convention Center
2012.4. 11.-13	Purification and biochemical characterization of a thermostable xylanase from Korean soil bacteria	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada,	2012 KSBB SPRING MEETING & INTERNATIONAL SYMPOSIUM	Changwon Exhibition Convention Center
2012.4. 11.-13	Screening <i>Streptomyces</i> strains capable of producing cellulase using CMC-agar plate	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada, Yo Na Park, Yoon Seok Choi	2012 KSBB SPRING MEETING & INTERNATIONAL SYMPOSIUM	Changwon Exhibition Convention Center
2012.4 19-21	Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by <i>Streptomyces</i> sp. extract through the NF- $\kappa$ B inactivation in Raw 264.7	Jin Cheol Yoo, Seung Sik Cho, Yun Hee Choi	2012 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	International Convention Center, Jeju



	macrophage cells			
2012.4 19-21	Antibacterial and Anti-inflammatory activities of PA5 compound produced by <i>Bacillus subtilis</i> from korean traditional kimchi	Jin Cheol Yoo, Poonam Mander, Seung Sik Cho,	2012 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	International Convention Center, Jeju
2012.4 19-21	Synthesis of novel 5'-oxy- and 5'-deoxyphosphonic acid nucleoside analogues as potent antiviral agents.	류현금, 신광환, 강려은, 김은애, 홍준희.	2012 International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	International Convention Center, Jeju
2012.4 24-25	Ammonium sulfate sensitive thermostable xylanase from <i>Streptomyces</i> for the conversion of agro-industrial waste materials	Jin Cheol Yoo, Jaya Ram Simkhada, Hah-Young Yoo, Don Hee Park, Seung Wook Kim	Bioenergy Korea Conference 2012 International Symposium	Kimdaejung Convention Center, Gwang ju, Korea
2012.4 24-25	Purification and biochemical characterization of a novel alkaline xylanase from <i>Streptomyces</i> sp. CS428	Jin Cheol Yoo, Pradeep G.C. Yoon Seok Choi Seung Sik Cho,	Bioenergy Korea Conference 2012 International Symposium	Kimdaejung Convention Center
2012.4 24-25	A novel salt dependant alkaline xylanase from <i>Streptomyces</i> sp. CSWu-1	Jin Cheol Yoo, Md.Arifur Rahman Yun Hee Choi	Bioenergy Korea Conference 2012 International Symposium	Kimdaejung Convention Center
2012.5 03-04	Copper sulfate Potentiate Inhibition Effect of Nitrite Oxide Production by Manumycin	Jin Cheol Yoo, Ok kim, Seung Sik Cho,	International Meeting of the Microbiological Society of Korea	Seoul Kyoyuk MunHwa Hoekwan, Seoul, Korea
2012.5 03-04	Purification and Characterization of Antimicrobial peptide from <i>Bacillus</i> sp. Isolated from Korean Soil	Jin Cheol Yoo, Yun Hee Choi	International Meeting of the Microbiological Society of Korea	Seoul Kyoyuk MunHwa Hoekwan, Seoul, Korea
2012.5 03-04	Enzymatic Transesterification of Soy bean Oil and Waste Cooking Oil Using a Microbial Lipase(LP273) from <i>Streptomyces</i> sp. CS273	Jin Cheol Yoo, Poonam Mander	International Meeting of the Microbiological Society of Korea	Seoul Kyoyuk MunHwa Hoekwan, Seoul, Korea
2012.5 03-04	Optimization of medium composition and fermentation conditions using response surface methodology for production of manumycin by <i>Streptomyces</i> sp. CS392	Jin Cheol Yoo, Poonam Mander Yoon Seok Choi	International Meeting of the Microbiological Society of Korea	Seoul Kyoyuk MunHwa Hoekwan, Seoul, Korea

## 5. 기타 실적

번호	구분	학술대회명/학술지명/ 기술이전 제목/저서명	성명	내용요약	실적년도
1	기술이전	새로운 노카르디아 속 균주 및 이의 메티실린 내성 포도상 구균 균주에 유효한 화합물을 포함하는 가축사료첨가제	유진철	기술이전 기업 (주) 대한뉴팜. 2530만원 ; 계약기간 2008.3.1-2028.2.28.	2008
2	상품출시	상품명 : DCS 682	유진철/ 대한뉴팜	Nargenicin을 사료첨가용 항생제 대체재로 상용화 (2009년 하반기: 1억 원 매출발생)	2009
3	수상	서울발명진흥회	유진철	동물면역제어 소재개발 금상	2008
4	수상	교육과학기술부장관상 (안병만)	유진철	농어민 소득증대 표창장	2009
5	언론홍보	호남신문 “조선대 유진철 교수 서울국제 발명 전시회 금상수상”	유진철	호남신문 2008.12.18. 서울 국제 발명 전시회 금상 수상 관련 기사	2008
6	언론홍보	전남매일 “발효물 이용 사료첨가제 개발 공로”	유진철	전남매일 2009. 10. 23. 발효물 이용 사료첨가제 개발 공로 관련 기사	2009
7	언론홍보	광주드림 “토양미생물 활용한 사료첨가제 개발”	유진철	광주드림 2009.10.26. 과학기술대상 수상 기사	2009

## 제 2절 성과 활용 계획

### 1. *Nocardia* sp. CS682의 최적 발효조건, 대량생산 공정 개발 및 고효율 분리공정 개발

#### ① 1L, 7L, 500L, 5톤 발효조에서 발효조건 확립

Maltose 0.5%, Oatmeal 0.25%, Soybean meal 0.25%, Yeast ex 0.25%, Calcium carbonate 0.05% 배지에 28°C, 0.5vvm, 75rpm 조건으로 배양 후 pH 8정도 되었을 때 항균물질의 생산량이 가장 높음을 확인.

#### ② 고효율 분리 공정 개발

기존의 분리 정제법에 의한 활성 물질의 회수율보다 고효율의 분리공정 개발을 위해 배양여액을 50% Dichloromethane으로 2회 추출하여 얻은 추출액을 감압 농축하고 최소한의 MeOH로 녹여 이 시료를 MeOH로 평형시킨 sephadex LH-20 gel 로 충전된 column에 적하하여 chromatography를 실시하였음. Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 항 MRSA 활성이 1 peak로 나타났으며, 활성을 보이는 분획물을 모아 농축건조시켰음. 농축건조시료를 소량의 ethylacetate에 녹인 후 기존의 prep-TLC 대신에 Silica gel column chromatography 를 실시하여 (용출 용매, hexane: ethylacetate=2.5:1) CS682의 회수율을 기존방법보다 1.5배 향상시켰음.

### 2. CS682 발효물, 정제물, 유도체의 생물학적 활성 검증

① CS682는 분화를 유도하고 또한, 분화 유도제인 ATRA나 1,25-(OH)2D3와 병행하여 처리하였을 때 분화유도의 증강에 효과적임.

② CS682는 소교세포의 활성을 증가시키는 LPS에 의한 손상 (NO와 NO생성관 관련된 iNOS 발현, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성 감소)을 억제시키며 폐암세포주에서 항암활성을 나타냄.

③ CS682는 proinflammatory cytokine인 Th-1 type cytokine (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ )의 분비를 증가시켜 세포매개성면역반응 촉진, anti-inflammatory cytokine인 Th-2

cytokine (IL-6, IL8)의 분비를 억제시켜 체액성 면역반응을 억제시키며 산화적 스트레스에 의한 간세포 손상에 대해 보호 효과(ALT, LDH 분비량 감소, 활성산소 생성 감소 및 HO-1의 발현량 증가)를 나타냄

### 3. 신규 CS682 유도체 합성

- ① 2-deoxy 당을 실험실적으로 합성 한 후 CS682와 축합
- ② CS682의 glucose, fluorosugar 배당체 합성
- ③ 5-membered heterocycle을 확보하여 CS682와 축합
- ④ 당에 phosphate 및 phosphonate를 도입한 후 pyrimidine 및 purine heterocycle 과 축합
- ⑤ HJH-09-142, HJH-09-146, HJH-09-148, HJH-09-150, HJH-09-156 유도체 합성

### 4. 돌연변이와 생합성 유전자 조절을 통한 균주 개량

- ① 생합성 유전자집단의 안정적 발현을 위해서 먼저 방선균에서 사용되고 있는 여러 가지 벡터를 사용하여, Nocardia에서의 안정적 발현을 위해 벡터 개발하고 클론하기 위한 proline synthase 유전자 확보
- ② metK 및 asfR(조절기작 유전자), metK 및 asfR malonyl-CoA(ACC), metK 및 asfR malonyl-CoA(PCC) 발현벡터 제작 후 균주 개량

### 5. 가축을 이용한 소규모 농장 수준의 임상시험

- ① 육계, 이유자돈, 육성돈을 이용한 CS682의 기능성 검증 결과 CS682의 급여군은 대조군에 비해 체중이 다소 증가하였고, 사료효율이 개선됨
- ② 랫드를 이용한 CS682 발효물, 순물질의 경구 투여 아급성, 급성 독성 시험결과

CS682는 독성이 없는 안전한 물질임을 확인하였고 사료첨가제로서의 가능성 제시

③ 마우스를 이용한 CS682 순물질의 경구투여 아급성, 독성 시험결과 CS682 순물질은 마우스에서 독성이 없는 안전한 물질임을 확인.

## 5. 시제품제작

CS682의 대량생산 후 동결건조 작업을 하여 얻은 분말을 함량 균일성을 고려하여 배산법을 이용하여 혼합하였으며 혼합 후 얻은 제품은 1kg 씩 차광기밀포장함.

## 6. 연구 성과

국내외 학술지 60편 게재, 특허 출원 14건, 특허등록 3건, 학술대회 발표 62편의 성과를 도출함.

대형 발효조에서 배양조건과 분리조건을 확립 후 나르제니신을 사료첨가용 항생제 대체제인 DCS682 시제품을 제작하였고 “새로운 노카르디아 속 균주 및 이의 메티실린 내성 포도상구균 균주에 유효한 화합물을 포함하는 가축사료 첨가제”에 대한 기술이전을 실시함 (2008.3.1.-2028.2.28.)

대형 발효조에서의 균주의 배양, 순물질의 분리정제, 동결건조를 통한 시제품의 제작 기술을 통해 항생제를 대체할 수 있는 유효 물질을 생산하는 균주의 배양과 고효율의 물질 분리, 상품제작에 기틀을 마련함으로써 가축사료 첨가제 시장에 미생물 제제의 활용범위가 넓어질 것으로 예상

CS682 및 유도체의 생물학적 활성, 독성 연구 등은 산업화를 위한 상품성 검증에 활용

다양한 유도체의 합성은 항미생물, 항염, 항암효과의 효율 증가 및 개량 동물신약으로 상업화와 유전자 조작을 통한 유효물질의 생산량 증대를 통해 효율적인 물질 생산 기대와 고생산성 균주 개발 방법을 제시

현재 사료용 항생제 대체제의 폭발적인 수요증가에 부응하여 CS682 및 유도체, 발

효물 등을 동물사료 첨가제로 개발하는 것은 독점적 경쟁력을 가지고 있기 때문에 가격 경쟁력을 갖추고 있으며, 동물약품의 방대한 시장규모와 기존 제품들이 가지고 있는 문제점에 비추어 볼 때 국가 차원의 커다란 수입을 창출 할 수 있음

## 제6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

최근 세계 사료산업은 제품의 안정성과 품질에 관한 심각한 도전에 직면해 있는데, 유럽에서는 살모넬라, 광우병, 다이옥신, 지하수 오염과 같은 사료와 관련된 질병이나 오염에 대한 우려가 10년 전보다 더 커지고 있으며, 사료업계는 HACCP (위해 분석중점관리제도)를 도입하여 청정육류를 생산하기 위한 기초를 확립하고 축산폐수 및 악취제거를 위한 친환경사료 제조에 초점을 맞추고 있음

따라서 사료용 기능성첨가제 산업 역시 이러한 구조변화에 점진적으로 대응하고 있는 상황으로 천연물 소재 개발 및 생산 활동이 아직은 축산업계 일각에서 이루어지고 있을 뿐 대량 생산체제를 갖추어 화학제품을 전면적으로 대체하기에는 효능과 생산기술면에서 개선할 여지가 많이 남아 있음. 현재 선진국에서 성숙기에 있는 축산업과 사료산업에 축산물의 고품질화 및 환경 친화적 생산방식 도입이 점차 늘어나고 있는데, 이와 같은 축산업의 질적 구조변화가 필연적이라 해도 그 속도는 경제성의 문제를 감안할 때 점진적으로 이루어질 전망이다

지난 수십 년 동안의 항생제 오남용으로 이미 해외에서는 VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*), MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)등이 발생되어 피해를 끼치고 있음. 이러한 피해를 줄이고자 하는 노력을 전세계적으로 항생제 사용이 가장 많은 동물 사료 첨가용 항생제 사용을 줄이기 위한 노력과 관련 법률이 제정되고 있음

유럽에서는 1998년부터 사용량을 줄여왔으며 최근 2006년에는 의사처방 없이 항생제가 거의 사용되지 않고 있음. 하지만 우리나라는 2006년부터 사용 가능한 항생제 품목이 50개에서 25개로 줄어들면서 축산업 전체에서의 항생제 사용이 점점 줄어들고 있으나 치료용 항생제(자가 치료용, 수의사 처방) 등의 사용량은 아직도 상당 수준임.

유럽의 규제는 사료 내 첨가하는 동물용 성장 촉진 목적의 미생물억제제의 사용을 금지하는 것임. 사용 중이었던 아빌라마이신, 밤버마이신, 살리로마이신과 모넨신의 사료 내 첨가를 2006년을 기점으로 중단함. 또한 항생제 대체물질에 관한 연구를 활발히 진행하고 있으며 최근 지방산 성분을 이용한 항생물질 대체, 이유자돈에 대

한 구연산과 초산의 급이를 통한 항생제 대체 효과에 진일보한 것으로 알려지고 있음

덴마크 정부는 1998년 양돈 산업 단계 중 비육돈 단계에서 사용하는 성장 촉진용 항생제의 사용을 자발적으로 금지하는 제도를 만들었음. 2000년 1월 1일부터 덴마크는 이유 자돈 단계까지 포함하여 항생제 사용을 중단하였음. 이런 항생제 사용 중단의 효과가 어느 정도의 가치인지를 평가하는 좋은 시장을 제공하고 있음. 수출 중심의 시장 구조에 의한 생산 시스템을 갖고 있기 때문이며 또한 생산비 및 항생제 사용에 대한 기록이 매우 철저한 시스템을 보유함. DANMAP(덴마크 항생제 내성 감시 및 연구 프로그램)을 통해 동물에서 분리된 박테리아의 내성을 추적해 수의사별, 농장별, 항생제별 처방 상황을 모니터링 할 수 있음

1996년에 양돈 사업에서 사용된 항생제 총량은 active ingredient로 154톤이었음. 이중 성장 촉진용으로 사용된 양이 106톤, 치료용으로 사용된 양이 48톤임. 1998년부터 비육돈 단계에 사용되었던 항생제가 줄어들기 시작하여 총 사용량은 106톤으로 감소함. 즉 성장 촉진용으로 사용되던 항생제가 107톤에서 49톤으로 약 50%가 감소하게 되었고, 치료용 항생제는 큰 변화 없이 유지됨. 1999년에는 총 사용량이 74톤으로 크게 감소함

항생제의 총 사용량은 1999년 74톤에서 2000년 81톤, 2001년에는 94톤으로 증가하기 시작함. 이런 증가에도 불구하고, 2001년 항생제 총 사용량은 비육 단계에서의 금지 전인 1996년 대비하였을 때, 약 60% 수준에 그친 것으로 조사됨

일본의 경우 사료용 생균제를 항생제 대체제의 하나로 사료원료로 이미 사용하고 있으며, 유럽연합(EU) 역시 항생제 대체제로 생균제 등록을 시작하고 있음

미국의 경우, 1997년에 미국 농무부(USDA)에서 유기농으로 생산된 식육의 표시 제한을 개선하면서부터 무항생제 유기축산이 폭발적으로 확대되어 6개주의 관계기관과 26개의 개인 인증기관에서 2001년부터 인증서비스를 시작하였음

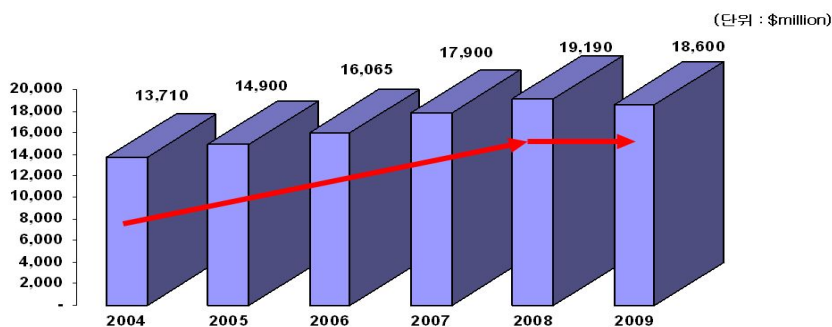
FDA에서는 가축의 항생제 사용의 제한을 권고함. 미국 FDA는 가축과 인간 모두의 항생제 내성을 방지하기 위해 가축 생산 및 사료첨가제에 있어서 항생제 사용의 제한과 식품으로 생산되는 가축은 항생제를 보다 신중하게 사용할 것과 항생제 내성



을 방지하기 위한 조치들을 공식 권고하였음. 또한 가축과 인간의 건강을 보호하는 한편 항생제의 남용을 피하기 위한 전략을 개발, 협력을 위한 가축 건강 커뮤니티와 공중 보건 커뮤니티의 필요성을 강조하였고, FDA 권고안대로 가축사육이 이루어지면 미국 축산물에 대한 이미지 제고 효과로 국내 소비 및 수출에 긍정적 효과를 기대함 (CNN 보도자료(2010.06.28.) 주요 내용)

호주의 경우, 호주 유기쇠고기를 대표하는 것을 1995년에 31개 생산자가 공동으로 조직한 OBE 회사로서 항생제나 화학물질을 사용하지 않고 자연의 들풀이나 약초를 사료로 이용하여 육성하고 있음

동물약품은 치료나 예방을 목적으로 하는 일반약품과 사료첨가제, 원료시장 및 기타 의약부외품, 의료용구 등으로 대별됨. 2009년 동물약품의 세계시장은 186억 달러에 이르며 이중 항생제판매액이 50%이상을 차지함. 동물약품의 전체 시장은 매년 5-8 % 씩 증가하고 있는 추세임



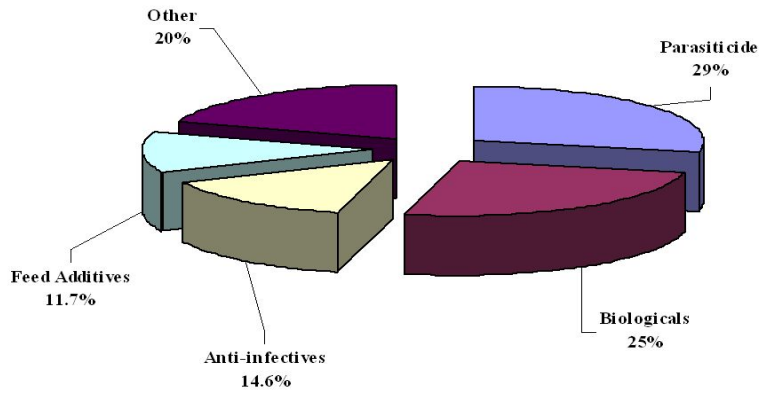
(단위 : \$million)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Market	13,710	14,900	16,065	17,900	19,190	18,600

<세계 동물사료용 항생제 대체제 시장의 연도별 추이>

자료출처: 한국동물약품협회

동물용 항생제 대체제의 용도별 시장 점유율은 구충제가 가장 많은 부분을 차지하며 그 뒤로 생물학 제제, 항감염약, 사료 첨가제로서 이용됨. 이중 항생제 대체제가 사료 첨가제로 상당부분을 차지하고 있음을 확인할 수 있음



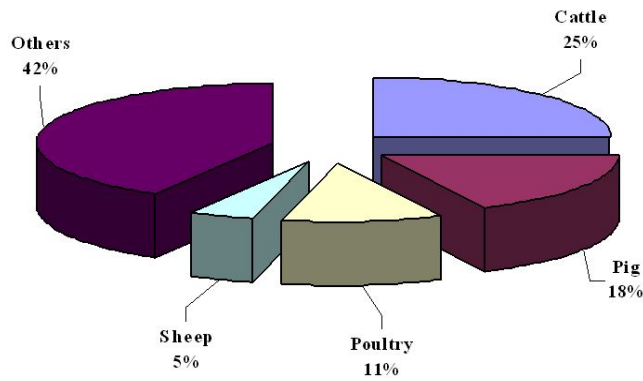
(단위 : \$ billion)

	Parasiticide	Biologicals	Anti-Infectives	Feed Additives	Others
Market	5.3	4.75	2.7	2.2	3.7

<세계 동물용 항생제 대체제의 용도별 시장 점유율>

자료출처: 한국동물약품협회

동물 약품의 축종별 현황은 소, 돼지, 가금류, 양을 순이며 소와 돼지에 사용되는 약품이 대부분을 차지하고 있음



(단위 : \$ billion)

	Cattle	Pig	Poultry	Sheep	Other
Market	4.7	3.3	2.1	0.8	7.8

<세계동물 약품의 축종별 판매현황>

자료출처: 한국동물약품협회

< 국내외 사료첨가제 시장규모 (이중 사료첨가용 항생제는 약 50%차지) >

구 분	현재의 시장규모 (2011 년)	예상 시장규모 (2013 년)
세계 시장규모(억원)	1,700(850)	3,000(1,500)
국내 시장규모(억원)	1,300(650)	2,000(1,000)
산출 근거	통계청, “광업·제조업통계조사보고서”	

\*\* ()는 사료첨가용 항생제 시장규모

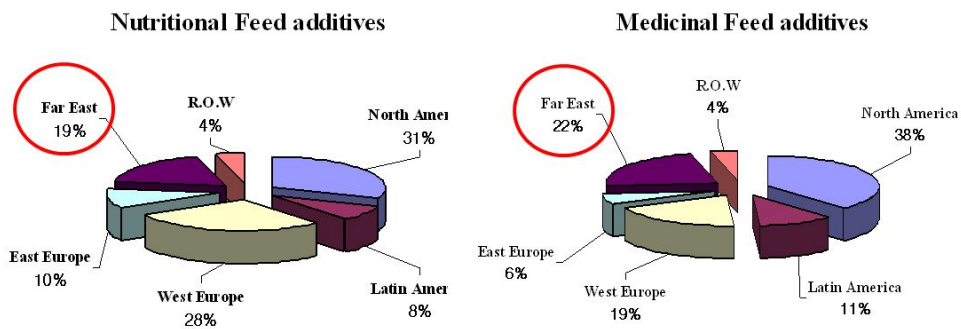
국외에서 대표적으로 항생제 대체제 관련 연구를 활발히 진행하는 업체들의 제품 개발 현황을 아래 표에 정리하였음

해 외	DSM	Natuphos	상품화	Gist-Brocades사를 인수.합병 Aspergillus ficuum 유래의 phytase
	BASF	Natuphos	상품화	DSM사의 제품을 공동 판매
	Novozyme (NovoNordick)	phytase Novo	상품화	제조합 Aspergillus oryzae 로 생산 DSM사에 제품을 공급 마케팅을 협의 중
	Novozyme (Roche)	Bio feed phytase	상품화	자체 Brand 개발성공
	日本農産工業	에코시리즈	상품화	연간 5억엔 판매, 애저용 ‘에코스파트’, 돈육용 ‘에코미트’ 2제품
	新日本化學工業, 協和醱酵	phytase kyowa	상품화	협화발효가 상품화, 신일본화학공업이 생산 - Aspergillus niger 유래, 가격1,500엔/kg, 연간 5억엔 매출 예상 - 협화발효가 발견한 Aspergillus niger SK-57 유래 phytase 를 신일본화학공업이 클론화
合同酒精	-	특허출원	-	

기술평가정보유통시스템, ‘사료 및 식품첨가제, 폐수처리용 인분해효소 phytase 대량생산기술’, 2008.

사료첨가제의 직접적 치료 및 성장촉진제로서의 medicinal feed additives의 경우 Far east (극동아시아)지역이 latin america, east europe에 비해 높은 점유율을 보인다. 이는 동아시아지역도 장기적으로 봤을 때 좋은 제품수출의 무대가 될 수 있음을 시사한다. 또한 가장 큰 시장에 속하는 미국, 유럽 등은 항생제 규제 영향으로

2010년 이후 Nutritional feed additives의 판매 및 성장률은 급속히 증가할 것으로 사료되어 전 세계적으로 항생제의 규제로 인해 항생제시장의 상당수가 위축되며 가축사료첨가 항생제 대체물질시장으로 이동할 것을 예측할 수 있음. 따라서 일시적인 항생제 대체물질 시장을 타겟으로 하기보다 장기적으로 경쟁력 있는 다기능/고기능성 항균 소재를 개발하는 것이 타당함



(단위 : \$million)

	North America	Latin America	West Europe	East Europe	Far East	Rest of World	Total
Nutritional Feed Additives	1,140	290	1,040	375	690	150	3,685
Medicinal Feed Additives	630	180	320	95	370	65	1,660

## 제7장 참고 문헌

Akesson C, Lindgren H, Pero RW, Leanderson T, Ivars F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- $\kappa$ B activity without inducing cell death. *International Immunopharmacology*. 2003. 3:1889-1900.

Burn, C.C., Peters, A., Day, M.J. and Mason, G.J. (2006). Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Lab. Anim.* 40, 353-370.

Celmer WD, Chmurny GN, Moppett CE, Ware RS, Watts PC, Whipple EB. Structure of natural antibiotic CP-47,444. *J Am Chem Soc* 1980. 102:4203-4209.

Cho HS, Kim S, Lee SY, Park JA, Kim SJ, Chun HS. Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death. *Neurotoxicology* 2008; 29:656-662.

Cooke MS, Mistry N, Wood C, Herbert KE, Lunec J. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species-implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic Biol Med*. 1997. 22: 151-159.

Darely-Usmer V, Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmacol Res*. 1996. 13:649 - 662.

EPA (Environmental Protection Agency). (1998) *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.100, Acute Toxicity Testing Background*. US EPA August, Washington, USA.

Farinati F, Cardin R, Degan P et al. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut*. 1998. 42: 351-356.

Fernandez-Gomez FJ, Gomez-Lazaro M, Pastor D, Calvo S, Aguirre N, Galindo MF, et al. Minocycline fails to protect cerebellar granular cell cultures against malonate-induced cell death. *Neurobiol Dis* 2005. 20:384-391.

Filipovic R, Zecevic N. Neuroprotective role of minocycline in co-cultures of human fetal neurons and microglia. *Exp Neurol* 2008. 211:4-51.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. In *Oxygen is a Toxic Gas—An Introduction to Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species*, 3rd edn. Oxford University Press: New York, 1998. 22 - 35.

Hodge, H.C. and Sterner, J.H. (1949) Tabulation of toxicity classes. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 10, 93-98.

Hughes PJ, Lee JS, Reiner NE, Brown G. The vitamin D receptor-mediated activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K $\alpha$ ) plays a role in the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-stimulated increase in steroid sulphatase activity in myeloid leukaemic cell lines. *J Cell Biochem* 2008. 103:1551-1562.

Kang HS, Kim YH, Lee CS, Lee JJ, Choi I, Pyun KH. Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor $\alpha$  production by acanthoic acid, (-)-pimara-9(11),15-dien-19-oic acid and its antifibrotic effects in vivo. *Cellular Immunol.* 1996. 170:212..

Kim JS, Oh CH, Jeon Hoon, Lee KS, Ma SY. Immunoregulatory Property of Fruit-Extracts of *Cornus kousa* Burg. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 2002. 10(5):327-332.

Kim, J.C., Kang, B.H., Shin, C.C., Kim, Y.B., Lee, H.S., Kim, C.Y., Han, J., Kim, G.S., Chung, D.W. and Chung, M.K. (2002) Subchronic toxicity of plant sterol esters administered by gavage to Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1569-1580.

Lee SM, Yune TY, Kim SJ, Kim YC, Oh YJ, Markelonis GJ, et al. Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF- $\alpha$  expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. *J Neurochem* 2004. 91:568-578.

Lemaire I, Assinewe V, Cano P, Awang DV, Arnason JT. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999. 64:109-115.

Ludvigsson J. Intervention at diagnosis of type I diabetes using either antioxidants or photopheresis. *Diabetes Metab Rev*. 1993. 9: 329-36.

Matkovic K, Brugnoli F, Bertagnolo V, Banfich, Visnjic D. The role of the nuclear Akt activation and Akt inhibitors in all-trans-retinoic acid-differentiated HL-60 cells. *Leukemia* 2006. 20:941-951.

Marcinkowska E, Garay E, Gocek E, Chrobak A, Wang X, Studzinski GP. Regulation of C/EBPbeta isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp Cell Res* 2006. 312:2054-20555.

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991. 88:10045 - 10048.

Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized LDL in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Annu Rev Med* 1992. 43:219-225.

Pan Q, Granger J, O'Connell TD, Somerman MJ, Simpson RU. Promotion of HL-60 cell differentiation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of protein kinase C levels and activity. *Biochem Pharmacol* 1997. 54:909-905.

Saker KE, Fike JH, Veit H, Ward DL. Brown seaweed-(Tasco) treated conserved forage enhances antioxidant status and immune function in heat-stressed wether lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2004. 88:122-130

Sohng JK, Yamaguchi T, Seong CN, Baik KS, Park SC, Lee HJ, et al. Production, isolation and biological activity of nargenicin from *Nocardia* sp. CS682. *Arch Pharm Res* 2008; 31:1339 - 345.

Tsuji M, Wilson MA, Lange MS, Johnston MV. Minocycline worsens

hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Exp Neurol* 2004. 189:58-65.

Wang J, Yen A. A MAPK-positive feedback mechanism for BLR1 signaling propels retinoic acid-triggered differentiation and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2008. 283:4375- 4386.

Weist S, Su'ssmuth RD. Mutational biosynthesis-tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005. 68:141-150.

Yamada O, Ozaki K, Nakatake M, Akiyama M, Kawauchi K, Matsuoka R. Multistep regulation of telomerase during differentiation of HL60 cells. *J Leukoc Biol* 2008. 83:1240 - 1248.

Zimber A, Chedeville A, Abita JP, Barbu V, Gespach C. Functional interactions between bile acids, all-trans retinoic acid, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on monocytic differentiation and myeloblastin gene down-regulation in HL60 and THP-1 human leukemia cells. *Cancer Res* 2000. 60:672-678.

국립수의과학검역원. (2007) 동물용의약품등 독성시험지침, 국립수의과학검역원 고시 2007-5, 안양.

농림수산검역검사본부. 배합사료 제조용 동물 의약품 등 사용기준 (제2011-23호)

농림수산식품부 공고 제2011-266호, "사료공정서" 고시 개정(안), 2011.06.13.

한국동물약품협회. 2011. 세계동물약품시장현황

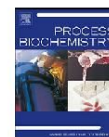
화학저널. 사료첨가제 시장 정세 양상. 1993. 10. 4





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/procbio](http://www.elsevier.com/locate/procbio)

## An organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media

Poonam Mander<sup>1</sup>, Seung Sik Cho<sup>1</sup>, Jaya Ram Simkhada, Yun Hee Choi, Da Jeong Park, Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 September 2011  
Received in revised form  
16 December 2011  
Accepted 3 January 2012  
Available online 12 January 2012

#### Keywords:

Microbial lipase  
Organic solvent-tolerant  
Enzymatic transesterification  
Biodiesel production  
*Streptomyces*

### ABSTRACT

The enzymatic route for biodiesel production has been noted to be cost ineffective due to the high cost of biocatalysts. Reusing the biocatalyst for successive transesterification cycles is a potential solution to address such cost inefficiency. However, when organic solvent like methanol is used as acyl-acceptor in the reaction, the biocatalyst (lipase) gets severely inactivated due to the inhibitory effect of undissolved methanol in the reaction medium. Thus, organic solvent-tolerant lipase is highly desirable for enzymatic transesterification. In response to such desirability, a lipase (LS133) possessing aforesaid characteristic was extracted from *Streptomyces* sp. CS133. Relative molecular mass of the purified LS133 was estimated to be 39.8 kDa by SDS-PAGE. Lipase LS133 was stable in pH range 5.0–9.0 and at temperature lower than 50 °C while its optimum lipolytic activity was achieved at pH 7.5 and 40 °C. It showed the highest hydrolytic activity towards long chain *p*-nitrophenyl palmitate with  $K_m$  and  $V_{max}$  values of 0.152 mM and 270.2 mmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectively. It showed non-position specificity for triolein hydrolysis. The first 15 amino acid residues of its N-terminal sequence, AIPLRQTLNFQAXYQ, were noted to have partial similarity with some of the previously reported microbial lipases. Its catalytic involvement in biodiesel production process was confirmed by performing enzymatic transesterification of vegetable oils with methanol.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Biodiesel is receiving growing attention worldwide as a foremost substitute for conventional petroleum-derived diesel because it is simple to use, biodegradable, non-toxic, and essentially free of sulfur and aromatics [1]. Biodiesel comprises of mono-alkyl esters of long chain fatty acids which are derived from renewable feedstock, such as vegetable oils and animal fats, using a method known as transesterification (alcoholysis) [2]. Such method exchanges the alcohol functional groups of the feedstock triglycerides with that of a short chain alcohol (for example methanol, ethanol, etc.), preferably in the presence of suitably selected catalyst. By far alkali catalysts such as metal alkoxides and hydroxides have become default catalysts [3] for large scale biodiesel production processes since they are cheap, and produce high yields at short reaction time in mild temperature and pressure settings [4]. Despite the excellent conversion capability of such alkali catalyzed transesterification process, it is often criticized for some of its inherent drawbacks. Firstly, it mandates feedstock triglycerides to be in the highest purified form. Thus non-virgin sources, such as waste cooking oils and

rendered animal fats which are obviously the cheap feedstock [5,6], may not be useful in such process. Even a small fraction of free fatty acids in such feedstock interfere with the transesterification process by reacting with the alkali catalysts to create soaps. Additional downstream processing is required to separate such soaps. Secondly, the produced biodiesel using an alkali catalyst has a high pH value and need subsequent washing. The generated alkali effluent may pose some environmental risks. Finally, the recovery of the process by-product, glycerol, in its pure form is difficult which shrinks the value-added application of this process.

To overcome aforesaid demerits of alkali catalyzed transesterification, different route for biodiesel production has been continuously sought. Enzymatic transesterification is one of them which can address all of the aforesaid drawbacks in alkali catalyzed transesterification. Different lipases from various sources (for example *Photobacterium lipolyticum* [7], *Pseudomonas aeruginosa* [8], *Ralstonia* sp. CS274 [9], etc.) have previously been reported that can well catalyze transesterification reactions. However, due to the nature of lipases being relatively costly than the alkaline catalysts there exists a bottleneck (high production cost) which has limited this technique from being commercialized. It has been suggested that such bottleneck can be reduced by reusing enzymes for successive cycles of production [10] by exploiting the non-altering property of lipases in the reaction medium. However, when organic solvent like methanol is used as acyl-acceptor, the used

\* Corresponding author. Tel.: +82 62 230 6380; fax: +82 62 227 3963.

E-mail address: [jcyu@chosun.ac.kr](mailto:jcyu@chosun.ac.kr) (J.C. Yoo).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.



## Regular Article

Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis modelJaya Ram Simkhada<sup>1</sup>, Seung Sik Cho<sup>1</sup>, Poonam Mander, Yun Hee Choi, Jin Cheol Yoo<sup>\*</sup>

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 May 2011

Received in revised form 23 August 2011

Accepted 16 September 2011

Available online 6 October 2011

## Keywords:

Carrageenan induced tail-thrombosis  
thrombosis treatment  
*in vivo*

## ABSTRACT

**Introduction:** The prevalence of cardiovascular diseases, one of the major causes of worldwide mortality, is being increasingly reported. Safer, more effective, and less expensive thrombolytic drugs can possibly overcome the underlying problems associate with current thrombolytic drugs.

**Methods:** A thrombolytic enzyme was purified and characterized from a *Streptomyces* strain. Carrageenan induced tail-thrombosis mice model was used to evaluate *in vivo* antithrombotic effect of the enzyme.

**Results:** First 15 N-terminal amino acids of the purified enzyme were IAGGQAIYAGGGRRS, which are significantly different from the reported fibrinolytic enzymes. The enzyme exhibited  $14.3 \pm 2.3$ -fold stronger thrombolytic activity than that of plasmin. In carrageenan induced tail-thrombosis model, the enzyme caused reduction in frequency of thrombus. Tail-thrombus of the enzyme treated group was significantly shorter than the physiological saline treated group and the thrombus decrement was correlated with the enzyme dose.

**Conclusions:** The enzyme purified from the *Streptomyces* strain can be a potential candidate for the treatment of thrombosis.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Apart from growing modern technologies, human beings are still seemed to be feeble and prone to varieties of existing and emerging diseases. As a result, mortality rate caused by these diseases is rapidly mounting. The prevalence of cardiovascular diseases is progressively rising and remains at the top of 15 leading diseases as shown by the global mortality projection for 2002 to 2030 [1]. The key reason of cardiovascular diseases is the formation of blood clots. Inside human body, the clot formation and lysis are kept in balance by homeostasis. However, the clots are not hydrolyzed in unbalanced condition that leads to thrombosis. Administration of thrombolytic drugs to dissolve the clot is the only alternative of surgery to remove or by bypass the blockage [2]. The main target for anti-thrombotic drug development is either platelets aggregation or activation of coagulation factors [3,4]. Until now, several types of thrombolytic drugs, categorized into three generations, have been developed for the therapeutic purposes. Among them, urokinase-type plasminogen activator, tissue plasminogen activator (t-PA) and bacterial plasminogen

activator streptokinase are commonly used. However, an ideal drug is yet to be developed. An ideal thrombolytic drug should have the following characteristics: reasonable cost, no antigenicity, no effect on blood pressure, no procoagulant effect, low reocclusion rate and low incidence of intracranial and system bleeding. It should be fibrin selective, effective in dissolving older thrombi and resistant to plasminogen-activator inhibitor. Moreover, an ideal drug should be suitable to administer as an intravenous bolus and should execute reperfusion in 100% of patients and rapid and complete coronary flow [5]. Drugs such as t-PA and urokinase are expensive, exhibit low fibrin specificity, have short half-lives, and encompass undesired side effects such as gastrointestinal bleeding, resistance to reperfusion and allergic reactions, etc. [2]. Therefore, search for ideal thrombolytic drug is an urgent and important task for the scientific world. In the course of searching thrombolytic agents, bacteria, fungi and algae have been extensively studied besides some other sources. Actinomycetes, the prevailing source of antibiotics, were also studied and a few enzymes have been reported from *Streptomyces* [6–9]. Several physical or chemical experimental models have been established for the evaluation of latent thrombolytic drugs *in vivo*. Almost all of those approaches require complicated surgery to expose blood vessels. As an alternative, carrageenan-induced thrombosis in the tail model was established a few decades ago [10,11]. This method can be performed without surgery and without killing the experimental animal. It is relatively cheaper as small scale animals are used and allows observing and measuring the developing thrombosis continuously and accurately. Carrageenan, the extract of red seaweeds, is straight-chained sulfur-containing polysaccharides composed of repeated units of D-galactose and 3,6-anhydro-D-galactose. Carrageenan is most likely to cause thrombosis by activation

**Abbreviations:** CVD, cardiovascular disease; t-PA, tissue plasminogen activator; EDTA, ethylenediamine tetra-acetic acid; EGTA, ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; PMSF, phenylmethyl-sulfonylfluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; NAI, *N*-acetylimidazole; NBS, *N*-bromosuccinimide; DEPC, diethylpyrocarbonate; EDAC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; IA, iodoacetate; CA, citraconic anhydride; PG, phenylglyoxal.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: + 82 62 230 6380; fax: + 82 62 227 3963.

E-mail address: [jcyu@chosun.ac.kr](mailto:jcyu@chosun.ac.kr) (J.C. Yoo).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

0049-3848/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.thromres.2011.09.014

## Metabolic Engineering of *Nocardia* sp. CS682 for Enhanced Production of Nargenicin A<sub>1</sub>

Sushila Maharjan · Dinesh Koju · Hei Chan Lee · Jin Cheol Yoo · Jae Kyung Sohng

Received: 23 May 2011 / Accepted: 23 November 2011 /  
Published online: 9 December 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** A number of secondary metabolites having therapeutic importance have been reported from the genus *Nocardia*. One of the polyketide antibiotic compounds isolated from *Nocardia* is nargenicin A<sub>1</sub>. Recently, nargenicin A<sub>1</sub> has been isolated from *Nocardia* sp. CS682, a new *Nocardia* strain isolated from soil in Jeonnam, South Korea. It possesses strong antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In this study, we applied a metabolic engineering approach based on recombinant DNA technology in order to boost the production of nargenicin A<sub>1</sub> from *Nocardia* sp. CS682. Initially, we optimized the transformation of this new strain by electroporation method. Heterologous expression of *S*-adenosylmethionine synthetase (MetK1-sp) in *Nocardia* sp. CS682 enhanced the production of nargenicin A<sub>1</sub> by about 2.8 times due to transcriptional activation of biosynthetic genes as revealed by reverse transcription polymerase chain reaction analysis. Similarly, expression of acetyl-CoA carboxylase genes improved nargenicin A<sub>1</sub> production by about 3.8 times in *Nocardia* sp. ACC18 compared to that in *Nocardia* sp. CS682 and *Nocardia* sp. NV18 by increasing precursor pool. Thus, enhanced production of nargenicin A<sub>1</sub> from *Nocardia* sp. CS682 can be achieved by expression of transcriptional activator genes and precursor genes from *Streptomyces* strains.

**Keywords** Acetyl-CoA carboxylase · Nargenicin A<sub>1</sub> · *Nocardia* sp. CS682 · *S*-adenosylmethionine synthetase · Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

### Introduction

*Nocardia* is an aerobic Gram-positive, filamentous and partially acid-fast bacterium, belonging to the Actinomycetaceae family. They are ubiquitously found in soil, water, decaying

---

S. Maharjan · D. Koju · H. C. Lee · J. K. Sohng (✉)  
Institute of Biomolecule Reconstruction, Sun Moon University, 100, Kalsan-ri, Tangjeonmyun,  
Asansi, Chungnam 336-708, Republic of Korea  
e-mail: sohng@sunmoon.ac.kr

J. C. Yoo  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea

## A novel cold-adapted lipase, LP28, from a mesophilic *Streptomyces* strain

Jaya Ram Simkhada · Hah Young Yoo ·  
Seung Sik Cho · Yun Hee Choi · Seung Wook Kim ·  
Don Hee Park · Jin Cheol Yoo

Received: 30 May 2011 / Accepted: 18 July 2011 / Published online: 10 September 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Fossil fuel is limited but its usage has been growing rapidly, thus the fuel is predicted to be completely running out and causing an unbearable global energy crisis in the near future. To solve this potential crisis, incorporating with increasing environmental concerns, significant attentions have been given to biofuel production in the recent years. With the aim of isolating a microbial biocatalyst with potential application in the field of biofuel, a lipase from *Streptomyces* sp. CS628, LP28, was purified using hydroxyapatite column chromatography followed by a gel filtration. Molecular weight of LP28 was estimated to be 32,400 Da by SDS–PAGE. The activity was the highest at 30 °C and pH 8.0 and was stable at pH 6.0–8.0 and below 25 °C. The enzyme preferentially hydrolyzed *p*-nitrophenyl decanoate (C10), a medium chain substrate. Furthermore, LP28 non-specifically hydrolyzed triolein releasing both 1,2- and 1,3-diolein. More importantly, LP28 manifestly catalyzed biodiesel production using palm oil and methanol; therefore, it can be a potential candidate in the field of biofuel.

**Keywords** Biodiesel production · Cold-adapted lipase · Mesophilic · *Streptomyces*

### Abbreviations

CA	Citraconic anhydride
DEPC	Diethylpyrocarbonate
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
FAME	Fatty acid methyl ester
IA	Iodoacetate
NAI	<i>N</i> -acetylimidazole
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PG	Phenylglyoxal
PMSF	Phenylmethyl-sulfonyl fluoride
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrophenol
<i>p</i> NPA	<i>p</i> -nitrophenyl acetate
<i>p</i> NPB	<i>p</i> -nitrophenyl butyrate
<i>p</i> NPD	<i>p</i> -nitrophenyl decanoate
<i>p</i> NPM	<i>p</i> -nitrophenyl myristate
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrophenyl palmitate
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TLC	Thin layer chromatography

J. R. Simkhada, H. Y. Yoo contributed equally to this work.

J. R. Simkhada · S. S. Cho · Y. H. Choi · J. C. Yoo (✉)  
Department of Pharmacy, Chosun University,  
Gwangju 501-759, Korea  
e-mail: jcyu@chosun.ac.kr

H. Y. Yoo · S. W. Kim  
Department of Chemical and Biological Engineering,  
Korea University, Seoul, Korea

D. H. Park  
Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy  
and Biomaterials, Chonnam National University,  
500-757 Gwangju, Republic of Korea

### Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) are one of the most important industrial enzymes capable of hydrolyzing fatty acid ester bonds in aqueous medium and synthesize them in non-aqueous medium. They are used in fat and oil hydrolysis, food and detergent industries, peptide synthesis, pharmaceutical industries, and so on [1, 2]. Biodiesel, fatty acid methyl ester (FAME), is one of the optimistic alternatives of fossil



## A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326

Seung Sik Cho · Da Jeong Park · Jaya Ram Simkhada ·  
Joon Hee Hong · Jae Kyung Sohng ·  
Oh Hyung Lee · Jin Cheol Yoo

Received: 30 May 2011 / Accepted: 18 July 2011 / Published online: 10 September 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** In an attempt to isolate a biocatalyst able to catalyze biodiesel production from microbial source, *Streptomyces* sp. CS326 was screened from hundreds of soil isolates collected from various parts of Korea. In 16S rRNA sequence analysis, the strain showed high degree of similarity with *Streptomyces xanthocidicus* (99.79%); therefore, it is classified as *Streptomyces* sp. CS326. An extracellular lipase produced by the strain (LP326) was purified using a single step gel permeation chromatography on Sepharose CL-6B. Molecular weight of LP326 was estimated to be 17,000 Da by SDS-PAGE. The activity was optimum at 40 °C and pH 7.0 and was stable at pH 5.0–8.0 and below 50 °C. It preferred *p*-nitrophenyl palmitate (C16), a long chain substrate; and  $K_m$  and  $V_{max}$  for the substrate were determined to be 0.24 mM and 4.6 mM/min mg, respectively. First 10 N-terminal amino acid sequences were APDLVALQSE, which are different from so far reported lipases. LP326 catalyzed biodiesel production using methanol and various oils; therefore, the enzyme can be applicable in the field of biofuel.

**Keywords** Biocatalyst · Neutral lipase · *Streptomyces* · Biodiesel production

### Introduction

Lipases are one of the most important groups of hydrolytic enzymes, which hydrolyze triglyceride into free fatty acids and glycerol. Ubiquitously found in animals, plants, fungi and bacteria, these enzymes catalyze esterification, transesterification, aminolysis, acidolysis, and alcoholysis reactions besides catalyzing hydrolysis of triglyceride [1]. Among several lipases reported from wide varieties of sources, microbial lipases occupy the centre attraction regarding their broad biotechnological applications [2]. Lipases are used in various facets of biotechnology, such as from fats and oil hydrolysis to food and detergent industries, peptide synthesis, pharmaceutical industries and so on [3]. One of the stunning applications of lipase is in the production of biodiesel, a fatty acid ester, which is carried out in non-aqueous media through transesterification of alcohols and variety of oils, animal fats or waste oil. A potential lipase to be used in biodiesel production should utilize all mono, di, and triglycerides with high yield of free fatty acids in short reaction time. Also, it should be high resistant to product inhibition, temperature and alcohol, etc. [4]. Lipases are very useful because they can display excellent chemoselectivity, stereoselectivity and regioselectivity; they can be produced in large scale using various microbes; and crystal structures of many lipases, which is highly desirable to execute engineering strategies, have already been solved [5]. We have screened *Streptomyces* sp. CS326, along with some other strains, as a potent lipase-producing microbe from 700 soil isolates preserved in our laboratory [6]. A lipase secreted by the strain

S. S. Cho and D. J. Park contributed equally to this work.

S. S. Cho · D. J. Park · J. R. Simkhada ·  
J. H. Hong · J. C. Yoo (✉)  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
e-mail: jcyu@chosun.ac.kr

J. K. Sohng  
Department of Pharmaceutical Engineering,  
Sun Moon University, Asansi, Chungnam 336-708, Korea

O. H. Lee  
Department of Biological Science,  
Mokpo National University, Muan, Jeonnam, Korea

## A newly isolated *Streptomyces* sp. CS392 producing three antimicrobial compounds

Seung Sik Cho · Yun Hee Choi · Jaya Ram Simkhada ·  
Poonam Mander · Da Jeong Park · Jin Cheol Yoo

Received: 30 May 2011 / Accepted: 18 July 2011 / Published online: 10 September 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** With the aim of isolating new microbes capable of producing strong antimicrobial substances, strain CS392 was screened from 700 soil isolates preserved in our laboratory. The strain was related to genus *Streptomyces* based on various characteristics. Three highly active antimicrobial compounds, C1, C2 and C3, produced by the strain were purified by solvent extraction followed by silica gel column chromatography. These compounds were highly active against various Gram-positive resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE). Among three, C3 was the most active against MRSA and VRSA with minimal inhibitory concentration (MIC) of 2 µg/ml while C2 and C3 had MIC values of 4 µg/ml for the strains. In case of *Bacillus subtilis* ATCC6633, C1 and C3 were more effective with MIC values of 0.5 µg/ml than C2 with MIC of 2 µg/ml. Those antibiotics were variably active (MIC of 4–32 µg/ml) against *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 9341 and VRE.

**Keywords** Antimicrobial compounds · Purification · *Streptomyces* sp. CS392

### Introduction

*Actinomycetes* are well-known sources of antibiotics and other useful secondary metabolites such as antitumor agents, anti-inflammatory agents, etc. [1, 2]. *Streptomyces*, typically known as prime source of antibiotics, are Gram-positive filamentous bacteria ubiquitously present in most soils. They produce approximately 75% of commercially and medically useful antibiotics and 60% of antibiotics used in agriculture [3, 4]. Major types of antibiotics produced by *Streptomyces* are aminoglycosides, anthracyclins, glycopeptides,  $\beta$ -lactams, macrolides, nucleosides, peptides, polyenes, polyethers, and tetracyclines [4]. The widespread use of antibiotics in medicine plays a significant role in the emergence of resistant bacteria and specifically, misuse and/or overuse of antibiotics are the major causes [5–7]. In addition, unhealthy practices in the pharmaceutical and manufacturing industries also contribute to the likelihood of emerging antibiotic-resistant strains [8]. *Staphylococcus aureus* is one of the major resistant pathogens. Found on the mucous membranes and the human skin of around a third of the population, it is extremely adaptable to antibiotic pressure. Methicillin and oxacillin are their antibiotics of choice. MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) was for the first time detected in Britain in 1961 and is now quite common in hospitals. About 50% of *S. aureus* isolates show resistance to methicillin in USA and some European countries [9, 10]. *S. aureus* left vancomycin as the only effective agent available at the time. However, strains with intermediate levels of resistance (4–8 µg/ml), termed GISA (glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*) or VISA (vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*), have begun appearing from late 1990s. The first identified case was in Japan in 1996, and the strains ever since have been

S. S. Cho and Y. H. Choi contributed equally to this work.

S. S. Cho · Y. H. Choi · J. R. Simkhada · P. Mander ·  
D. J. Park · J. C. Yoo (✉)  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
e-mail: jeyu@chosun.ac.kr

## An Organic Solvent-tolerant Alkaline Lipase from *Streptomyces* sp. CS268 and Its Application in Biodiesel Production

Poonam Mander, Seung Sik Cho, Jaya Ram Simkhada, Yun Hee Choi, Da Jeong Park, Jung Wan Ha, and Jin Cheol Yoo

Received: 31 July 2011 / Revised: 25 October 2011 / Accepted: 2 November 2011  
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2012

**Abstract** In an effort to identify a microbial lipase that can catalyze transesterification reactions used in biodiesel production, an organic solvent-tolerant lipase was purified from *Streptomyces* sp. CS268. The molecular weight of the purified lipase was estimated to be 37.5 kDa by SDS-PAGE. The lipase showed highest activity at a temperature of 30°C and pH 8.0 while it was stable in the pH range 4.0 ~ 9.0 and at temperatures ≤ 50°C. It showed the highest hydrolytic activity towards medium-length acyl chain *p*-nitrophenyl decanoate with  $K_m$  and  $V_{max}$  values of 0.59 mM and 319.5 mmol/mg/min, respectively. Also, the lipase showed non-position specificity for triolein hydrolysis. The purified lipase catalyzed transesterification reaction of soybean oil with methanol, suggesting that it can be a potential enzymatic catalyst for biodiesel production.

**Keywords:** microbial lipase, organic solvent-tolerant, *Streptomyces*, biodiesel production

### 1. Introduction

Biodiesel is a promising alternative fuel to conventional fossil fuels because it is clean, renewable, and environmentally safe. One of the most popular processes that have been used in biodiesel production is transesterification, also called alcoholysis [1]. It refers to a catalyzed reaction

involving the displacement of an alcohol from triglycerides (an ester) by another alcohol to yield fatty acid alkyl esters (*i.e.*, biodiesel) and glycerol as a by-product. Chemical transesterification, especially using the alkali-catalysis process, are popular because of their high efficiency in converting triglycerides to their corresponding alkyl esters in short reaction time. Such reactions, however, have several inherent shortcomings: they are energy intensive, recovery of glycerol is difficult; the acidic or alkaline catalyst has to be removed from the product, alkaline waste water requires treatment, and free fatty acids and water interfere with the reaction [2,3]. Hence, to overcome such problems alternative enzymatic transesterification methods have continuously been sought.

Lipases or triacylglycerol hydrolases (EC 3.1.1.3) are one of the most important enzymes that have popularly been used in enzymatic transesterifications. In the majority of such transesterifications, organic liquid solvents are used as a reaction medium because the reactions catalyzed by enzymes in the presence of organic solvents offer many advantages including (i) the relative high solubility of substrates, (ii) the relative ease of recovery of products in organic phase, and (iii) the ability to shift the reaction equilibrium in the synthetic direction [4]. However, most enzymes, including lipases, are not stable in organic solvents, especially hydrophilic organic solvents, because organic solvents strip water molecules from the enzyme surface which may turn the enzyme inactive [5]. In order to combat such instability of the enzymes in organic solvents, several approaches, such as immobilization and chemical/physical modification of enzymes, have been suggested [6]. Alternatively, it would be desirable to screen for naturally evolved enzymes that have intrinsic organic solvent tolerance.

Poonam Mander<sup>†</sup>, Seung Sik Cho<sup>†</sup>, Jaya Ram Simkhada, Yun Hee Choi, Da Jeong Park, Jung Wan Ha, and Jin Cheol Yoo<sup>\*</sup>  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: +82-62-230-6380; Fax: +82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

<sup>†</sup>Both authors contributed equally to this work.



Download full text

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30:945–960, 2011  
Copyright © Taylor and Francis Group, LLC  
ISSN: 1525-7770 print / 1532-2335 online  
DOI: 10.1080/15257770.2011.625374



## SYNTHESIS OF NOVEL DIFLUORO-CYCLOPROPYL GUANINE NUCLEOSIDES AND THEIR PHOSPHONATE ANALOGUES AS POTENT ANTIVIRAL AGENTS

Hua Li, Jin Cheol Yoo, Eunae Kim, and Joon Hee Hong

*BK-21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju, Republic of Korea*

□ *The synthesis of new rigid guanine analogues with anti-HIV-1 and anti-herpes viral activities is described. The phosphonate of difluorocyclopropane nucleoside analogue 26 exhibits in vitro anti-HIV-1 activity similar to that of PMEA in MT-4 cells. Further, analogue 20 shows moderate anti-HCMV activity in MRC cells.*

**Keywords** Antiviral agents; nucleoside analogues; difluorination

### INTRODUCTION

The discovery of acyclovir **1**<sup>[1]</sup> as an anti-herpes agent ignited the search for new antiviral nucleosides with a disconnected chain resulting from the omission of bonds from the pentose or cyclopentane rings. In the last few years, several (phosphonomethoxy)alkyl derivatives of purine and pyrimidine have emerged as potent antiviral agents.<sup>[2]</sup> As mimics of nucleoside monophosphates, these acyclonucleotide analogues exert their antiviral effect following sequential activation by cellular kinases to their diphosphate derivatives<sup>[3]</sup> (nucleoside triphosphate analogues), which act as potent inhibitors of viral DNA polymerases. The first step in the activation of antiviral nucleosides is frequently a difficult step in the phosphorylation sequence, which ultimately leads to triphosphates. Phosphonate derivatives of antiviral nucleosides have been attractive targets as potential antiviral agents, because they do not require monophosphorylation, which is a crucial step for the activation of nucleosides.<sup>[4]</sup>

Received 22 August 2011; accepted 16 September 2011.

This study was supported by the Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea, 2011.

Address correspondence to Joon Hee Hong, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Republic of Korea. E-mail: hongjh@chosun.ac.kr





Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/procbio](http://www.elsevier.com/locate/procbio)

## Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes*

Hoe Chang Kim<sup>a,1</sup>, Bong-Suk Choi<sup>a,1</sup>, Kumar Sapkota<sup>a,d</sup>, Seung Kim<sup>b</sup>, Hyo Jeong Lee<sup>b</sup>, Jin Cheol Yoo<sup>c</sup>, Sung-Jun Kim<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biotechnology, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Alternative medicine, Gwangju University, Gwangju 503-703, Republic of Korea

<sup>c</sup> Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>d</sup> Central Department of Zoology, Tribhuvan University, Kirtipur, Kathmandu, Nepal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 December 2010

Received in revised form 7 April 2011

Accepted 8 April 2011

#### Keywords:

*Paecilomyces tenuipes*

Fibrinolysis

Fungal enzymes

Thrombosis

### ABSTRACT

A fibrinolytic enzyme (PTEFP) was purified from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes*. Analysis of the purified PTEFP by SDS-PAGE and fibrin zymography demonstrated a single protein band of approximately 14 kDa. Fibrinolysis pattern showed that PTEFP rapidly hydrolyzed  $\alpha$ -chain followed by  $\beta$ -chain. PTEFP rapidly degraded A $\alpha$ -chain of human fibrinogen but did not hydrolyze B $\beta$ - or  $\gamma$ -chain indicating that it is  $\alpha$ -fibrinogenase. The N-terminal sequence was AQNIGAVVNLSPKQ, which is different from that of other known fibrinolytic enzymes. The PTEFP displayed maximum activity at 35 °C and pH 5.0, and was stable between pH 5.0–8.0 and below 40 °C. Calcium ion enhanced the enzyme activity whereas Zn<sup>2+</sup> inhibited it. The fibrinolytic activity was strongly inhibited by PMSF identifying it as a serine protease. PTEFP exhibited high specificity for the substrate H-D-Val-Leu-Lys-pNA and  $K_m$  and  $V_{max}$  values for this substrate were 0.17 mM and 59 U/ml respectively. These results suggest that PTEFP is a novel fibrinolytic enzyme and may have potential applications in treating thrombosis.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cardiovascular disease is a main contributing cause of death around the world. Due to its prevalence cardiovascular disease is expected to impose an ever-increasing impact on our society emotionally, socially and financially. Intravascular thrombosis, a consequence of fibrin aggregation in the arteries, is one of the main causes of cardiovascular disease. Fibrin is the primary protein component of blood clots, which are formed from fibrinogen by the enzyme thrombin. Fibrinogen, a glycoprotein contains two sets of three polypeptide chains (A $\alpha$ , B $\beta$  and  $\gamma$ ). During fibrinolysis the insoluble fibrin fiber is hydrolyzed into fibrin degradation products by plasmin. Plasmin is generated from plasminogen by plasminogen activators such as tissue plasminogen activator (t-PA), vascular plasminogen activator, blood plasminogen activator, urokinase, Hageman factor, and streptokinase-plasminogen complex [1]. Fibrin clot formation and fibrinolysis are normally well balanced in biological systems. However, when fibrin is not hydrolyzed due to some disorder, thromboses can occur. Myocardial infarction is the

most common of these thromboses. Although t-PA and urokinase are still commonly used in thrombolytic therapy currently, they have some major disadvantages such as high cost, allergic reactions, and risk for internal bleeding within the intestinal tract when orally administered [2,3]. Therefore, cheaper and safer fibrinolytic enzymes from diverse sources are currently being sought.

In recent years, mushrooms have become an attractive source of thrombolytic agents because of their efficiency and safety. Many fibrinolytic enzymes have been identified and characterized from several edible or medicinal mushrooms including *Grifola frondosa* [4], *Flammulina velutipes* [5], *Tricholoma sapoceanum* [6], *Fomitella fraxinea* [7], *Cordyceps sinensis* [8] and *Pleurotus eryngii* [9]. Due to the encouraging biological advantages of using food sources of fibrinolytic enzymes, we have also extensively explored new sources of fibrinolytic enzymes from various edible mushrooms such as *P. fraxinea*, *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *C. militaris*, and *A. mellea* [10–14].

*Paecilomyces tenuipes* (also referred to as *Isaria japonica*) is one of the famous Chinese medicinal entomopathogenic fungi as are the fungi such as *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*. It is a parasitic fungus on the larvae of Lepidoptera. *P. tenuipes* is traditionally used in time-honored tonics and for improvement of blood loss, fatigue and anorexia in Japan, Korea, and China [15]. The fruiting bodies of *P. tenuipes* are highly valued as medicinal herbs due to their various biological and pharmacological activities

\* Corresponding author. Tel.: +82 62 230 6664; fax: +82 62 230 6664.

E-mail address: [sjtkim@chosun.ac.kr](mailto:sjtkim@chosun.ac.kr) (S.-J. Kim).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

## Improvement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* by genetic manipulation of structural biosynthesis genes

Hum Nath Jnawali · Jin Cheol Yoo ·  
Jae Kyung Sohng

Received: 27 December 2010 / Accepted: 2 February 2011 / Published online: 20 February 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** To enhance clavulanic acid production, four structural clavulanic acid biosynthesis genes, carboxyethylarginine synthase (*ceas2*),  $\beta$ -lactam synthetase (*bls2*), clavamate synthase (*cas2*) and proclavamate amidinohydrolase (*pah2*), were amplified from *Streptomyces clavuligerus* genomic DNA. They were cloned in the pSET152 integration and pIBR25 expression vectors containing the strong *ermE\** promoter to generate pHN18 and pHN19, respectively, and both plasmids were introduced into *S. clavuligerus* by protoplast transformation. Clavulanic acid production was increased by 8.7-fold (to ~310 mg/l) in integrative pHN18 transformants and by 5.1-fold in pHN19 transformants compared to controls. Transcriptional analyses showed that the expression levels of *ceas2*, *bls2*, *cas2* and *pah2* were markedly increased in both transformants as compared with wild-type. The elevation of the *ceas2*,

*bls2*, *cas2* and *pah2* transcripts was consistent with the enhanced production of clavulanic acid.

**Keywords** Clavulanic acid · Integration · Replication · *Streptomyces clavuligerus*

### Introduction

*Streptomyces clavuligerus* is used for the industrial production of the  $\beta$ -lactam, clavulanic acid (CA). Due to its ability to inhibit many  $\beta$ -lactamases, clavulanic acid is used clinically in combination with other  $\beta$ -lactam antibiotics to combat antibiotic resistant infections caused by  $\beta$ -lactamase-producing bacteria. Biosynthetic pathway of CA has only been partially elucidated (Fig. 1) (Baggaley et al. 1997; Jensen and Paradkar 1999). It begins with the condensation of arginine and glyceraldehyde 3-phosphate, catalyzed by carboxyethylarginine synthase (CEAS), to produce 2-carboxyethyl-arginine (Khaleli et al. 1999). 2-Carboxyethyl-arginine is cyclized by  $\beta$ -lactam synthetase (BLS) to give the first  $\beta$ -lactam, deoxyguanidinoproclavaminic acid (Bachmann et al. 1998). Hydroxylation by clavaminic acid synthase (CAS), followed by hydrolysis of the guanidino side-chain catalyzed by proclavamate amidino hydrolase (PAH), yields proclavaminic acid (Elson et al. 1993), which undergoes two further oxidation steps, again catalyzed by CAS, to produce bicyclic clavaminic acid (Lloyd et al. 1999). This is

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10529-011-0561-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. N. Jnawali · J. K. Sohng (✉)  
Department of Pharmaceutical Engineering, SunMoon  
University, Asansi, Chungnam 336-708, Korea  
e-mail: sohng@sunmoon.ac.kr

J. C. Yoo (✉)  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
e-mail: jcyu@chosun.ac.kr

## 2'-Spirocyclopropyl-carbocyclic Nucleoside as a Novel Scaffold for Potent Anti-HCV Agents

Hua Li, Jin Cheol Yoo, and Joon Hee Hong\*

BK21- Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea  
\*E-mail: hongjh@chosun.ac.kr

Received January 5, 2011, Accepted January 28, 2011

The discovery of 2'-spirocyclopropyl-ribocytidine (*J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8150-8160) as a potent inhibitor of RNA synthesis by NS5B ( $IC_{50}$  = 7.3  $\mu$ M), the RNA polymerase encoded by hepatitis C Virus (HCV), has led to the synthesis and biological evaluation of several carbocyclic versions of 2'-spirocyclopropyl-nucleosides. The cyclopentenol intermediate **7** was successfully constructed *via* ring-closing metathesis (RCM) from divinyl **6**. Spirocyclopropanation of enone **8** was effected by using (2-chloroethyl)-dimethylsulfonium iodide and potassium *tert*-butoxide to form the desired intermediate **9**. The synthesized nucleoside analogues **21-24** were assayed for their ability to inhibit HCV RNA replication in a subgenomic replicon Huh7 cell line. Among them, the cytosine nucleoside analogue **22** exhibited significant anti-HCV activity ( $EC_{50}$  = 18.2  $\mu$ M).

**Key Words** : Anti-HCV agent, Ring-closing metathesis, 2'-Spirocarbocyclic nucleoside

### Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatoma carcinoma.<sup>1</sup> However, there is no effective chemotherapy for the treatment of HCV infection except immunotherapy using ribavirin in combination with interferon- $\alpha$ , which leads to a sustained virological response in only about half of the patients treated.<sup>2</sup>

To date, despite extensive exploration of many novel scaffolds,<sup>3</sup> including carbocyclic derivatives,<sup>4</sup> only two different classes of potent HCV nucleosides have progressed. The first such class of HCV nucleoside inhibitors (NIs) encompasses 2'-modified ribonucleoside derivatives, with 2'- $\beta$ -C-methyl analogues being particularly important. Among these derivatives, 2'-methylcytidine<sup>5</sup> **1** and 2'-methyl-2'-fluoro-

cytidine<sup>6</sup> **2** led to the most promising HCV NIs (Figure 1). Through further modification of these derivatives, 2'-deoxy-2'-spirocyclopropylcytidine<sup>7</sup> **3** was discovered as a new member of the class of 2'-modified nucleoside derivatives that have HCV inhibiting properties. Compound **3** is a novel potent ( $EC_{50}$  = 7.3 mM) and selective ( $CC_{50}$  > 98.4  $\mu$ M) inhibitor of the HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase, a clinically validated target for HCV treatment.

The 4'-modified ribonucleoside derivatives are the second distinct structural class of HCV NIs. Various substituents at the 4'-position of the sugar are accommodated by NS5B polymerase.

Modeling studies demonstrated the presence of a narrow, relatively hydrophobic 4'-pocket that can accommodate these substitutions, contributing to the observed enhancement in potency.<sup>8</sup> For example, 4'-azidocytidine<sup>9</sup> **4** showed excellent anti-HCV activity in the genotype 1b subgenomic replicon system.

Natural as well as synthetic carbocyclic nucleosides<sup>10</sup> are well known for their interesting biological activities, including antitumor and antiviral activities against a wide variety of RNA and DNA viruses. Carbocyclic nucleosides are chemically more stable and are subject to the action of the enzymes that cleave the glycosyl linkage in conventional nucleosides.

### Result and Discussion

On the basis of these findings that 2'- or 4'-modified ribonucleoside derivatives exhibited excellent anti-HCV activities, we have synthesized novel classes of nucleosides comprising 4'-methyl-2'-spirocyclopropyl carbocyclic nucleoside analogues. The target compounds were prepared as shown in Scheme 1 from the key starting material **5**, which was readily synthesized according to our previous published

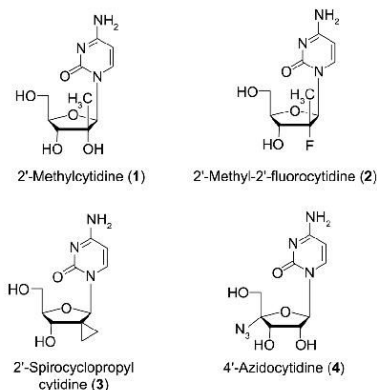


Figure 1. Structures of potent anti-HCV agents.

## Synthesis and Some Properties of 4'-Phenyl-5'-Norcarbocyclic Adenosine Phosphonic Acid Analogues

Lian Jin Liu, Eunae Kim, and Joon Hee Hong\*

BK-21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea. \*E-mail: hongjh@chosun.ac.kr  
Received January 18, 2011, Accepted February 21, 2011

Steric and electronic parameters of 4'-substituents play significant roles in steering the conformation of nucleoside analogues. In order to investigate the relationship of 4'-substituent with antiviral enhancement, novel 4'-phenyl-5'-norcarbocyclic adenosine phosphonic acid analogues were racemically synthesized *via de novo* acyclic stereoselective route from propionaldehyde **5**. The phenyl substituted cyclopentenols **15a** and **15b** as key intermediates were successfully constructed *via* reiterative carbonyl addition of Grignard reagents and ring-closing metathesis of corresponding divinyl **14**. The synthesized nucleoside phosphonic acids analogues **19**, **20**, **21**, and **23** were subjected to antiviral screening against HIV-1.

**Key Words** : Anti-HIV agent, 4'-Branched nucleoside, 5'-Norcarbocyclic nucleoside phosphonic acid

### Introduction

The development of new effective antiviral agent is essential for overcoming viral diseases, such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) caused by human immunodeficiency virus (HIV). Recently, several branched nucleosides<sup>1</sup> have been synthesized and evaluated as potent antiviral agents. Among them, 4'-ethynylthymidine (**1**)<sup>2</sup> and 4'-vinylthymidine (**2**)<sup>3</sup> which have an additional triple or double bond at the 4'-position, were reported to have potent anti-HIV activities (Fig. 1). Molecular modeling studies demonstrated the presence of a relatively hydrophobic 4'-pocket that can accommodate these substitutions, contributes to the observed enhancement in potency.<sup>4</sup>

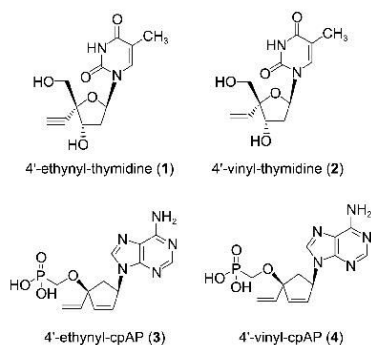
5'-Norcarbocyclic nucleoside phosphonic acid analogues such as 4'-ethynyl-cpAP (**3**) and 4'-vinyl-cpAP (**4**)<sup>4</sup> have encouraged the search for novel nucleosides in this class of compounds (Fig. 1).<sup>5</sup> The phosphonate has certain advantages over its phosphate counterpart as it is metabolically

stable because its phosphorus-carbon bond is not susceptible to hydrolytic cleavage.<sup>6</sup> Moreover, a phosphonate nucleoside analogue can skip the requisite first phosphorylation, which is a crucial step for the activation of nucleosides. This is frequently a limiting event in the phosphorylation sequence, which ultimately leads to triphosphates.<sup>7</sup> The spacial location of the oxygen atom, namely the  $\beta$ -position from the phosphorus atom in the nucleoside analogue, has been demonstrated to play a critical role for antiviral activity. This oxygen atom for antiviral activity may be attributed to the increased binding capacity of the phosphonate analogues to target enzymes.<sup>8</sup>

Actually, the exact role of substituent in 4'-position in nucleoside analogues in inhibiting reverse transcriptase (RT) has not been explored clearly. In continuation of our effort to find more detailed structure activity relationship of branched nucleoside as RT inhibitor, we have designed and prepared a novel class of nucleosides comprising branched-5'-norcarbocyclic phosphonic acid analogues bearing phenyl group which has bigger van der Waals radius than ethynyl or ethenyl functional group.

As shown in Scheme 1, the target compounds were prepared from protected propionaldehyde, **5**, which was readily synthesized from 1,3-propanediol using known procedure.<sup>9</sup> The aldehyde functional group of **5** was subjected to carbonyl addition reaction by phenylmagnesium bromide to give the secondary alcohol **6**, which was subjected to oxidation condition using Corey-Kim's oxidation procedure<sup>10</sup> to provide corresponding ketone derivative **7**. The ketone functional group of **7** was again subjected to addition reaction by vinylmagnesium bromide to give tertiary hydroxyl analogue **8**.

In order to differentiate the two hydroxyl groups, the silicon protection group of the primary hydroxyl was replaced with a benzoyl group by sequential desilylation and benzylation to provide **10**. Silylation of the tertiary hydroxyl group of **10** was successfully accomplished using *t*-



**Figure 1.** Structures of 4'-branched nucleoside analogues as potent anti-HIV agents.



## The Prolyl Isomerase Pin1 Induces LC-3 Expression and Mediates Tamoxifen Resistance in Breast Cancer\*

Received for publication, December 7, 2009, and in revised form, May 15, 2010. Published, JBC Papers in Press, May 17, 2010, DOI 10.1074/jbc.M109.092874.

Gwang Mo Namgoong<sup>1,†</sup>, Prem Khanal<sup>1,†</sup>, Hae-Guk Cho<sup>2</sup>, Sung-Chul Lim<sup>3</sup>, Yoon Kyeong Oh<sup>4</sup>, Bong Seok Kang<sup>1,||</sup>, Jeong-Hyun Shim<sup>\*\*</sup>, Jin-Cheol Yoo<sup>3</sup>, and Hong Seok Choi<sup>1,2</sup>

From the <sup>1</sup>BK21 Project Team, College of Pharmacy, and the Departments of <sup>2</sup>Pathology and <sup>3</sup>Radiation Oncology, School of Medicine, Chosun University, Gwangju 501-759, the <sup>4</sup>Bio-Medical Research Institute, Kyungpook National University Hospital, Daegu 702-701, and the <sup>\*\*</sup>School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, South Korea

Endocrine therapies, which inhibit estrogen receptor signaling, are the most common and effective treatments for estrogen receptor- $\alpha$ -positive breast cancer. However, the utility of these agents is limited by the frequent development of resistance, and the precise mechanisms underlying endocrine therapy resistance remain incompletely understood. Here, we demonstrate that peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is an important determinant of resistance to tamoxifen and show that Pin1 increases E2F-4- and Egr-1-driven expression of LC-3 as a result of an increased interaction with and phosphorylation of MEK1/2. In human tamoxifen-resistant breast cancer, our results show a significant correlation between Pin1 overexpression and high levels of LC-3. Promoter activity as well as expression levels of Pin1 were drastically higher in tamoxifen-resistant MCF7 cells than control MCF7 cells, as were levels of LC-3 mRNA and protein, an autophagy marker. *Pin1*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts showed lower 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced MEK1/2 phosphorylation than *Pin1*<sup>+/+</sup> mouse embryonic fibroblasts. Silencing of Pin1 expression inhibited TPA-induced MEK1/2 phosphorylation in MCF7 cells. Moreover, PD98059, a specific inhibitor of MEK1/2, and juglone, a potent Pin1 inhibitor, significantly suppressed the TPA-induced expression of E2F-4 as well as Egr-1 transcription factors, which control LC-3 gene expression. Importantly, 4-hydroxy tamoxifen, when used in combination with silencing of *Pin1* or LC-3, increased cleaved poly(ADP-ribose) polymerase and DNA fragmentation to inhibit cologenic growth of MCF7 cells. We therefore link the Pin1-MEK pathway and LC-3-mediated tamoxifen resistance and show the therapeutic potential of Pin1 in the treatment of tamoxifen-resistant breast cancer.

Breast cancer is one of the most common malignancies in women and the second most common cause of female cancer-related deaths (1). However, deaths due to breast cancer have decreased because of the development of targeted therapies, including hormone therapy, in addition to conventional chemotherapy and surgical interventions (1). The majority of breast cancers in postmenopausal women express the estrogen recep-

tors (ERs),<sup>3</sup> and after surgery, they can be treated with hormonal therapy alone, in the absence of more toxic chemotherapy, resulting in a relatively favorable prognosis (2). However, a significant fraction of these hormone-sensitive breast cancer patients will experience disease progression because of resistance to endocrine agents, such as tamoxifen, resulting in mortality (3). Tamoxifen is currently the most widely prescribed, orally active, selective ER modulator for the treatment of breast cancer (4). Although tamoxifen is an ER antagonist in breast tissue, it can also be a partial agonist. Antagonist activity enables the drug to block ER-mediated transcription and cancer cell growth in ER-positive breast cancer cells (5). However, tamoxifen resistance might occur when its agonistic activity overcomes its antagonistic effect (4). This variability could be related, in part, to the cellular milieu of ER co-activators and co-repressors (6). For example, increased levels of co-activators, such as SRC-3, enhance the estrogen agonist properties of tamoxifen, whereas decreased levels of co-repressors, such as SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid receptors) and nuclear receptor corepressor, correlate with acquired tamoxifen resistance (6).

Pin1 has two domains: a peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase domain at its COOH terminus responsible for isomerization and a WW domain at the NH<sub>2</sub> terminus, which functions as a binding element specific for Ser(P)/Thr-Pro motifs (7). Through these two domains, Pin1 binds to and isomerizes specific Ser(P)/Thr-Pro motifs and catalytically induces conformational changes after phosphorylation (7). Recently, Stanya *et al.* (8) showed that CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)-mediated phosphorylation of SMRT, an ER co-repressor, creates a binding site for Pin1 peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase, which in turn induces conformational changes to promote SMRT degradation. Moreover, this event mediates human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2)-dependent SMRT protein degradation and resultant endocrine resistance (8). These findings help elucidate the molecular mechanism of ER regulation

<sup>3</sup> The abbreviations used are: ER, estrogen receptor; SMRT, silencing mediator for retinoid and thyroid receptors; MEF, mouse embryonic fibroblast; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAPK/ERK kinase; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; siRNA, small interfering RNA; MSCV, murine stem cell virus; GFP, green fluorescent protein; RT-PCR, reverse transcription-PCR; GST, glutathione S-transferase; HA, hemagglutinin, 4-OH, 4-hydroxy.

\* This work was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea funded by the Ministry of Education, Science, and Technology (Grant 2009-0066056).

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>||</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 82-62-230-6379; Fax: 82-62-222-5414; E-mail: chs@chosun.ac.kr.



## Functional characterization of KanP, a methyltransferase from the kanamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces kanamyceticus*

Keshav Kumar Nepal<sup>a</sup>, Jin Cheol Yoo<sup>b</sup>, Jae Kyung Sohng<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biomolecule Reconstruction (IBR), Department of Pharmaceutical Engineering, SunMoon University, #100, Kalsan-ri, Tangjeong-myeon, Asan-si, Chungnam 336-708, Republic of Korea

<sup>b</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Received 16 September 2009; received in revised form 12 October 2009; accepted 5 November 2009

### KEYWORDS

Cryptic gene;  
Methylated quercetin;  
O-Methyltransferase;  
S-adenosyl-L-methionine (SAM);  
*Streptomyces kanamyceticus*

### Summary

KanP, a putative methyltransferase, is located in the kanamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces kanamyceticus* ATCC12853. Amino acid sequence analysis of KanP revealed the presence of S-adenosyl-L-methionine binding motifs, which are present in other O-methyltransferases. The *kanP* gene was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) to generate the *E. coli* KANP recombinant strain. The conversion of external quercetin to methylated quercetin in the culture extract of *E. coli* KANP proved the function of *kanP* as S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase. This is the first report concerning the identification of an O-methyltransferase gene from the kanamycin gene cluster. The resistant activity assay and RT-PCR analysis demonstrated the leeway for obtaining methylated kanamycin derivatives from the wild-type strain of kanamycin producer.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Aminoglycosides are natural or semisynthetic broad-spectrum bactericidal compounds consisting of a central six-membered amino cyclitol ring linked

to two or more deoxy-amino sugars by glycosidic linkage. These antibiotics were among the first antibiotics discovered and are clinically used in the treatment of severe Gram-positive and Gram-negative bacterial infections (Hegde et al., 2001).

Kanamycin produced by *Streptomyces kanamyceticus* was described by Okami and Umezana as early as 1957 (Puius et al., 2006). The biosynthetic gene cluster for kanamycin was recently

\*Corresponding author. Tel.: +82 41 530 2246;

fax: +82 41 544 2919.

E-mail address: [sohng@sunmoon.ac.kr](mailto:sohng@sunmoon.ac.kr) (J. Kyung Sohng).

## A New Thermolabile Alkaline Phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS628

Jaya Ram Simkhada, Seung Sik Cho, Hong Seok Choi, Si Wouk Kim, Hei Chan Lee, Jae Kyung Sohng, and Jin Cheol Yoo

Received: 18 January 2010 / Revised: 1 March 2010 / Accepted: 2 March 2010  
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2010

**Abstract** A phospholipase D (PLD<sub>628</sub>), constitutively secreted by *Streptomyces* sp. CS628, was purified by ion exchange with CM Trisacryl and gel filtration with Sepharose CL-6B. The enzyme production was highest with peptone and starch as nitrogen and carbon sources, and at 30°C with an initial medium pH of 7.5. Molecular weight, optimum pH, optimum temperature, pH stability, and thermostability of the enzyme were 50 kDa, pH 9.6, 30°C, pH 5.7 ~ 10.6 and  $\leq 30^\circ\text{C}$ , respectively. Detergents and metal ions had varied effects on the enzyme activity. Importantly, PLD<sub>628</sub> could not catalyze transphosphatidylation of glycerol, L-serine, *myo*-inositol or ethanolamine, which are extensively used to assess the activity, suggesting that PLD<sub>628</sub> lacks the transphosphatidylation activity. PLD<sub>628</sub> could be a novel PLD based on its biochemical characteristics, which are significantly different from previously reported PLDs, such as thermolability, highest activity at alkaline pH, and lack of transphosphatidylation activity.

**Keywords:** thermolabile alkaline phospholipase D, *Streptomyces* sp. CS628

### 1. Introduction

Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4) is a member of the PLD superfamily, which includes mammalian, plant, and bacterial PLDs, bacterial phosphatidylserine and cardiolipin synthases, endonucleases, Yersinia murine toxin, poxvirus envelope proteins, and a human tyrosyl-DNA phosphodiesterase [1,2]. The enzyme activities have been detected from simple organisms, such as viruses and bacteria, to complex organism yeasts, plants, and mammals. In mammalian cells, it has been reported from most cell types, with the exception of leukocytes and a few lymphocyte lines [3]. So far, more than 1,000 entries on PLD genes have been reported in Gene Bank (NCBI) [4]. Although a large number of PLD enzymes ranging from 16 to 195 kDa have been reported thus far, only a few of them were obtained in pure state. Moreover, primary structures of only approximately 38 plant, 12 microbial, and 8 mammalian PLDs have been elucidated and the tertiary structures of only *Streptomyces* sp. PMF and *Streptomyces antibioticus* PLDs have been revealed to date [5-7].

Most PLDs generally catalyze two types of reactions: hydrolysis of phospholipids that release phosphatidic acid (PA) and a free alcohol, and transphosphatidylation (T) of phosphatidyl groups to various phosphatidyl alcohols in the presence of an appropriate alcohol. The enzyme is industrially important because of its transesterification ability. However, some PLD enzymes lacking the T-activity have also been reported [8,9]. PLDs are believed to play a crucial role in the regulation of various cell functions, such as transmembrane signaling, intracellular protein trafficking, secretion, alteration in cell morphology, and motility [10]. Although the enzymatic properties and underlying physiological functions are not clear, these enzymes in

Jaya Ram Simkhada, Seung Sik Cho, Hong Seok Choi, Jin Cheol Yoo\*  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University,  
Gwangju 501-759, Korea  
Tel: +82-62-230-6380; Fax: +82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

Si Wouk Kim  
Department of Environmental Engineering, BK 21 Team for Biohydrogen  
Production, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Hei Chan Lee, Jae Kyung Sohng  
Institute of Biomolecule Reconstruction, Sun Moon University, Asan 336-  
708, Korea





NOTE

## Biosynthetic approach for the production of new aminoglycoside derivative

Keshav Kumar Nepal,<sup>1</sup> Jin Cheol Yoo,<sup>2</sup> and Jae Kyung Sohng<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, SunMoon University, # 100, Kalsan-ri, Tangjeong-myeon, Asan-si, Chungnam 336-708, Republic of Korea<sup>1</sup> and  
<sup>2</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea<sup>2</sup>

Received 25 November 2009; accepted 4 January 2010  
Available online 4 February 2010

**Aminoglycoside antibiotics can be classified into two major groups; streptomycin containing and 2-deoxystreptomycin containing antibiotics. Here, we report a biosynthetic approach for the fusion of spectinomycin and kanamycin biosynthetic gene clusters to yield the new aminoglycoside derivative, oxykanamycin C, in a non-aminoglycoside producing heterologous host.**

© 2010, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.

[**Key words:** Aminoglycoside; Heterologous host; Kanamycin; Oxykanamycin; *Streptomyces kanamyceticus*]

Aminoglycosides can be classified into two major groups. The first group contains those aminoglycosides that are biosynthesized from myo-inositol such as streptomycin, fortimicin, spectinomycin etc. The other group has a common aglycone of 2-deoxystreptomycin (DOS), and includes gentamicin, kanamycin, tobramycin, butirosin, sisomicin etc. Genetic and enzymological studies have been performed successfully for the biosynthesis of the former class of antibiotics but not for the latter class of antibiotics except neomycin and butirosin (1, 2). Thus, the information on aminoglycoside biosynthesis is still inadequate for application in combinatorial biosynthesis.

Kanamycin A, kanamycin B and kanamycin C are three variants of kanamycin in which 2-DOS is substituted at the C-4 position by an aminoglucose functionality, 6-amino-6-deoxy-D-glucose, neosamine, and D-glucosamine, respectively, and at the C-6 position by 3-amino-3-deoxy-D-glucose (kanosamine) (Fig. 1A). In recent years, the biosynthetic gene cluster for kanamycin, gentamicin and tobramycin have been cloned from the respective producing organisms, *S. kanamyceticus*, *M. echinospora* and *S. tenebrarius*, however biochemical studies are limited (3–9).

Structurally, spectinomycin is a spectinamine containing pseudo-disaccharide composed of an aminocyclitol monomer (actinamine) and a glucose-6-phosphate derived sugar moiety (actinospectose) that is produced by *S. spectabilis* and *S. flavosporius*. It is active against a wide variety of Gram positive and Gram negative organisms. Genetic and biochemical studies of spectinomycin have just begun with the isolation of biosynthetic gene clusters and characterization of some of the genes (10, 11).

The biosynthesis of kanamycin and spectinomycin antibiotics occurred from two genetically diverse lines. Our previous study

showed that three genes, *spcA*, *spcB* and *spcS2* were responsible for the formation of streptomycin (11). The biosynthetic pathway up to paromamine in kanamycin biosynthesis has been demonstrated where KanF transfers 2-N-acetylglucosamine to 2-DOS to give 2-N-acetylparomamine whereas KacA acts as a deacetylase that removes the acetyl group to give the final paromamine (6). NDP-D-kanosamine is the common amino sugar moiety in all forms of kanamycin and its biosynthesis is believed to proceed from UDP-D-glucose with the involvement of KanC and KanD acting as a dehydrogenase and aminotransferase respectively (9). *In silico* analysis of KanC with other homology genes revealed the presence of GGXXAXXA motifs; thus, this enzyme is believed to be a dehydrogenase. The primary structures of sugar aminotransferases display a high degree of similarity in length and have four highly conserved regions: motif I, motif II, motif III and motif IV (13). Almost all of these motifs were also conserved in KanD (data not shown). The involvement of KanF in paromamine biosynthesis (6) showed KanE is the single candidate that transfers this amino sugar to paromamine or neamine to produce kanamycin derivatives. Based on our previous results on kanamycin and spectinomycin and sequence analysis of KanC and KanD, the biosynthetic pathway of oxykanamycin C has been proposed (Fig. 1B).

Because different aminoglycosides have been produced using the aminoglycoside deficit host as a heterologous host, combining of two different aminoglycosides gene clusters to obtain novel aminoglycoside derivatives has not yet been performed. As a part of our ongoing work on aminoglycosides, we report a new biosynthetic approach to produce novel bioactive aminoglycosides i.e. oxykanamycin C, through the combination of spectinomycin and kanamycin biosynthetic gene clusters.

Two recombinant plasmids, pSK-25 and pSK-28, were constructed using pIBR25 (6) and pSE34 (14) vectors, respectively. Three genes *spcA*, *spcB* and *spcS2* from the spectinomycin gene

\* Corresponding author. Tel.: +82 41 530 2246; fax: +82 41 544 2919.  
E-mail address: sohng@sunmoon.ac.kr (J.K. Sohng).



## An Oxidant- and Organic Solvent-Resistant Alkaline Metalloprotease from *Streptomyces olivochromogenes*

Jaya Ram Simkhada · Seung Sik Cho · Seong Ju Park ·  
Poonam Mander · Yun Hee Choi · Hyo Jeong Lee ·  
Jin Cheol Yoo

Received: 4 November 2009 / Accepted: 1 February 2010 /  
Published online: 1 March 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** Organic solvent- and detergent-resistant proteases are important from an industrial viewpoint. However, they have been less frequently reported and only few of them are from actinomycetes. A metalloprotease from *Streptomyces olivochromogenes* (SOMP) was purified by ion exchange with Poros HQ and gel filtration with Sepharose CL-6B. Apparent molecular mass of the enzyme was estimated to be 51 kDa by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and gelatin zymography. The activity was optimum at pH 7.5 and 50 °C and stable between pH 7.0 and 10.0. SOMP was stable below 45 °C and Ca<sup>2+</sup> increased its thermostability. Ca<sup>2+</sup> enhanced while Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Fe<sup>2+</sup> inhibited the activity. Ethylenediaminetetraacetic acid and ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, but not phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, and pefabloc SC, significantly suppressed the activity, suggesting that it might be a metalloprotease. Importantly, it is highly resistant against various detergents, organic solvents, and oxidizing agents, and the activity is enhanced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The enzyme could be a novel protease based on its origin and peculiar biochemical properties. It may be useful in biotechnological applications especially for organic solvent-based enzymatic synthesis.

**Keywords** Oxidant and solvent resistant · Metalloprotease · *Streptomyces olivochromogenes*


### Introduction

Demand for biocatalysts able to cope with industrial process conditions is insatiably increasing, and continuous efforts have been focused for the search of such enzymes.

---

J. R. Simkhada · S. S. Cho · S. J. Park · P. Mander · Y. H. Choi · J. C. Yoo (✉)  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu,  
Gwangju 501-759, Korea  
e-mail: jcyu@chosun.ac.kr

H. J. Lee  
Department of Complementary and Alternative Therapy, College of Management,  
Commerce and Social Welfare, Gwangju University, Gwangju 503-703, Korea

 Humana Press

## Synthesis of SATE Prodrug of 6'-Fluoro-6'-methyl-5'-noradenosine Nucleoside Phosphonic Acid as a New Class of Anti-HIV Agent

Hua Li, Jin Cheol Yoo, Young Chan Baik,<sup>†</sup> Wonjae Lee, and Joon Hee Hong\*

BK21- Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea. \*E-mail: hongjh@chosun.ac.kr

<sup>†</sup>Hawon Pharmaceuticals Co., Pyeongtaeksi, Gyeonggido, Korea

Received June 23, 2010, Accepted July 15, 2010

A very simple synthetic route of a novel SATE prodrug type of 6'-fluoro-6'-methyl-5'-noradenosine carbocyclic nucleoside phosphonic acid is described. The key fluorinated alcohol intermediate **7** was prepared from the epoxide intermediate **6a** via selective ring-opening of epoxide. Coupling of **7** with *N*'-bis-Boc-adenine under a Mitsunobu reaction followed by phosphonation and deprotection afforded the carbocyclic phosphonic acid. The chemical stability of the bis(SATE) derivative **13** was measured at neutral (pH 7.2) and slightly acidic (Milli-Q water, pH 5.5) pH. The antiviral activity test of the SATE prodrug **13** and its parent nucleoside phosphonic acid **11** were evaluated against HIV-1.

**Key Words:** Anti-HIV agent, SATE prodrug, Nucleoside phosphonic acid, Mitsunobu reaction

### Introduction

Carbocyclic nucleosides<sup>1</sup> are a group of compounds structurally analogous to natural and synthetic nucleosides in which the furanose oxygen has been replaced by a methylene group. This replacement changes the furanose ring into a cyclopentane. The expected similarity in bond lengths and bond angles of the tetrahydrofuran and cyclopentane rings allows these analogues to behave as substrates or inhibitors of the enzymes in living cells. Therefore, the carbocyclic nucleosides possess a wide range of biological activities such as antiviral and antitumor effects.

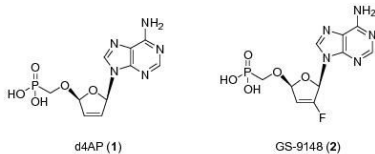
Although the pharmacophore of nucleoside antiviral activity is not completely defined, structurally modified 5'-normucleoside phosphonic acids such as d4AP (**1**, EC<sub>50</sub> = 2.1 μM, CC<sub>50</sub> = > 100 μM)<sup>2</sup> and 2'-Fd4AP (**2**, GS-9148, EC<sub>50</sub> = 10.6 μM, CC<sub>50</sub> = > 100 μM)<sup>3</sup> possess potent activity against viruses with a low level of toxicity (Figure 1). Unlike nucleoside agents, a phosphonic acid nucleoside can skip the requisite initial phosphorylation, which is the crucial step for the activation of nucleosides.<sup>4</sup> However, poor oral bioavailability of these nucleoside analogues results from the phosphonate negative charges present in nucleoside phosphonic acid at physiological pH. One strategy has been to temporarily mask these charges with neutral groups to form more lipophilic derivatives capable of crossing the gastrointestinal wall and reverting back to the parent nucleoside phosphonic acid.<sup>5</sup> Because the ionic character of a phos-

phonic acid presents an obstacle for cellular permeability, an *S*-acyl-2-thioethyl (SATE) prodrug was prepared. Esterification of a phosphonic acid with two SATE groups is a feasible strategy to deliver a phosphate or phosphonate drug into cells.<sup>6</sup> Usually, phosphonic acid nucleosides require an endocytosis-like process<sup>7</sup> or the ATP membrane receptor to cross the cell membrane.<sup>8</sup>

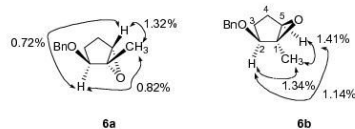
We therefore applied the bis(SATE) approach to a novel carbocyclic nucleoside phosphonic acid. Herein, we synthesized a novel SATE prodrug of 6'-fluoro-6'-methyl-5'-norcarbocyclic adenosine nucleoside to find new lead compounds with improved antiviral activity.

### Results and Discussion

As depicted in Scheme 1, we used the cyclopentenone intermediate **3** as commercially available starting material. When **3** was subjected to Luche's reduction conditions (NaBH<sub>4</sub>/CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O),<sup>9</sup> the allylic alcohol derivative **4** was obtained. The hydroxy functional group was protected with a benzyl group under the usual benzylation conditions (BnBr, NaH, DMF) to provide an intermediate **5**, which was epoxidized with *m*-chloroperoxybenzoic acid to give **6a** (55%) as the major isomer compared to minor isomer **6b** (22%). As shown in Figure 2, the relative stereochemistry of **6a** and **6b** were unambiguously determined on the basis of the NOE correlations. On irradiation of C<sub>2</sub>-H, NOE was observed at C<sub>5</sub>-H (0.72%) and C<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub> (0.82%) of **6a**, but also at C<sub>5</sub>-H (1.14%) and C<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub> (1.34%) of **6b**. This



**Figure 1.** Structures of 5'-normucleoside analogues as potent anti-HIV agents.



**Figure 2.** NOE percentage differences of isomers **6a** and **6b**.

## ORIGINAL ARTICLE

**Identification of the duplicated genes for  
S-adenosyl-L-methionine synthetase (*metK1-sp* and  
*metK2-sp*) in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*  
ATCC 27952**

T.-J. Oh, N.P. Niraula, K. Liou and J.K. Sohng

Institute of Biomolecule Reconstruction (IBR), Department of Pharmaceutical Engineering, Sun Moon University, Tangjeong-myeon, Asansi, Chungnam, Republic of Korea

**Keywords**doxorubicin, duplicated gene, S-adenosyl-L-methionine synthetase, secondary metabolism, *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952.**Correspondence**

Jae Kyung Sohng, Institute of Biomolecule Reconstruction (IBR), Department of Pharmaceutical Engineering, Sun Moon University, #100, Kalsan-ri, Tangjeong-myeon, Asansi, Chungnam 336-708, Republic of Korea. E-mail: sohng@sunmoon.ac.kr

2009/0968: received 2 June 2009, revised and accepted 23 November 2009

doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04688.x

**Abstract****Aims:** To characterize the function of both *metK1-sp* (*sp1190*) and *metK2-sp* (*sp1566*) *in vitro* and *in vivo*, and to study the regulation of doxorubicin production by overexpressing the *metK*.**Methods and Results:** We cloned two *orfs* into pET32a(+) respectively, and the formation of S-Adenosyl-L-methionine was clearly observed in the *in vitro* enzyme assays as functional MetKs. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) analysis indicated that the transcripts for the *metK1-sp* were repressed as *Streptomyces* cells entered the decline phase, whereas that of the *metK2-sp* was induced, suggesting that these MetK proteins may be important for the growth and the regulation of secondary metabolites during the stationary growth phase, whether considered together or separately. Furthermore, we found that the introduction of high-copy-number plasmids containing the *metK1-sp* and *metK2-sp* resulted in 2.1- and 1.4-fold greater levels of doxorubicin production than the control transformants containing only the vector, respectively. We also attempted to disrupt the *metK-sp* and found that doxorubicin production from the *metK1-sp*-deleted mutant (*Streptomyces peucetius/pNN1*) was reduced when compared to the parent strain (*S. peucetius* var. *caesius* ATCC 27952).**Conclusions:** The results of this study indicated that two *metK* are differentially expressed during cell growth, and that the expressions of the two *metK* genes are differentially regulated under the same conditions.**Significance and Impact of the Study:** *Streptomyces peucetius* var. *caesius* contains two genes, *metK1-sp* and *metK2-sp*, which encode functional S-adenosyl-L-methionine synthetase (MetK). The degree of homology (90% identity) found between the two genes shows that *metK1-sp* and *metK2-sp* are duplicated genes. Although there is currently no evidence for the relationship of the duplicated *metK* genes involved in the regulation of doxorubicin production, *metK1-sp* and *metK2-sp* may play a role in controlling the stimulation of antibiotic production during secondary metabolism.**Introduction**

S-Adenosyl-L-methionine (SAM) is most commonly used in living systems as a methyl donor involved in methyl-

ation reactions. Previous studies have shown that SAM plays a central role in cellular metabolism *via* its involvement in various methylating reactions of proteins, nucleic acids, lipids and polysaccharides. SAM also plays the role

## Effects of CS682, a Fermentation Product of Korean Soil Bacteria, on Growth Performance in Chickens and Pigs

Hu Kyung Kim, Se Eun Kim<sup>1</sup>, Kyung Mi Shim<sup>2</sup>, Jong-Choon Kim<sup>1</sup>, Chun-Sik Bae<sup>1</sup>, Seok Hwa Choi<sup>3</sup> and Seong Soo Kang<sup>1\*</sup>

Livestock and Veterinary Service, Suwon, Gyeonggi do, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Department of Radiology, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Received November 26, 2009 / Accepted January 13, 2010

Antibiotics in veterinary medicine have been used to treat disease, promote growth rate and improve feed efficiency. However, alternative sources are needed because of bacterial resistance to antibiotics and residues of antibiotics. The present study was carried out to evaluate the effect of CS682, a fermentation product of Korean soil bacteria, on safety, growth rate and feed efficiency, and to evaluate its value as an alternative for antibiotics used as a feed additive. Two dosages of CS682 (0.1% and 1%) were fed to chickens for 28 days. The results showed that, when compared to chickens in the control group, growth and feed efficiency was improved. Also, mortality, hematology, general clinical signs and necropsy were examined. Chickens in the treatment groups showed no adverse effects. A total of 72 weaning pigs were used to confirm the effects of CS682 at one dose level (0.1%) regarding feed efficiency. Supplementation with 0.1% CS682 also resulted in improved weight gain and feed efficiency ratio. Based on these results, CS682 may be effective in improving feed efficiency safely as a feed additive.

**Key words :** Growth promoter, CS682, chicken, pig

### 서 론

최근 경제성장과 삶의 질 개선으로 식품산업이 비약적으로 발전하고 있으며, 고급 축산물에 대한 수요 증가로 축산업과 동물식품 산업이 급성장하고 있는 추세이다. 2008년 통계자료에 따르면, 국내에서는 약 290만 마리의 소와 10,300만 마리의 닭, 그리고 930만 마리의 돼지가 사육되고 있으며[21], 미국에서는 소가 약 10,400-11,000만 마리, 닭이 약 75-86억 마리, 돼지가 약 6,000-9,200만 마리, 그리고 칠면조가 약 27,500-29,200만 마리 사육되고 있다[2,24]. 현대 축산업이 경제성 극대화를 추구하는 대규모 집약적 사육 형태로 되어감에 따라 질병에 대한 노출 가능성과 질병 전파의 위험성 또한 더욱 높아지게 되었으며, 이러한 이유에서 질병의 예방과 치료를 위해 사육 환경의 개선보다는 사료 내 항생제의 첨가나 백신 접종 등의 방법이 사용되어 왔다.

1928년 플레밍(Alexander Fleming)에 의해 발견된 항생제는 항균활성을 나타내는 천연 또는 합성 화학물질을 말하며, 질병치료와 성장촉진 및 사료효율 개선을 목적으로 동물에 사용하고 있다[1,18]. 일반적으로 돼지 사육에서는 질병예방과 성장촉진 목적으로 치료농도 이하(subtherapeutic levels)의

수준으로 항생제를 사료에 첨가하여 급여하고 있다. Dewey 등[8,9]에 따르면, 돼지의 자돈사료에서 90% 이상, 성장기 사료에서 75% 이상, 그리고 비육돈 사료에서 50% 이상이 항생제를 포함하고 있다고 보고하고 있다. 돼지에서 항생제의 사료 내 급여는 3.3-8.8%의 체중증가와 7%의 사료효율 개선을 나타내어 치료농도 이하의 항생제는 가족의 성장과 건강에 유용하다고 인식되어 왔다[7,10].

그러나 항생제 내성균 발생 및 축산물 내 항생제 잔류로 인한 인체로의 전이와 같은 문제점이 부각되면서 국내의적으로 항생제의 사용을 엄격하게 규제하고 있다. 따라서 최근 이를 대신할 수 있는 대체물질에 대한 연구가 광범위하게 이루어지고 있다. 항생제를 대신할 수 있는 대체물질로는 생균제, 효소제, 유기산, 올리고당, 항산화제 및 기타 기능성 물질들이 있다. 그 중 생균제는 살아있는 유익한 미생물을 함유한 제제로서 동물의 장내에 정착하여 다른 병원성 미생물과 경쟁적 배제를 통해 유해 미생물의 성장을 억제하고 섭취한 사료의 소화와 흡수를 도와줌으로써 동물의 성장을 촉진하고 사료효율을 증가시켜 주는 약제로 알려져 있고, 이는 생균, 사균 및 발효물을 포함한다[22].

본 연구에서 사용된 시험 물질인 CS682는 조선대학교에서 개발한 국내 토양미생물인 *Norcardia* sp. CS682의 액상 발효액을 동결건조 후 성장, 물성개선 및 제품함량을 고려하여 육수 수전분을 첨가하여 분말로 만든 물질이다. 약리학적 시험결

\*Corresponding author

Tel : +82-62-530-2877, Fax : +82-62-530-2809

E-mail : vetkang@chonnam.ac.kr

## 방선균(*Nocardia* sp. CS682) 발효물의 급여가 산란계의 생산성, 혈액성상, 면역글로불린 및 소장내 미생물 함량에 미치는 영향

이아름<sup>1</sup> · 신동훈<sup>1</sup> · 김찬호<sup>1</sup> · 정병윤<sup>2</sup> · 유진철<sup>3</sup> · 홍영호<sup>1</sup> · 백인기<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 동물생명공학과, <sup>2</sup>Department of Poultry Science, The University of Georgia, <sup>3</sup>조선대학교 약학대학

### Effect of Supplementary *Actinomycetes* (*Nocardia* sp. CS682) Ferment on the Laying Performance, Blood Parameters, Immunoglobulin and Small Intestinal Microflora Contents in Laying Hens

Ah Reum Rhee<sup>1</sup>, Dong Hun Shin<sup>1</sup>, Chan Ho Kim<sup>1</sup>, Byoung Yun Jung<sup>2</sup>, Jin Chul Yoo<sup>3</sup>, Young Ho Hong<sup>1</sup> and In Kee Paik<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

<sup>2</sup>Department of Poultry Science, The University of Georgia, GA 30602, USA

<sup>3</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

**ABSTRACT** This study was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of CS682, a fermentation product of *Actinomycetaceae*(*Nocardia* sp. CS682), and its commercial product DSC682<sup>®</sup> on the performance, blood parameters, intestinal microflora, and immune response in laying hens. Hy-Line Brown<sup>®</sup> laying hens were housed in two bird cages. Feeding trial lasted 5 wk under 16.5 h:7.5 h(L:D) lighting regimen. In Exp.1, a total of 480 birds of 86 wk old were assigned to four dietary treatments: Control, Antibiotics (6 ppm avilamycin), CS682-0.1 (CS682 0.1%) and CS682-1.0 (CS682 1.0% supplementation). Each treatment was replicated five times with 24 birds (or 12 cages) per replication. In Exp. 2, a total of 1,000 birds of 26 wk old were assigned to five dietary treatments: Control, Antibiotics (6 ppm avilamycin), DCS682-0.05 (DCS682 0.05%), DCS682-0.1 (DCS682 0.1%), DCS682-0.2 (DCS682 0.2% supplementation). Each treatment was replicated five times with 40 birds (or 20 cages) per replication. In Exp. 1, there were no significant differences among treatments in egg production, egg weight, broken & soft egg production, feed intake, and feed conversion ratio. Also, there were no significant differences among treatments in eggshell thickness, eggshell color and Haugh unit. However, eggshell strength was significantly ( $p<0.05$ ) greater in CS682 and Antibiotics treatments than Control, and egg yolk color was significantly ( $p<0.05$ ) higher in CS682-1.0 than Control. In Exp. 2, feed intake was significantly ( $p<0.05$ ) lower in DSC682-0.05 than Control. Lightness(L) of Hunter Lab color of eggshell of DCS and Antibiotics treatments was significantly ( $p<0.05$ ) lower than Control. Egg yolk color of DCS 0.1 and 0.2 treatments was significantly ( $p<0.05$ ) higher than Control. Haugh unit increased significantly ( $p<0.05$ ) in Antibiotics and DCS682-0.1 treatments. The immunoglobulin levels of plasma (IgG and IgA) and egg yolk (IgY) were not significantly affected by treatments. Antibiotics and CS682 or DCS682 treatments significantly ( $p<0.05$  or 0.01) influenced some of the erythrocytes and leukocytes parameters in blood. In Exp.1, mean corpuscular volume (MCV) decreased by CS682 treatments and mean corpuscular hemoglobin (MCH) was highest in Antibiotics treatments. In Exp.2, the level of monocyte (MO) decreased in DCS682-0.10 and 0.20 treatments. The cfu of *C. perfringens* and *S. typhimurium* in small intestinal content were highest in Control and lowest in Antibiotics in both experiments. In Exp. 2, DSC682-0.05 and -0.1 treatments were highest and Antibiotic treatment was lowest in *Lactobacilli* spp. The results of the present layer experiments indicated that supplementation of 0.1~0.2% CS682 or DCS682 may increase eggshell strength, color of eggshell and egg yolk, Haugh unit, and control harmful intestinal microbes.

(Key words : *Nocardia* sp. CS682, laying hens, eggshell strength, eggshell color, small intestinal microflora)

\* To whom correspondence should be addressed : ikpaik@cau.ac.kr





## Nargenicin enhances 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- and all-*trans* retinoic acid-induced leukemia cell differentiation via PKCβ1/MAPK pathways

Seung Hyun Kim<sup>a</sup>, Jin Cheol Yoo<sup>b,\*</sup>, Tae Sung Kim<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 4 December 2008  
Accepted 3 March 2009

Keywords:  
Nargenicin  
Cell differentiation  
1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>  
All-*trans* retinoic acid  
Protein kinase C  
Mitogen-activated protein kinase

### ABSTRACT

A major goal in the treatment of acute myeloid leukemia (AML) is to achieve terminal differentiation and prevent drug resistance and side effects. Combined treatment with low doses of ATRA or 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> that do not induce toxicity with another drug is one useful strategy for the treatment of AML. Actinomycetes are the well known sources of antibiotics and bioactive molecules. Previously, we isolated nargenicin from the culture broth of an actinomycete isolate, *Nocardia* sp. CS682. In this study, we evaluated the effects of nargenicin on cellular differentiation in a human myeloid leukemia HL-60 cell system. Nargenicin inhibited cell proliferation and induced HL-60 cell differentiation when administered in combination with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> or ATRA. In addition, western blot analyses and kinase inhibitor studies demonstrated that nargenicin primarily enhanced leukemia cell differentiation via PKCβ1/MAPK pathways. The results of this study indicate that nargenicin has the ability to induce differentiation and suggest that it may be useful for the treatment of neoplastic diseases.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The majority of leukemia cells exhibit deficiencies with regard to their capacity to mature into non-replicating adult cells and remain in a highly proliferative state, thereby resulting in their characteristic tendency to outgrow their normal cellular counterparts. The induction of terminal differentiation represents an alternative approach to the treatment of leukemia using conventional anti-neoplastic agents because cells exposed to chemical or biological inducers of cellular differentiation do not undergo the cytodestruction in response to cytotoxic agents [1–3]. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] and all-*trans* retinoic acid (ATRA) are known to induce terminal differentiation in leukemic cell lines including HL-60 and U937 cells [4]. Moreover, ATRA has been found to induce complete remission in almost all patients with acute promyelocytic leukemia (APL) via *in vivo* induction of the differentiation of APL blasts. Although ATRA can bring about complete remission in cases of APL, treatment with ATRA alone is associated with certain severe side effects, including ATRA syndrome and the induction

of secondary ATRA resistance [5,6]. Therefore, it is necessary to isolate or synthesize new anticancer drugs to overcome these limitations and improve the effectiveness of drugs used to treat leukemia [7].

Human myeloid leukemia HL-60 cells are differentiated into the monocytic lineage or granulocytic lineage when treated with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> or ATRA, respectively [8,9]. Accordingly, treatment with these compounds has been employed as a model system for studying cellular differentiation *in vitro*. In addition, vitamin D<sub>3</sub> has been shown to be one of the most potent initiators of the differentiation of HL-60 cells as well as other hematopoietic cell lines. Furthermore, vitamin D<sub>3</sub> is known to activate a variety of protein kinases including protein kinase C (PKC) [10,11], mitogen-activated protein kinase (MAPK) [12] and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) [13,14], which are significantly inhibited by their specific inhibitors [11–13]. Moreover, retinoids are also known to induce cell differentiation in cells with increased levels of PKC [10], MAPK [15] and PI3-K [9,13].

Natural products represent an important source of drugs such as anti-infectives and compounds used in cancer therapy. In addition, natural products are considered to be biologically validated lead structures, and it is anticipated that many compounds with novel or enhanced therapeutic effects will be developed from compounds present in natural product libraries [16]. Actinomycetes, which are widely distributed in the natural environment, are the source of various natural drugs, including rapamycin, lipstatin and thienamycin [17]. Furthermore, numerous anti-tumor metabolites with

\*\* Corresponding author. Tel.: +82 2 3290 3416; fax: +82 2 3290 3921.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jcyu@chosun.ac.kr](mailto:jcyu@chosun.ac.kr) (J.C. Yoo), [tskim@korea.ac.kr](mailto:tskim@korea.ac.kr) (T.S. Kim).

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NBT, nitroblue tetrazolium; 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C.

## Cloning and characterization of CalS7 from *Micromonospora echinospora* sp. *calichensis* as a glucose-1-phosphate nucleotidyltransferase

Dinesh Simkhada · Tae-Jin Oh · Eui Min Kim · Jin Cheol Yoo · Jae Kyung Sohng

Received: 22 May 2008 / Revised: 28 August 2008 / Accepted: 29 August 2008 / Published online: 20 September 2008  
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

**Abstract** The deoxysugar biosynthetic gene cluster of calicheamicin contains the *calS7*, which encodes glucose-1-phosphate nucleotidyltransferase and converts glucose-1-phosphate and nucleotides (NTP) to NDP-glucose and pyrophosphate. *calS7* was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and the purified protein had significant thymidyltransferase and uridylyltransferase activities as well, with some guanidyltransferase activity but negligible cytidyl and adenyltransferase activity. The functions of thymidyltransferase and uridylyltransferase were also verified using one-pot enzymatic synthesis of TMK and ACK. The products were analyzed by HPLC and ESI/MS, which showed peaks at  $m/z = 563$  and  $565$  for TDP-D-glucose and UDP-D-glucose, respectively, in negative mode.

**Keywords** Calicheamicin · Deoxysugar · *Micromonospora echinospora* sp. *calichensis* · Thymidyltransferase · Uridylyltransferase

D. Simkhada · T.-J. Oh · E. M. Kim · J. K. Sohng (✉)  
Institute of Biomolecule Reconstruction (iBR),  
Department of Pharmaceutical Engineering, Sun Moon  
University, # 100, Kalsan-ri, Tangjeong-myeon, Asansi,  
Chungnam 336-708, Republic of Korea  
e-mail: sohng@sunmoon.ac.kr

J. C. Yoo  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

### Introduction

Calicheamicin produced by *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* is an enediyne antibiotic containing three distinct structural elements: a DNA-recognition unit, which delivers the metabolite to its target DNA; an activation component, which sets the stage for cycloaromatization; and the enediyne “warhead”, which cycloaromatizes to a highly reactive diradical species in the presence of DNA (Myers et al. 1994; Biggins et al. 2003) (Fig. 1). The basic property of calicheamicin resides is its ability to cleave DNA. This cleavage property can be triggered by the action of a thiol-reducing agent or UV exposure. The enediyne moiety plays an important role in DNA cleavage, while the sugar parts are supposed to help the antibiotic become more specific or direct it to bind the double-stranded DNA. In this sense, the all-structural constituents are equally important (Biggins et al. 2003; Galm et al. 2005).

The nucleotide-sugar NDP-D-glucose is a key metabolite in prokaryotes where it serves as a precursor to a large number of modified sugars, such as L-rhamnose (6-deoxyhexose), 6-deoxy-L-talose, 2,6-dideoxyhexose and other deoxyhexoses and deoxypentose (Simone et al. 2001). Numerous studies have demonstrated that the early enzymatic step common to the biosynthesis of all deoxysugars found in antibiotics is the formation of NDP-glucose from NTP and  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate from glucose-1-phosphate nucleotidyltransferase (NDP-glucose

## A novel alkalo- and thermostable phospholipase D from *Streptomyces olivochromogenes*

Jaya Ram Simkhada · Hyo Jeong Lee ·  
So Young Jang · Seung Sik Cho · Eun Jung Park ·  
Jae Kyung Sohng · Jin Cheol Yoo

Received: 1 September 2008 / Revised: 28 October 2008 / Accepted: 11 November 2008 / Published online: 28 November 2008  
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

**Abstract** A 60 kDa phospholipase D (PLD) was obtained from *Streptomyces olivochromogenes* by one-step chromatography on Sepharose CL-6B. Maximal activity was at pH 8 and 75°C and the enzyme was stable from pH 7 to 13 and from 55 to 75°C. Thermal and pH stability with temperature optimum of the enzyme were highest among *Streptomyces* PLDs reported so far. The activity was Ca<sup>2+</sup>-dependent and enhanced by detergents. The *K*<sub>m</sub> and *V*<sub>max</sub> values for phosphatidylcholine were 0.6 mM and 650 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectively. In addition, the enzyme also revealed transphosphatidyl activity, which was optimum at pH 8 and 50°C. The first 15 amino acid residues of the N terminal sequence were ADY-TPGAPGIGDPYY, which are significantly different from the other known PLDs. The enzyme may therefore be a novel PLD with potential application in the lipid industry.

**Keywords** Alkalo- and thermostable · One-step purification · Phospholipase D · *Streptomyces olivochromogenes*

### Introduction

Phospholipase D (phosphatidylcholine choline hydrolyase, EC 3.1.4.4) is found in a wide variety of organisms, including plants, mammals, yeast, and bacteria (Morris et al. 1997). It catalyzes the hydrolysis of phospholipids that release phosphatidic acid (PA) and alcohols. In the presence of an appropriate acceptor alcohol, it also catalyzes a transphosphatidyl reaction in which the exchange of alcohol head groups takes place (Liscovitch et al. 2000). More than 500 PLDs with various molecular sizes have been reported so far. Among them, the primary structure of only about 38 plant, 12 microbial and 8 mammalian PLDs have been elucidated. Only a few of them are obtained in pure state and the tertiary structure of only one PLD, that is from *Streptomyces* sp. PMF, has been revealed so far (Leiros et al. 2000; Lerchner et al. 2005; Ulbrich-Hofmann et al. 2005). PLD plays a vital role in the regulation of various cell functions, such as transmembrane signaling, intracellular protein trafficking, secretion, alteration in cell morphology and motility (Morris et al. 1997). In some bacteria, PLDs are important for their physiology as virulence determinants; however, the

J. R. Simkhada · S. Y. Jang · S. S. Cho ·  
E. J. Park · J. C. Yoo (✉)  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun  
University, Gwangju 501-759, South Korea  
e-mail: jcyu@chosun.ac.kr

H. J. Lee  
Department of Complementary and Alternative Therapy,  
College of Management, Commerce and Social Welfare,  
Gwangju University, Gwangju 503-703, South Korea

J. K. Sohng  
Institute of Biomolecule Reconstruction, Sun Moon  
University, Asansi, Chungnam 336-708, South Korea



## Enhancement of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- and All-trans Retinoic Acid-Induced HL-60 Leukemia Cell Differentiation by *Panax ginseng*

Seung-Hyun KIM,<sup>1</sup> Seung-Sik CHO,<sup>2</sup> Jaya-Ram SIMKHADA,<sup>2</sup> Hyo-Jeong LEE,<sup>3</sup> Si-Wouk KIM,<sup>4</sup> Tae-Sung KIM,<sup>1</sup> and Jin-Cheol YOO<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Complementary and Alternative Therapy, College of Management, Commerce and Social Welfare, Gwangju University, Gwangju 503-703, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Environmental Engineering, BK 21 Team for Biohydrogen Production, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

Received November 20, 2008; Accepted January 22, 2009; Online Publication, May 7, 2009

[doi:10.1271/bbb.80823]

**Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) has a wide range of therapeutic uses including cancer treatment. Human promyelocytic leukemia cells differentiate into monocytes or granulocytes when treated with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] or all-trans retinoic acid (ATRA). Treatment of HL-60 cells with zero to 100 μg/ml of a methanol extract of ginseng for 72 h induced a small increase in cell differentiation. Surprisingly, a synergistic induction of differentiation was observed when HL-60 cells were treated with ATRA or 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and the extract. The inhibitors of protein kinase C (PKC) and extracellular signal-regulated kinase (ERK), but not of phosphoinositide 3-kinase (PI3-K), inhibited the HL-60 differentiation induced by the extract in combination with ATRA or 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, signifying that PKC and ERK were involved in the cell differentiation enhancement by the extract. These results suggest that the ability of a methanol extract of ginseng to enhance the differentiation potential of ATRA or 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> may improve the ultimate outcome of acute promyelocytic leukemia therapy.**

**Key words:** all-trans retinoic acid; HL-60 cells; leukemia; 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; *Panax ginseng*

*Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) is a well-known medicinal herb native to Korea and China. The root of this herb is commonly known as ginseng, which has been widely used in Asia, especially in China and Korea for more than 2000 years, with the belief that it is a tonic and panacea that can promote longevity.<sup>1–3</sup> The use of ginseng continues to grow and it has become one of the most preferred medicines throughout the world. In Korea, *Panax ginseng* is classified into fresh, white and red ginseng.<sup>2</sup> Ginseng is air-dried into white ginseng or steamed at 100 °C for 2–3 h to red ginseng, and the latter has been reported to be pharmacologically more active than the former.<sup>4</sup> The phytochemicals present in

ginseng exert such pharmacological effects as antioxidant, anti-carcinogenic, anti-mutagenic, and anti-tumor. However, the underlying mechanisms of action as anti-cancer agents and the other activities of ginseng are largely unclear.<sup>5</sup> The ingredients found in ginseng are ginsenosides, polysaccharides, peptides, polyacetylenic alcohols, vitamins, minor elements and enzymes. The pharmacological effects of ginseng are attributed to ginsenosides or ginseng saponin which have been well documented in a large body of literature.<sup>1–5</sup> More than 40 ginsenosides have been identified; based on their structural differences, they can be classified into three categories: The panaxadiol group (e.g., Rb1), panaxatriol group (e.g., Rg1) and oleanolic acid group (e.g., Ro).<sup>3,6</sup> Besides the various therapeutic uses of ginseng, ginsenosides Rk1, Rh2, Rg3 and Rg5 have been reported as potent anticancer compounds.<sup>2,7</sup> A Korean red ginseng extract has recently been reported to induce apoptosis and to decrease telomerase activity in U937 human leukemia cells.<sup>8</sup>

Most cancer cells are defective in their capacity to mature into non-replicating adult cells, thereby existing in a highly proliferating state and thus outgrowing their normal cellular counterparts. Leukaemia cells can be induced to undergo terminal differentiation by a variety of biological and chemical agents, signifying that the malignant state is not irreversible. Leukemia may eventually prove treatable with agents that induce terminal differentiation, most likely with less morbidity than that associated with treatment by cytotoxic agents.<sup>9</sup> All-trans retinoic acid (ATRA) and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] are known to induce terminal differentiation in such leukemic cell lines as HL-60 and U-937, as well as in short-term cultured acute promyelocytic leukemia (APL) cells in humans.<sup>10,11</sup> Human HL-60 leukemia cells differentiate into monocytes when treated with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and into granulocytes when treated with ATRA.<sup>10,12</sup> However, an APL treatment with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and ATRA

† To whom correspondence should be addressed. Tel: +82-62-230-6380; Fax: +82-62-227-3963; E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

Abbreviations: 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; APL, acute promyelocytic leukemia; ATRA, all-trans retinoic acid; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FITC, fluorescein isothiocyanate; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NBT, nitroblue tetrazolium; PD 98059, 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one; PI3-K, phosphoinositide 3-kinase; PE, phycoerythrin; PKC, protein kinase C; PI, PKC peptide inhibitor; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

## Quantitative Analysis of Nargenicin in *Nocardia* sp. CS682 Culture by High Performance Liquid Chromatography

Seung Sik Cho<sup>1</sup>, Jae Kyung Sohng<sup>2</sup>, Hyo Jeong Lee<sup>3</sup>, Sung Ju Park<sup>1</sup>, Jaya Ram Simkhada<sup>1</sup>, and Jin Cheol Yoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Gwang Ju 501-759, Korea, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, SunMoon University, Asan 337-708, Korea, and <sup>3</sup>Department of Complementary and Alternative Therapy, College of Management, Commerce and Social Welfare, Gwangju University, Gwang Ju 503-703, Korea

(Received October 29, 2008/Revised February 19, 2009/Accepted March 2, 2009)

A simple and sensitive HPLC method was developed for the quantitative analysis of nargenicin in the culture broth of *Nocardia* sp. CS682, isolated from Korean soil. Nargenicin, an unusual macrolide antibiotic with potent anti-MRSA (methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*) activity, was extracted from the culture broth with ethylacetate and then analyzed by HPLC using solvent A (0.5 M dipotassium phosphate pH 2.5-water: acetonitrile = 80:20, v/v) and solvent B (100% acetonitrile), at 215 nm. The calibration curve of nargenicin was linear with correlation coefficient greater than 0.99. This method provides precise analysis of the nargenicin amount present in the cell free culture medium, and may be applicable to analyze other bacterial cultures containing similar compounds.

**Key words:** HPLC, Nargenicin, *Nocardia* sp. CS682, Quantitative analysis

### INTRODUCTION

The emergence of drug-resistant microorganism has been growing rapidly and remains a serious threat to human lives. Increasing use of antimicrobial agents as animal growth promoter as well as in human medicine has been presumed to be a major factor responsible for the emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) (Murray, 1995). Recently, nargenicin as an unusual macrolide antibiotic was isolated and purified as a potent anti-MRSA antibiotic from *Nocardia* sp. CS682 (KCTC 11297BP), isolated from Korea and its molecular structure was determined as depicted in Fig. 1 (Sohng et al., 2008). Nargenicin was first reported in 1977 from *Nocardia argentinensis* (Celmer et al., 1980). *Nocardia* species belong to the actinomyceta-ceae family, which are gram positive, strictly aerobic, and are ubiquitously found in soil, water, decaying

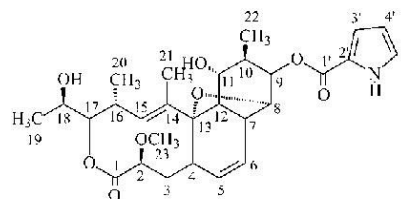


Fig. 1. Structure of nargenicin isolated from *Nocardia* sp CS682

vegetation, animal faecal deposits, and dust (Brown-Elliott et al., 2006; Beaman and Beaman, 1994). Macrolide antibiotics represent a very important class of antibacterial compounds widely used in veterinary medicine to treat respiratory diseases, or as feed additives as growth promoters. The antibiotics are characterized by a common chemical structure containing a macrocyclic lactone ring bearing 12 or 16 atoms with one or more deoxy neutral and/or aminosugars linked through glycosidic bonds (Dubois et al., 2001). Macrolide antibiotics such as erythromycin, clarithromycin and azithromycin act against bacteria by selectively binding to the bacterial

Correspondence to: Jin Cheol Yoo, Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: 82-62-230-6380, Fax: 82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

## Monoclonal Antibody Production and Immunochemical Detection of Polyether Antibiotics

Hyo Jeong Lee<sup>1</sup>, Seung Sik Cho<sup>2</sup>, Jaya Ram Simkhada<sup>2</sup>, and Jin Cheol Yoo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Complementary and Alternative Therapy, College of Management, Commerce and Social Welfare, Gwangju University, Gwangju 503-703, Korea and <sup>2</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received November 17, 2008/Revised February 19, 2009/Accepted February 23, 2009)

Polyether antibiotics such as monensin and salinomycin have been primarily used as coccidiostat and growth promoter. Since residues of these antibiotic in food may pose a health risk for sensitive individuals, their use should be carefully monitored. An immunochemical method was developed for the determination of polyether antibiotic using monoclonal antibody (Mab) produced by immunized mice. Conjugates of monensin, salinomycin and laidlomycin were prepared with bovine serum albumin (BSA), keyhole limpet haemocyanine (KLH) and ovalbumin (OVA) by mixed anhydride method and then used as immunogene to produce Mab. Eight hybridoma cell lines were isolated that produced Mabs that competed with polyether antibiotic-protein conjugates in BALB/c-SP2/0 fusion system. Two hybridoma with higher sensitivity, designated as 4G11F and 1C8F1F, were cultured for mass production and then purified from ascites fluid. Antibiotic-protein conjugates were quantitatively analyzed by using the purified Mabs through a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Key words:** Immunochemical detection, Monoclonal antibody, Polyether antibiotic

### INTRODUCTION

Polyether ionophores such as monensin, salinomycin and laidlomycin (Fig. 1) are used in many segments of the cattle and poultry industries. The main therapeutic application of these antibiotics in veterinary is for the prevention and treatment of coccidiosis in poultry and livestock and as growth promoters for ruminants (Coleman et al., 1997; Matabudul et al., 2001). They are added to feeds as the sodium salts at fortification levels of 60-120 mg/kg (Blanchflower et al., 1996). The pharmacological feature of these antibiotics is known for their action of transporting cations across the cell membrane. These antibiotics, related to carboxylic acid group, are reported to be produced by various strains of *Streptomyces* and possess potent microbiological activities against Gram-positive bacteria, fungi and

protozoa. These antibiotics should be carefully handled to ensure that they are used at the appropriate concentrations and that they are not present in feed intended for other species, to which some of them may prove fatal (Blanchflower et al., 1996). Although they have been using with intense care, ionophore residues have been reported frequently in eggs or tissues (Kennedy et al., 1998; Rosen, 2001). Since ionophores can cause acute pharmacological effects on the cardiovascular system (Pressmann et al., 1983), their residues in food may pose a health risk for sensitive individuals. European commission has established official maximum residual level (MRL) for coccidiostats lasalocid in poultry tissue (muscle 20 µg/kg, liver 100 µg/kg); however, for the other ionophoric compounds MRLs have not been set (Jostoi et al., 2007).

In order to monitor polyether antibiotics residue levels in livestock products, simple and reliable analytical methods are required. A thorough review of some methods used in their analysis has been previously reported (Elliott et al., 2006). Various methods, such as microbioautographic (VanderKop

Correspondence to: Jin Cheol Yoo, Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: 82-62-230-6380, Fax: 82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

## A Novel Ca<sup>2+</sup>-Dependent Phospholipase D from *Streptomyces tendae*, Possessing Only Hydrolytic Activity

Poonam Mander<sup>1</sup>, Jaya Ram Simkhada<sup>1</sup>, Seung Sik Cho<sup>1</sup>, Sung Ju Park<sup>1</sup>, Hong Seok Choi<sup>1</sup>, Hei Chan Lee<sup>2</sup>, Jae Kyung Sohng<sup>2</sup>, and Jin Cheol Yoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea and <sup>2</sup>Institute of Biomolecule Reconstruction, Sun Moon University, Asansi, Chungnam 336-708, Korea

(Received April 8, 2009/Revised June 30, 2009/Accepted August 11, 2009)

An extracellular phospholipase D (PLD<sub>St</sub>) was purified from *Streptomyces tendae* by two successive chromatographic steps on Sepharose CL-6B and DEAE-Sepharose CL-6B. Molecular weight of the PLD<sub>St</sub> was estimated to be approximately 43 kDa by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Maximal activity was at pH 8 and 60°C, and the enzyme was stable at or below 60°C and between pH 8 and 10, when assayed after 1.5 and 24 h, respectively. The enzyme activity had an absolute requirement of Ca<sup>2+</sup>, and the maximum activity was at 2 mM CaCl<sub>2</sub>. The *K*<sub>m</sub> and *V*<sub>max</sub> values for phosphatidyl choline were 0.95 mM and 810 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectively. More importantly, PLD<sub>St</sub> could not catalyze transphosphatidylation of glycerol, L-serine, *myo*-inositol and ethanolamine, which have been extensively used to evaluate the activity. The result strongly suggests that PLD<sub>St</sub> does not have the transphosphatidylation activity, thereby making it the first *Streptomyces* PLD possessing only hydrolytic activity. PLD<sub>St</sub> may therefore be a novel type of PLD enzyme.

**Key words:** Hydrolytic activity, Novel phospholipase D, *Streptomyces tendae*

### Selected by Editors

### INTRODUCTION

Phospholipase D (phosphatidylcholine choline hydrolase, EC 3.1.4.4) is ubiquitously found in a wide variety of organisms such as plants, mammals, yeast, and bacteria. The enzyme catalyzes the hydrolysis of phospholipids that release phosphatidic acid (PA) and alcohols. When an appropriate acceptor alcohol is present, it also catalyzes alcohol head group exchanging reaction known as transphosphatidylation reaction. Among more than 500 PLDs reported so far, primary structure of about 38 plant, 12 microbial and 8 mammalian PLDs and tertiary structure of only one PLD, that is from *Streptomyces* sp. PMF, has been elucidated (Leiros et al., 2000; Lerchner et al., 2005; Ulbrich-Hofmann et al., 2005). PLD plays a pivotal

role in the regulation of various cell functions, such as transmembrane signaling, intracellular protein trafficking, secretion, alteration in cell morphology and motility (Morris et al., 1997). In microorganism, PLDs are supposed to be essential for their physiology as virulence determinants; however, the enzymatic properties and underlying physiological functions are yet to be elucidated. In general, most PLDs exhibit both hydrolytic and transphosphatidylation activity. Previously, only one PLD enzyme, that is a membrane bound PLD from *Streptovercillum cinnamomeum*, was reported to possess only hydrolytic activity (Ogino et al., 2001). Furthermore, PLDs from plant sources have been reported to depend upon micromolar to millimolar range of Ca<sup>2+</sup> ion, whereas only a few microbial PLDs have been reported to enhance their activity by Ca<sup>2+</sup> ion. Recently, we have investigated that PLD from *Streptomyces olivochromogenes* have exclusive requirement of Ca<sup>2+</sup> ion for the activity (Simkhada et al., 2009b).

Most of the PLD enzymes reported so far are highly active in between 45-60°C and pH 7-8. Also, the enzyme activity is highly enhanced by Triton X-100, a

Correspondence to: Jin Cheol Yoo, Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: 82-62-230-6380, Fax: 82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

## Selective Synthesis of 1'( $\alpha$ ),2'( $\beta$ )-C-Dimethyl Carbocyclic Adenosine Analogue as Potential anti-HCV Agent

Hua Li, Wonjae Lee, Jin Cheol Yoo, and Joon Hee Hong\*

BK21-Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea. \*E-mail: hongjh@chosun.ac.kr  
Received March 25, 2009, Accepted July 30, 2009

As a part of an ongoing effort to discover inhibitors of the Hepatitis C Virus RNA replication, we describe here the first synthetic route of 1'( $\alpha$ ),2'( $\beta$ )-C-dimethyl carbocyclic adenosine analogue. The key intermediate cyclopentenyl alcohol **8**( $\alpha$ ) was prepared from aldehyde **4** using ring-closing metathesis (RCM) as a key reaction. Coupling of **8**( $\alpha$ ) with nucleosidic base via the regioselective Mitsunobu reaction followed by stereoselective dihydroxylation and deprotection afforded the target carbocyclic adenosine analogue **12**.

**Key Words:** Mitsunobu reaction, Dihydroxylation, Carbodine, anti-HCV agents

### Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is the pathogen associated with the majority of sporadic and transfusion related non-A and non-B hepatitis infections. Although HCV is often asymptomatic, it is a major health problem that leads to chronic liver disease, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma, in a substantial number of infected individuals.<sup>1</sup> The current standard of care for chronic hepatitis C is combination therapy with an interferon- $\alpha$ /ribavirin than that with unpegylated interferon- $\alpha$ .<sup>2</sup>

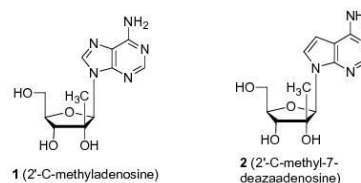
The nonstructural protein NS5B has been characterized as an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) that is required for viral replication. This polymerase is considered to be an essential component in the HCV replication complex and therefore is an ideal target for drug discovery.<sup>3</sup> Since nucleoside analogues have been used as a drug of choice in curing viral infection including, a number of nucleoside analogues have been synthesized and evaluated for anti-HCV agent.<sup>4</sup> Generally, nucleosides are prodrugs, and their biological activity is exerted by their 5'-triphosphate derivatives. Intracellular phosphorylation is required to convert a nucleoside drug to its active 5'-triphosphate in order to be incorporated into a viral DNA. The sequential phosphorylation is normally executed by three viral or cellular kinases, including nucleoside kinase, nucleoside monophosphate kinase, and nucleoside diphosphate kinase.<sup>5</sup> Once incorporated into an elongating viral DNA chain, the nucleotide inhibitor functions as a terminator to abort viral DNA synthesis.

Nucleoside chain terminators comprise a major class of drugs that target a viral polymerase.<sup>6</sup> For example replacement of the 2'-hydrogen of natural ribonucleosides with a methyl group yields compounds with excellent chain-terminating properties. Among them, 2'-C-methyladenosine<sup>7</sup> **1**, ( $EC_{50}$  = 0.3  $\mu$ M) and 2'-C-methyl-7-deazaadenosine<sup>8</sup> **2** (Figure 1) were found as the most potent inhibitors of HCV RNA replication without significant toxicity.

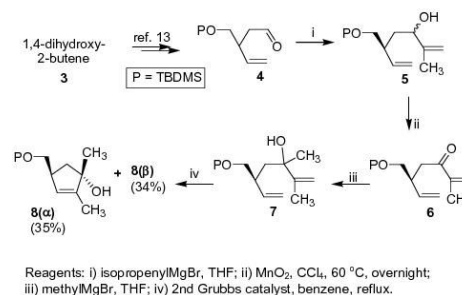
Carbocyclic nucleosides are derivatives in which the endocyclic oxygen of the nucleoside sugar ring has been replaced by a methylene group.<sup>9</sup> These analogues display remarkable metabolic stability since they are unaffected by phosphorylase

and hydrolase that cleave the glycosidic bond of natural nucleosides.<sup>10</sup> They are also recognized by the same enzymes that recognize normal nucleosides displaying, correspondingly, a wide range of biological properties.<sup>11</sup>

On the basis of these findings that the methyl group of 2'-position could impose northern (2'-exo/3'-endo) conformation which shows favorable steric as well as electronic effect on the interaction with HCV polymerase, we have determined to synthesize novel class of carbocyclic nucleoside comprising 1'( $\alpha$ ),2'( $\beta$ )-C-dimethylated carbodine analogue, which has an additional methyl group in the 1'-position in order to take the same northern (2'-exo/3'-endo) conformation as lead compounds **1** and **2**.<sup>12</sup>



**Figure 1.** Synthesis rationale and structures of potent anti-HCV agents.



Reagents: i) isopropenylMgBr, THF; ii)  $MnO_2$ ,  $CCl_4$ , 60  $^\circ C$ , overnight; iii) methylMgBr, THF; iv) 2nd Grubbs catalyst, benzene, reflux.

**Scheme 1.** Synthesis of cyclopentene intermediate

## First page preview



Download full text

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 28:809–820, 2009  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN: 1525-7770 print / 1532-2335 online  
DOI: 10.1080/15257770903170294



## SYNTHESIS AND ANTI-HCV EVALUATION OF 4'( $\alpha$ )-ETHYL AND 2'( $\beta$ )-METHYL-CARBODINE ANALOGUES

Hua Li, Jin Cheol Yoo, and Joon Hee Hong

*BK21–Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju, Republic of Korea*

□ Novel 4'( $\alpha$ )-ethyl-2'( $\beta$ )-methyl carbocyclic nucleoside analogues have been prepared and evaluated for inhibition of hepatitis C virus (HCV) RNA replication in cell culture. The construction of cyclopentene intermediate **12 $\beta$**  was successfully made via sequential Johnson-Claisen orthoester rearrangement and ring-closing metathesis (RCM) starting from Weinreb amide **5**. Selective dihydroxylation and desilylation gave the target carbodine analogues. The synthesized nucleoside analogues mentioned above **18** and **19** were assayed for their ability to inhibit HCV RNA replication in a subgenomic replicon Huh7 cell line (LucNeo#2). However, the synthesized nucleosides neither showed any significant antiviral activity nor toxicity up to 50  $\mu$ M.

**Keywords** Anti-HCV agent; carbodine; branched carbocyclic nucleoside

### INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatoma carcinoma.<sup>[1]</sup> However, there is no effective chemotherapy for the treatment of HCV-infected people except immunotherapy using ribavirin in combination with interferon- $\alpha$ , which leads to a sustained virological response in only about half of the patients treated.<sup>[2]</sup>

Since nucleoside analogues have been used as a drug of choice in curing viral infection, many have been synthesized and evaluated for anti-HCV agent.<sup>[3]</sup> These nucleosides are incorporated into proviral RNA like a substrate after being converted to their corresponding triphosphates and act as chain terminators. Modification in the vicinity of the 2'-hydroxy of the ribose in natural ribonucleosides can produce effective RNA chain terminator.<sup>[4]</sup>

Received 11 May 2009; accepted 22 June 2009.

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea, 2009.

Address correspondence to Joon Hee Hong, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Republic of Korea. E-mail: hongjh@chosun.ac.kr



## Characterization of RbmD (Glycosyltransferase in Ribostamycin Gene Cluster) through Neomycin Production Reconstituted from the Engineered *Streptomyces fradiae* BS1

Keshav Kumar Nepal<sup>1</sup>, Tae-Jin Oh<sup>1</sup>, Bimala Subba<sup>1</sup>, Jin Cheol Yoo<sup>2,\*</sup>, and Jae Kyung Sohng<sup>1,\*</sup>

Amino acid homology analysis predicted that *rbmD*, a putative glycosyltransferase from *Streptomyces ribosidificus* ATCC 21294, has the highest homology with *neoD* in neomycin biosynthesis. *S. fradiae* BS1, in which the production of neomycin was abolished, was generated by disruption of the *neoD* gene in the neomycin producer *S. fradiae*. The restoration of neomycin by self complementation suggested that there was no polar effect in the mutant. In addition, *S. fradiae* BS6 was created with complementation by *rbmD* in *S. fradiae* BS1, and secondary metabolite analysis by ESI/MS, LC/MS and MS/MS showed the restoration of neomycin production in *S. fradiae* BS6. These gene inactivation and complementation studies suggested that, like *neoD*, *rbmD* functions as a 2-*N*-acetylglucosaminyltransferase and demonstrated the potential for the generation of novel aminoglycoside antibiotics using glycosyltransferases *in vivo*.

### INTRODUCTION

The 2-Deoxystreptamine (DOS)-containing antibiotics constitute the largest subgroup of the aminoglycoside class of antimicrobial agents (Pearce and Rinehart, 1981). This class includes many clinically important antibiotics, among which neomycin (Nem) and gentamicin, are the best known. Nem and gentamicin are particularly useful for virulent Gram-negative organisms (Dax, 1997), for which few therapeutic options are available (Cho and Rando, 1999; Tok et al., 2001). However, the application of aminoglycosides is limited due to their intrinsic toxicities (nephrotoxicity and ototoxicity) and due to recent emergency of several aminoglycoside-resistant pathogens (Mingeot-Leclercq and Tulkens, 1999; Mingeot-Leclercq et al., 1999). Thus, there is great demand for the development of safer and more potent aminoglycoside-based antibiotics. A fundamental challenge in the field of aminoglycoside antibiotics is the identification of the exact functions of the glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the glycan structures

because the sugar components of aminoglycosides play key roles in determining the antibacterial activity and toxicity of the antibiotic (Rodríguez and McDaniel, 2001).

The biosynthetic gene clusters of many aminoglycoside antibiotics have been sequenced, and their biosynthetic pathways have been proposed (Huang et al., 2005; Kharel et al., 2003; 2004; Subba et al., 2005; Unwin et al., 2004). As shown in Fig. 1, Nem and ribostamycin (Rbm) are architecturally simple and share three common subunits containing DOS, neosamine and ribose sugar. Thus, the biosynthetic genes involved in the biosynthesis of these intermediates have been proposed and characterized (Huang et al., 2005; Kudo et al., 2005; Llewellyn and Spencer, 2006). Although many putative glycosyltransferase genes have been identified in biosynthetic gene clusters, only the function of the glycosyltransferase genes involved in Nem biosynthesis has been investigated in detail (*in vitro*), and it was shown that one glycosyltransferase is required for the attachment of each individual sugar (Yokoyama et al., 2008).

The Rbm gene cluster required for ribostamycin biosynthesis has been identified from the Rbm-producing strain, *Streptomyces ribosidificus* ATCC 21294; however, the glycosyltransferase (*rbmD*) required for ribostamycin biosynthesis has yet to be identified (Subba et al., 2005). Taking advantage of the structural similarity between Nem and Rbm, we report the reconstitution of Nem from the *neoD*-deleted mutant, *S. fradiae* BS6, by the successful expression of glycosyltransferase (*rbmD*) from the Rbm gene cluster. To the best of our knowledge, this is the first report to describe the functional characterization of a glycosyltransferase from aminoglycoside biosynthesis *in vivo*.

### MATERIALS AND METHODS

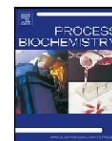
#### Bacterial strains, plasmids, and culture conditions

The Rbm-producing strain, *S. ribosidificus* ATCC 21294, and Nem-producing strain, *S. fradiae* ATCC 10745, were obtained from the Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM).

<sup>1</sup>Institute of Biomolecule Reconstruction, Department of Pharmaceutical Engineering, SunMoon University, Asan 336-708, Korea, <sup>2</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
\*Correspondence: sohng@sunmoon.ac.kr (JKS), jcyu@chosun.ac.kr (JCY)

Received September 10, 2008; revised October 15, 2008; accepted October 16, 2008; published online October 16, 2008

**Keywords:** aminoglycoside, glycosyltransferase, neomycin, ribostamycin, *Streptomyces*



## A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684

Jaya Ram Simkhada, Poonam Mander, Seung Sik Cho, Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Seosukdong, Donggu, Gwangju 501-759, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 May 2009

Received in revised form 26 June 2009

Accepted 16 August 2009

#### Keywords:

Fibrinolytic

Purification

Serine metalloprotease

*Streptomyces*

Thrombolytic therapy

### ABSTRACT

A fibrinolytic protease (FP84) was purified from *Streptomyces* sp. CS684, with the aim of isolating economically viable enzyme from a microbial source. SDS-PAGE and fibrin zymography of the purified enzyme showed a single protein band of approximately 35 kDa. Maximal activity was at 45 °C and pH 7–8, and the enzyme was stable between pH 6 and 9 and below 40 °C. It exhibited fibrinolytic activity, which is stronger than that of plasmin. FP84 hydrolyzed  $\beta\beta$ -chains of fibrinogen, but did not cleave  $\alpha$ - and  $\gamma$ -chains.  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_{cat}$  values for azocasein were 4.2 mg ml<sup>-1</sup>, 305.8  $\mu$ g min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and 188.7 s<sup>-1</sup>, respectively. The activity was suppressed by Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup>, but slightly enhanced by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. Additionally, the activity was slightly inhibited by aprotinin and PMSF, but significantly inhibited by pefabloc, EDTA and EGTA. The first 15 amino acids of N-terminal sequence were GTQENPPSSGLDDID. They are highly similar to those of serine proteases from various *Streptomyces* strains, but different with known fibrinolytic enzymes. These results suggest that FP84 is a novel serine metalloprotease with potential application in thrombolytic therapy.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cardiovascular diseases such as high blood pressure, acute myocardial infarction, ischemic heart disease, valvular heart disease, peripheral vascular disease, arrhythmias, stroke, etc. are the primary causes of death throughout the world. According to data of World Health Organization (WHO) in 2000, 29% of the total mortality rate in the world is caused by cardiovascular diseases [1]. Similarly, another report of WHO in 2006 shows about 18 million people die every year from cardiovascular diseases [2]. The fundamental pathophysiological process related to this devastating problem is the formation of fibrin (blood clots), which adheres to the unbroken wall of blood vessels. Fibrin is normally formed from fibrinogen by the action of thrombin (EC 3.4.21.5); it is lysed by plasmin (EC 3.4.21.7), which is activated from plasminogen by tissue plasminogen activator. In balanced condition, fibrin clots are hydrolyzed by plasmin to avoid thrombosis in blood vessels; however, in unbalanced condition as a result of pathophysiological disorders, the clots are not hydrolyzed, and thus thrombosis occurs. Urokinase-type plasminogen activator (EC 3.4.21.31), tissue plasminogen activator (t-PA), bacterial plasminogen activator streptokinase (EC 3.2.1.35) are typical thrombolytic agents used for therapeutic purposes [2]. Based on working mechanisms, thrombolytic agents are of two

types: one is plasminogen activators and urokinase which activates plasminogen into active plasmin to degrade fibrin and the other is plasmin-like proteins which directly degrade fibrin [3]. Moreover, on the basis of catalytic mechanisms, microbial fibrinolytic enzymes are classified into three types: serine protease (e.g. nattokinase), metalloprotease (e.g. *Armillaria mellea* metalloprotease) and mixture of both serine and metalloprotease (e.g. protease from *Streptomyces* sp. Y405) [3]. Despite widespread uses, thrombolytic agents such as t-PA and urokinase are expensive, exhibit low fibrin specificity, and have undesired side effects such as gastrointestinal bleeding, resistance to reperfusion and allergic reactions [4]. Therefore, continuous efforts have been focused in the search of safer and less expensive thrombolytic agents from diverse sources. Until recently, fibrinolytic enzyme with potential thrombolytic application have been purified from various sources such as fermented food, earthworms, mushrooms, snake venom and microbial sources [5]. From microbial sources, bacteria, actinomycetes, fungi and algae are reported to produce fibrinolytic enzyme. Of them, only few reports are from *Streptomyces* origin [6–8].

*Streptomyces* sp. CS684 was isolated from Korean soil as an antibiotic producer [9] and the strain also produced a novel low molecular weight phospholipase D [10]. A profound proteolytic enzyme with fibrinolytic activity was found in the culture medium; therefore, we were interested in its potential biocatalytic application. Here, we describe purification and biochemical properties of a novel fibrinolytic enzyme, FP84, produced by *Streptomyces* sp. CS684.

\* Corresponding author. Tel.: +82 62 230 6380; fax: +82 62 227 3963.  
E-mail address: jcyu@chosun.ac.kr (J.C. Yoo).



## First page preview



Download full text

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 28:150–164, 2009  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN: 1525-7770 print / 1532-2335 online  
DOI: 10.1080/15257770902736434



## SHORT SYNTHESIS AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF ACYCLIC PHOSPHONIC ACID NUCLEOSIDE ANALOGUES

Lian Jin Liu, Jin Cheol Yoo, and Joon Hee Hong

*College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju, Republic of Korea*

□ *An efficient route for synthesizing novel allylic and cyclopropanoid phosphonic acid nucleoside analogues is described. The condensation of the bromine derivatives 6 and 18 with nucleoside bases (A, U, T, C, G) under standard nucleophilic substitution and deprotection conditions, afforded the target phosphonic acid nucleoside analogues. These compounds were evaluated for their antiviral properties against various viruses. Cyclopropanoid phosphonic adenine nucleoside analogue 23 showed significant anti-HIV activity.*

**Keywords** PMPA; PMCG; HPMPA; PMEAs; antiviral agents

### INTRODUCTION

The discovery of acyclovir<sup>[1]</sup> as an anti-herpes agent ignited the search for new antiviral nucleosides with a disconnected chain resulting from the omission of various bonds from the pentose or cyclopentane rings. During the past 20 years, many new synthetic schemes for acyclic nucleoside analogues<sup>[2]</sup> have been reported, and many of these molecules have exhibited promising antiviral activity,<sup>[3]</sup> particularly, ganciclovir,<sup>[4]</sup> a drug of choice for the treatment of HCMV infections, especially HCMV retinitis, which causes blindness in AIDS patients, and penciclovir,<sup>[5]</sup> which has a broad antiviral spectrum that includes anti-HSV-1 and 2, anti-HBV, and anti-VZV activity. These acyclic nucleosides are efficiently phosphorylated by viral TK (thymidine kinases) to the corresponding monophosphates and further phosphorylated by cellular kinases to the corresponding triphosphates. The efficacy of these drugs is limited by their toxicity and side effects, as well as the emergence of many drug-resistant viral strains.<sup>[6]</sup> Therefore, there is a

Received 13 August 2008; accepted 11 December 2008.

Address correspondence to Joon Hee Hong, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Republic of Korea. E-mail: hongjh@chosun.ac.kr



## Subacute Toxicity Study of CS682, a Fermentation Product of Korean Soil Bacteria, in Rats

In-Sik Shin<sup>1</sup>, Jong-Chan Lee<sup>1</sup>, Na-Hyeong Park<sup>1</sup>, Sung-Su Kang<sup>1</sup>, Changjong Moon<sup>1</sup>,  
Sung-Ho Kim<sup>1</sup>, Dong-Ho Shin<sup>1</sup>, Jin-Cheol Yoo<sup>2</sup> and Jong-Choon Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Medical Center, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, Korea

The present study was carried out to investigate the potential subacute toxicity of CS682, a fermentation product of Korean soil bacteria, by 3-week repeated oral administration in Sprague-Dawley rats. The test substance was administered once daily by gavage to male and female rats at dose levels of 0, 100, 300, and 1,000 mg/kg/day for 3 weeks. During the test period, clinical signs, mortality, body weights, food consumption, ophthalmoscopy, urinalysis, hematology, serum biochemistry, gross findings, organ weights, and histopathology were examined. Throughout the study period, no treatment-related deaths were observed. There were no treatment-related effects on clinical signs, food consumption, ophthalmoscopy, urinalysis, hematology, serum biochemistry, necropsy findings, organ weights, and histopathology in any treatment group. Based on these results, it was concluded that the 3-week repeated oral administration of CS682 to rats did not cause any adverse effects in rats at dose levels of  $\leq 1,000$  mg/kg/day. Under these experimental conditions, the NOAEL of CS682 was considered to be over 1,000 mg/kg/day for both sexes.

**Key words:** Feed additive, CS682, repeated dose toxicity, NOAEL, rat

Received 17 November 2008; Revised version received 12 January 2009; Accepted 2 February 2009

The use of veterinary pharmaceuticals has become integral to the growing animal food industry. In Korea there are approximately 2.9 million cattle, 103 million chickens, and 9.3 million swine (MIFAFF, 2008). In the United States there are approximately 104-110 million cattle, 7.5-8.6 billion chickens, 60-92 million swine, and 275-292 million turkeys (AHI, 2002; NASS, 2002). To maintain economic viability, large agribusinesses began contracting with individual farmers. This arrangement offered a guaranteed price to the farmer and a controlled and stable animal food-producing environment for the agribusiness. The close proximity of the large numbers of animals at these facilities and the potential for the rapid spread of disease has made routine use of pharmaceuticals necessary to maintain the viability of their operations.

Of the drugs approved for veterinary medicine, antibiotics

are among the most widely administered for animal health and management. The term 'antibiotic' is normally reserved for a diverse range of compounds, both natural and semi-synthetic, that possess antibacterial activity (Prescott and Baggot, 1993; Kanfer *et al.*, 1998). Hundreds of veterinary antibiotics have appeared on the market and are available for use in animals to treat diseases, as growth promoters, and to improve feed efficiency (Addison, 1984). In pork production, antibiotics are commonly included in feed at subtherapeutic levels for 2 main economic reasons: disease prevention and growth promotion. According to Dewey *et al.* (1997, 1999), antibiotics are currently used in 90% of starter rations, 75% of grower rations, and 50% of finisher rations for pigs. In the past, it was recognized that subtherapeutic levels of antibiotics had a positive effect on growth performance and herd health (Cromwell, 2002; Florea and Nightingale, 2004). Feeding antibiotics to swine have been shown to increase weight gain by 3.3 to 8.8% and to improve feed utilization efficiency by as much as 7%. However, because antibiotic supplementation in animal feeds may result in bacterial resistance to antibiotics and residues of antibiotics may be hazardous to human health,

\*Corresponding author: Jong-Choon Kim, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
Tel: +82-62-530-2827  
Fax: +82-62-530-2809  
E-mail: toxkim@chonnam.ac.kr

## Production, Isolation and Biological Activity of Nargenicin from *Nocardia* sp. CS682

Jae Kyung Sohng<sup>1</sup>, Tokutaro Yamaguchi<sup>1</sup>, Chi Nam Seong<sup>2</sup>, Keun Sik Baik<sup>2</sup>, Seong Chan Park<sup>2</sup>, Hyo Jeong Lee<sup>3</sup>, So Young Jang, Jaya Ram Simkhada, and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, Chosun University, Gwang Ju 501-759, Korea, <sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Sun-Moon University, Asan, Chungnam 337-708, Korea, <sup>2</sup>Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea, and <sup>3</sup>Department of Complementary and Alternative Therapy, College of Management, Commerce and Social welfare, Gwangju University, Gwang Ju 503-703, Korea

(Received August 29, 2008/Revised October 1, 2008/Accepted October 6, 2008)

Culture broth of an actinomycete isolate, *Nocardia* sp. CS682 showed specifically higher antibacterial activity against methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Purified substance from the organism, CS-682, which is active against MRSA and *Micrococcus leuteus*, is a C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>8</sub> (M+H<sup>+</sup>, observed: 516.83) and identified as an unusual macrolide antibiotic, nargenicin. The chemical structure of CS-682 was identified by FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>H) COSY. The anti-MRSA activity of CS-682 was stronger than that of oxacillin, vancomycin, monensin, erythromycin, and spiramycin. Phylogenetic analysis showed that strain CS682 is closely related to *Nocardia tenerifensis* DSM 44704<sup>T</sup> (98.7% sequence similarity), followed by *N. brasiliensis* ATCC 19296<sup>T</sup> (98.4% sequence similarity). The ability of *Nocardia* sp. CS682 to produce nargenicin was unique.

**Key words:** MRSA, Nargenicin, *Nocardia* sp. CS682, Antibiotic, Structure study, Biological activity

### INTRODUCTION

Actinomycetes are well known as a rich source of antibiotics and bioactive molecules, and are of considerable importance in industry. They are widely distributed and abundant in natural and man-made environments, and play an important role in the degradation of organic matter (Yoo et al., 2002). Over the last few years, intrinsic or acquired resistance of *Staphylococcus aureus* to many antibiotics, in particular, to  $\beta$ -lactams and glycopeptides has become a major cause of concern. MRSA (methicilin resistant *Staphylococcus aureus*) causes a health risk, especially in patients with severe underlying disease or immunosuppression (Chadwick et al., 1996; Coque et al., 1996).

MRSA emerged from the time methicillin was used first in Europe, and, its presence has increasingly been detected throughout the world (Francioli et al., 1991). Up to 80% of the nosocomial infections in hospital were

due to MRSA (Kim, 2004). In addition to MRSA, from the first report on vancomycin resistant enterococcus (VRE) in 1986 in Europe, their presence has also been increasingly detected worldwide (Van Horn et al., 1996). In Korea, a VRE strain, *Enterococcus durans* was first isolated in 1992. Since then, the prevalence of VRE in hospitalized patients has been rising significantly (Kim et al., 1995; Seong et al., 2004).

The conjugative transfer of high level vancomycin resistance from *E. faecalis* to *S. aureus* (Nobel et al., 1992) also supports the spreading of MRSA and VRE. Ultimately, increasing use of antimicrobial agents in human medicine and as animal growth promoters has been related to the emergence of MRSA and VRE (Murray, 1995). To control the antibiotic resistant pathogens, various antibiotics such as vancomycin, synergid and linezolid were developed for human use. Also, monensin, laidlomycin, and salinomycin were developed and used as animal feed (Wampler et al., 1998).

This study was aimed to screen the strain producing potent antibiotic substance active against MRSA. Hundreds of actinomycete isolates were obtained from soil samples from various locations in the province of Jeonnam, Korea. Among them, an actinomycete isolate, designated as strain

Correspondence to: Jin Cheol Yoo, Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: 82-62-230-6380, Fax: 82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

## First page preview



Download full text

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27:1238–1249, 2008  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN: 1525-7770 print / 1532-2335 online  
DOI: 10.1080/15257770802458246



## NOVEL SYNTHESIS AND ANTI-HIV ACTIVITY OF 4'-BRANCHED EXOMETHYLENE CARBOCYCLIC NUCLEOSIDES USING A RING-CLOSING METATHESIS OF TRIENE

Hua Li, Jin Cheol Yoo, and Joon Hee Hong

*BK-21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju, Republic of Korea*

□ *The exomethylene of 6 was successfully constructed from the aldehyde 5 using Eschenmoser's reagents. A triene compound 7 was cyclized successfully using Grubbs' II catalyst to give an exomethylene carbocycle nucleus for the target compound. A Mitsunobu reaction was successfully used to condense the natural bases (adenine, thymine, uracil, and cytosine). The synthesized cytosine analogue 20 showed moderate anti-HIV activity ( $EC_{50} = 10.67 \mu M$ ).*

**Keywords** Quaternary carbon; triene; ring-closing metathesis; Mitsunobu reaction

### INTRODUCTION

The carbocyclic nucleosides<sup>[1]</sup> can potently inhibit viral infection. Due to the absence of a true glycosidic bond, carbocyclic nucleoside analogues are chemically more stable and not subject to the enzymatic degradation that occurs in conventional nucleosides.<sup>[2]</sup> The recent discovery of olefinic carbocyclic nucleosides, such as carbovir **1**<sup>[3]</sup> and entecavir **2**,<sup>[4]</sup> as potential antiviral agents has attracted considerable attention in the search for novel nucleosides of this class. Recently, a number of 4' $\alpha$ -substituted nucleoside<sup>[5]</sup> analogues showed significant antitumor or antiviral activities. Among them, 4'-methyl-2'-deoxycytidine,<sup>[6]</sup> 4'-fluoromethyl-2'-deoxycytidine,<sup>[7]</sup> 4'-hydroxymethylthymidine,<sup>[8]</sup> and 4'-azidomethylthymidine<sup>[9]</sup> demonstrated very potent biological activities, but their high toxicity rendered them ineffectual as drugs.

Based on these results and as part of our drug discovery program, we have designed novel 4'-branched exomethylene carbocyclic nucleosides that

Received 6 May 2008; accepted 4 September 2008.

Address correspondence to Joon Hee Hong, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Republic of Korea. E-mail: hongjh@chosun.ac.kr



## First page preview



Download full text

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27:1186–1196, 2008  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN: 1525-7770 print / 1532-2335 online  
DOI: 10.1080/15257770802400065



## EFFICIENT SYNTHESIS OF 4'-CYCLOPROPYLATED CARBOVIR ANALOGUES WITH USE OF RING-CLOSING METATHESIS FROM GLYCOLATE

Lian Jin Liu, Jin Cheol Yoo, and Joon Hee Hong

*College of Pharmacy, Chosun University, Republic of Korea*

□ *The first synthetic route of novel 4'-cyclopropylated carbovir analogues is described. The construction of cyclopropylated quaternary carbon at 4'-position of carbocyclic nucleosides was successfully made via sequential Johnson's orthoester rearrangement and ring-closing metathesis (RCM) starting from ethyl glycolate. Synthesized compounds 15 and 16 showed moderate antiviral activity without any cytotoxicity up to 100 μmol.*

**Keywords** Carbocyclic nucleoside; antiviral agents; ring-closing metathesis; Claisen rearrangement

### INTRODUCTION

The finding that thymidine analogue with 4'-azido<sup>[1]</sup> and 4'-cyano group<sup>[2]</sup> show significant inhibitory activity against HIV proliferation has stimulated the synthesis of 4'-substituted nucleoside analogues. Recently, 4'-homologated stavudine<sup>[3]</sup> thiostavudine<sup>[4]</sup> analogue, especially ethenyl and ethynyl, are molecules of considerable interest. One of reasons for this prominence arises from the notable biological activities as antiviral and antitumor agents.

Carbocyclic nucleosides<sup>[5]</sup> are a group of compounds structurally similar to natural nucleosides in which the furanose oxygen is replaced by a methylene group. Replacement of the furanose ring oxygen by carbon is of particular interest since the resulting carbocyclic nucleosides possess greater metabolic stability to the phosphorylase,<sup>[6]</sup> which cleave the glycosidic bond

Received 31 January 2008; accepted 30 July 2008.

This study was supported by the Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, 2008.

Address correspondence to Joon Hee Hong, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Republic of Korea. E-mail: hongjh@chosun.ac.kr

**ENHANCEMENT OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub>- AND ALL-TRANS RETINOIC ACID-INDUCED DIFFERENTIATION OF HUMAN LEUKEMIA HL-60 CELLS BY BLOOD SHELL, SCAPHARCA BROUGHTONII**

SEUNG HYUN KIM<sup>1</sup>, TAE SUNG KIM<sup>1</sup>, JUNE WOO LEE<sup>2</sup> and JIN CHEOL YOO<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>*School of Life Sciences and Biotechnology  
Korea University  
Seoul, Korea*

<sup>2</sup>*Department of Environmental Engineering  
College of Applied Science  
Catholic University of Pusan  
Pusan 607-757, Korea*

<sup>3</sup>*Department of Pharmacy  
Chosun University  
Gwangju 501-759, Korea*

**ABSTRACT**

*Human myeloid leukemia HL-60 cells are differentiated into monocytic or granulocytic lineage when treated with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-[OH]<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) or all-trans retinoic acid (RA), respectively. In this study, the effect of ethanol fraction prepared from the blood shell, Scapharca broughtonii, on cell differentiation was investigated in an HL-60 cell culture system. Treatment of HL-60 cells with 2.5- to 20-μg/mL ethanol fraction of the blood shell for 72 h inhibited cell proliferation and induced a 20% increase in cell differentiation, as demonstrated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium and nitroblue tetrazolium reduction assay. Interestingly, synergistic induction of HL-60 cell differentiation was observed when the ethanol fraction of the blood shell was combined with either 5-nM 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> or 50-nM all-trans RA. Flow cytometric analysis and morphologic studies confirmed that combinations of either 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> or all-trans RA and the ethanol fraction of the blood ark shell stimulated leukemia cell*

<sup>4</sup> Corresponding author. TEL: +82-62-230-6380; FAX: +82-62-227-3963; EMAIL: jcyu@chosun.ac.kr

## Articles

## Stereoselective Synthesis of a Novel Cyclohexene Version of Carbovir

Hua Li and Joon Hee Hong\*

BK-21 Team, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea. \*E-mail: hongjh@chosun.ac.kr  
Received July 31, 2007

This paper describes a racemic and stereoselective synthetic route for a novel cyclohexenyl carbocyclic adenine analogue. The required stereochemistry of the target compound was controlled using a stereoselective glycolate Claisen rearrangement followed by  $\alpha$ -chelated carbonyl addition. The introduction of 6-chloropurine was achieved using Mitsunobu conditions, and further modifications of the corresponding heterocycle gave the target cyclohexenyl nucleoside.

**Key Words :** Carbovir, Glycolate Claisen rearrangement,  $\alpha$ -Chelation

## Introduction

Carbocyclic nucleosides are pharmaceutically important compounds that have significant antiviral activity. The discovery of olefinic carbocyclic nucleosides such as carbovir **1**<sup>1</sup> and 6-hydroxymethyl carbovir **2**<sup>2</sup> are of particular interest because they represent a new class of compounds that exhibit significant anti-HIV activity. However, the toxicity<sup>3</sup> and emerging drug-resistant virus strands<sup>4</sup> are factors limiting their therapeutic applications. Recently, the fundamental modification of the pentofuranose moiety such as cyclohexenyl carbocyclic nucleosides<sup>5,6</sup> were reported to be compatible with their antiviral activity.<sup>7</sup> The presence of a double bond induces flexibility in the six-membered ring that is similar to the flexibility of a furanose ring.<sup>8</sup> Furthermore, the conformational adaptability of a cyclohexenyl nucleoside to external agents was demonstrated by observing that its conformation is different when incorporated in different double-stranded DNA sequences.<sup>9</sup> Cyclohexenyl nucleic acid hybridizes with both DNA and RNA, even though this effect is sequence-dependent.<sup>10</sup> Therefore, a deoxy cyclohexenyl nucleoside can be considered a constitutional mimic of a natural deoxynucleoside.

Stimulated by the interesting antiviral activity of cyclohexenyl nucleosides as well as the particular curiosity of the regulation of gene expression by small interfering RNAs, this study designed and synthesized novel cyclohexene nucleoside in which the heterocycle and hydroxymethyl moiety were placed in the 1,3-position. This paper reports its stereocontrolled synthesis procedure using an  $\alpha$ -chelation controlled glycolate Claisen rearrangement and an  $\alpha$ -chelation controlled Grignard addition reaction as the key reactions.

## Results and Discussion

The  $\alpha,\beta$ -unsaturated methyl ester **3**, which is readily

obtained using a well-known procedure,<sup>11</sup> was reduced by DIBALH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to give the allylic alcohol **4**. This was protected with *t*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) to give compound **5**. The isopropylidene protecting group of compound **5** was hydrolyzed by 70% acetic acid to provide the diol **6**. The selective mono-silylation of the diol **6** with TBDMSCl at  $-10^\circ\text{C}$  gave compound **7**, which was then converted to the benzyloxymethyl-protected allylic glycolate ester **8** under DCC and DMAP conditions.<sup>12</sup>

In this study, the chelation-controlled modification of the Ireland's ester enolate Claisen rearrangement (LHMDS, TMSCl/TEA)<sup>13</sup> was used to convert the allylic glycolate ester **8** to a  $\gamma,\delta$ -unsaturated glycolate **9**, possibly through a chelation-controlled chair-like transition state, to give the crude acid (Figure 2). The crude acid was treated directly with  $\text{CH}_2\text{I}_2$  in the presence of Triton-B, which produced the desired product **9** in a highly stereoselective manner. A notable increase in the diastereoselectivity resulted from the introduction of an  $\alpha$ -substituent in the allylic system. A single diastereomer could be obtained with the majority of  $\alpha$ -benzyloxy substrates.

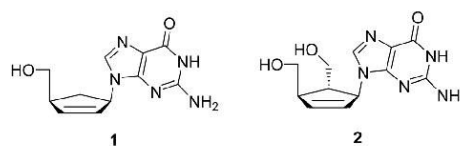


Figure 1. Structures of potent carbovir analogues.

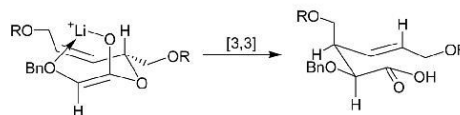


Figure 2.  $\alpha$ -chelation controlled [3,3]-sigmatropic rearrangement.



## Single Oral Dose Toxicity Evaluation of CS682, a Fermentation Product of Korean Soil Bacteria, in Rats

Jong-Chan Lee<sup>1</sup>, Tai-Hwan Ahn<sup>1</sup>, Sung-Su Kang<sup>1</sup>, Changjong Moon<sup>1</sup>, Chun-Sik Bae<sup>1</sup>,  
Sung-Ho Kim<sup>1</sup>, Jin-Cheol Yoo<sup>2</sup> and Jong-Choon Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, Korea

Antibacterial feed additives are widely used in many countries worldwide to improve growth rate and prevent the diseases of animals. The present study was carried out to investigate the potential acute toxicity of CS682, a fermentation product of Korean soil bacteria, by a single oral dose in Sprague-Dawley rats. The test article was orally administered once by gavage to male and female rats at dose levels of 0, 2.5, 5.0 and 10 ml/kg body weight (n=5 for male and female rats for each dose). Mortalities, clinical findings, and body weight changes were monitored for the 14-day period following the administration. At the end of 14-day observation period, all animals were sacrificed and complete gross postmortem examinations were performed. Throughout the study period, no treatment-related deaths were observed. There were no adverse effects on clinical signs, body weight, and gross finding at any dose tested. The results showed that the single oral administration of CS682 did not induce any toxic effect at a dose level of below 10 ml/kg in rats and that the minimal lethal dose were considered to be over 10 ml/kg body weight for both sexes.

**Key words:** Feed additive, CS682, acute toxicity, median lethal dose (LD<sub>50</sub>), rat

Received 20 November 2007; Accepted 3 December 2007

The use of veterinary pharmaceuticals has become integral to the growing animal food industry. In Korea there are approximately 2.7 million cattle, 121 million chickens, and 10 million swine (MAF, 2007). In the United States there are approximately 104-110 million cattle, 7.5-8.6 billion chickens, 60-92 million swine, and 275-292 million turkeys (AHI, 2002; NASS, 2002). To maintain economic viability, large agribusinesses began contracting with individual farmers. This arrangement offered a guaranteed price to the farmer and a controlled and stable animal food-producing environment for the agribusiness. The close proximity of the large numbers of animals at these facilities and the potential for the rapid spread of disease has made routine use of pharmaceuticals necessary to maintain the viability of their operations.

Veterinary antibiotics are among the most widely administered for animal health and management. The term 'antibiotic' is normally reserved for a diverse range of compounds, both

natural and semi-synthetic, that possess antibacterial activity (Prescott and Baggot, 1993; Kanfer et al, 1998). Hundreds of veterinary antibiotics have appeared on the market and are available for use in animals to treat diseases, as growth promoters, and to improve feed efficiency (Addison, 1984). In pork production, antibiotics are commonly included in feed at subtherapeutic levels for 2 main economic reasons: disease prevention and growth promotion. According to Dewey *et al.* (1997, 1999), antibiotics are currently used in 90% of starter rations, 75% of grower rations, and 50% of finisher rations for pigs. In the past, it was recognized that subtherapeutic levels of antibiotics had a positive effect on growth performance and herd health (Cromwell, 2002; Florea and Nightingale, 2004). Feeding antibiotics to swine has been shown to increase weight gain by 3.3% to 8.8% and to improve feed utilization efficiency by as much as 7%. However, because antibiotic supplementation in animal feeds may result in bacterial resistance to antibiotics, and residues of antibiotics may be hazardous to human health, supplementation of antibiotics should be limited, and alternative sources of equal efficacy need to be evaluated (Hahn *et al.*, 2006).

CS682 is a liquid fermentation product of Korean soil bacteria *Streptomyces spp.*, developed by Chosun University

\*Corresponding author: Jong-Choon Kim, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, 300 Yongbongro, Buk-gu, Gwangju 500-757, Korea  
Tel: +82-62-530-2827  
Fax: +82-62-530-2809  
E-mail: toxkim@chonnam.ac.kr



## Modulation of parkin gene expression in noradrenergic neuronal cells

Euteum Park<sup>a,b,1</sup>, Seung Kim<sup>a,1</sup>, Sung-Jun Kim<sup>a</sup>, Yeol Park<sup>a</sup>, Jung-Sup Lee<sup>a,b</sup>,  
Jin-Cheol Yoo<sup>c</sup>, Chun-Sung Kim<sup>d</sup>, Do Kyung Kim<sup>d</sup>, Sook-Young Lee<sup>b</sup>, Hong Sung Chun<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biotechnology (BK21 Program), Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>b</sup>Research Center for Proteineous Materials, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>c</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>d</sup>Department of Oral Physiology, College of Dentistry (BK21 Program), Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

Received 24 July 2006; received in revised form 1 September 2007; accepted 5 September 2007

### Abstract

Typical autosomal recessive juvenile Parkinsonism (AR-JP) is resulted from the loss of function mutation in the parkin gene. In an effort to learn more about the cell type-specific functional role of parkin, we used *in vitro* model such as locus coeruleus (LC) noradrenergic (NA) neuronal progenitor cell line, LC3541. Employing this *in vitro* model, we revealed that parkin plays a crucial role in phenotypic differentiation of NA neurons. Our results showed that parkin mRNA was expressed during the differentiation of NA neuronal progenitor cell line and that the level of the parkin mRNA was down-regulated by oxidative stress in the NA neuronal cells. Parkin protein overexpression in LC3541 cells induced expression of NA markers (TH, phox2a and DBH). Small interfering RNA (siRNA) for parkin suppressed NA differentiation and DBH expression. Preventing protein kinase A (PKA) activation with PKI attenuated expression of DBH in parkin overexpressed LC3541 cells. These findings suggest that the relative abundance of parkin enhances differentiation of NA phenotypes via a PKA-dependent pathway.

© 2007 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Parkin; DBH; Differentiation; Noradrenergic neuron

### 1. Introduction

In Parkinson's disease (PD) the selective loss of brain dopaminergic (DA) neurons in substantia nigra (SN) and noradrenergic (NA) neurons in locus coeruleus (LC) leads to motor dysfunction. The specific etiological mechanism underlying the selective DA and NA neuronal loss in both familial and sporadic PD is unknown. Approximately 10–15% of PD patients appear to have a family history. During the past years, mutations in various different genes, parkin,  $\alpha$ -synuclein, DJ-1 and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (UCH-L1), were identified as responsible for some cases of familial PD (Kitada et al., 1998; Leroy et al., 1998; Moore et al., 2005; Morris, 2005). In human brain, the expression of parkin,  $\alpha$ -synuclein,

DJ-1 and UCH-L1 was not limited to the affected neuronal sites in PD, but rather widely expressed in many brain regions (Solano et al., 2000). However, the neuronal losses in PD are specifically restricted to DA neurons in SN as well as NA neurons in LC. The molecular mechanism(s) underlying the selective neuronal vulnerability produced by these mutations remains unidentified.

The clinical symptoms of AR-JP are typical of PD. The classic triad symptoms (tremor, rigidity and bradykinesia), gait freezing, foot dystonia, hyperreflexia and retropulsion are prominent and are responsive to levodopa treatment (Hamani and Lozano, 2003). Several distinct pathologic features of AR-JP suggest a significant difference in the neurodegenerative process from that found in typical idiopathic PD. First, peak age of onset is in the 20s with earliest onset at age 8 (Ishikawa and Tsuji, 1996; Matsumine et al., 1998; Hayashi et al., 2000). The clinical progression of the symptoms is slower than in typical idiopathic PD, with the mean duration at  $22 \pm 10$  years. In contrast, in typical early onset idiopathic PD, the peak onset age is in the 40s and aging is a major risk factor (Moghal et al., 1994). Second, there was significant neuronal loss with gliosis in the ventrolateral and medial

**Abbreviations:** AR-JP, autosomal recessive juvenile Parkinsonism; DA, dopaminergic; LC, locus coeruleus; NA, noradrenergic; PD, Parkinson's disease; SN, substantia nigra; TCA, trichloroacetic acid; UCH-L1, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase.

\* Corresponding author. Tel.: +82 62 230 6609; fax: +82 62 230 6609.

E-mail address: hsjeon@chosun.ac.kr (H.S. Chun).

<sup>1</sup> These authors are equally contributed to this study.

0736-5748/\$30.00 © 2007 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.09.005

## Biosynthesis of dTDP-6-deoxy- $\beta$ -D-allose, biochemical characterization of dTDP-4-keto-6-deoxyglucose reductase (GerK1) from *Streptomyces* sp. KCTC 0041BP

Ta Thi Thu Thuy<sup>2</sup>, Kwangkyoung Liou<sup>2</sup>, Tae-jin Oh<sup>2</sup>,  
Dea Hee Kim<sup>3</sup>, Doo Hyun Nam<sup>4</sup>, Jin Cheol Yoo<sup>5</sup>,  
and Jae Kyung Sohng<sup>1,2</sup>

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Institute of Biomolecule Reconstruction (iBR), SunMoon University, 100, Kalsan-ri, Tangjeong-myeon, Asansi, Chungnam 336-708, South Korea; <sup>3</sup>GeneChem Inc., 59-1, Jang-Dong, Yusong-Gu, Daejeon 305-390, South Korea; <sup>4</sup>Department of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan, Kyungbuk 712-749, South Korea; and <sup>5</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, South Korea

Received on March 14, 2006; revised on September 28, 2006; accepted on October 10, 2006

**dTDP-6-deoxy-D-allose, an unusual deoxysugar, has been identified as an intermediate in the mycinose biosynthetic pathway of several macrolide antibiotics. In order to characterize the biosynthesis of this deoxysugar, we have cloned and heterologously overexpressed *gerK1* in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. This gene encodes for a protein with the putative function of a dTDP-4-keto-6-deoxyglucose reductase, which appears to be involved in the dihydrochalcone (GERI-155) biosynthesis evidenced by *Streptomyces* sp. KCTC 0041BP. Our results revealed that GerK1 exhibited a specific reductive effect on the 4-keto carbon of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-allose, with the hydroxyl group in an axial configuration at the C3 position only. The enzyme catalyzed the conversion of dTDP-4-keto-6-deoxyglucose to dTDP-6-deoxy- $\beta$ -D-allose, according to the results of an in vitro coupled enzyme assay, in the presence of GerF (dTDP-4-keto-6-deoxyglucose 3-epimerase). The product was isolated, and its stereochemistry was determined via nuclear magnetic resonance analysis.**

**Keywords:** deoxysugar biosynthesis/dTDP-6-deoxy-D-allose/dTDP-4-keto-6-deoxyglucose reductase/*Streptomyces*

### Introduction

Deoxysugars, all of which harbor certain hydroxyl groups that have been replaced by a hydrogen atom, an amino group, and an alkyl side chain, are vital constituents of the aglycon core of several bacterial antibiotics and anticancer drugs. Functionally, these deoxysugars participate in the recognition and interaction of bioactive compounds with drug targets (Weymouth-wilson

1997; Hecht 1999; Hansen et al. 2002). Therefore, they play a crucial role in the optimal biological antibiotic activity of bioactive compounds, and the removal of these moieties has been shown to strongly influence or completely abolish the antibacterial activity of certain compounds (Rohr 1997). Among the unusual sugars, dTDP-6-deoxy-D-allose has been identified as a crucial intermediate in the mycinose biosynthetic pathway of several macrolide antibiotics, including dihydrochalcone (GERI-155 used in this study; Jaishy et al. 2006), tylosin (Fouces et al. 1999), chalcone (Ward et al. 2004), and mycinamycin II (Anzai et al. 2003). Structurally, this sugar attaches to the macrolactone by the glycosidic linkage with the activity of the glycosyltransferase (Wilson and Cundliffe 1998) and requires a primary hydroxyl group at C20 of the macrolactone with the activity of a P450 enzyme (Fouces et al. 1999; Ward et al. 2004). The biosynthetic pathway of dTDP-6-deoxy-D-allose is presumably comprised of several enzyme reaction steps. It begins with the nucleotidyl activation of glucose-1-phosphate to form dTDP-D-glucose by the activity of dTDP-D-glucose synthase, GerD (Lee, Sohng, Kim, Nam, Han et al. 2004), and TylA1 (Merson-Davies and Cundliffe 1994). Catalysis by dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase, GerE (Lee, Sohng, Kim, Nam, Seong et al. 2004), and TylA2 (Merson-Davies and Cundliffe 1994) results in the formation of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose, a common intermediate in the biosynthetic pathways of the majority of the deoxysugars derived from dTDP-D-glucose (Rodriguez et al. 2002; Lombo et al. 2004; Maki and Renkonen 2004). Finally, the reduction of the 4-carbonyl carbon by 4-ketoreductase TyID (Bate and Cundliffe 1999; Fouces et al. 1999) (GerK1 in this study) should occur after the 3-epimerization of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose by dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3-epimerase GerF (Sohng et al. 2004) (Figure 1B). We have recently isolated the mycinose gene cluster involved in the dihydrochalcone biosynthesis from *Streptomyces* sp. KCTC 0041BP (GenBank accession no. AY118081). Six open reading frames (ORFs) (*gerE*, *gerD*, *gerF*, *gerK1*, *gerM2*, and *gerM3*) were predicted to be mycinose biosynthetic genes. Out of these six ORFs, *gerK1* was suggested to encode for dTDP-4-keto-6-deoxyhexose reductase and was thought to be involved in the biosynthesis of dTDP-6-deoxy-D-allose.

The dTDP-4-keto-6-deoxyhexose reductases are very important enzymes and are found in the abundant deoxysugar gene clusters of secondary metabolites. These enzymes have been demonstrated to catalyze a reduction at the C4 keto of activated sugars with different stereochemistry, thereby

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed; Tel: +82 41-530-2246; Fax: +82 41-544-2919; e-mail: sohng@sunmoon.ac.kr

© 2006 The Author(s)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Purification and Biochemical Properties of Phospholipase D (PLD<sub>57</sub>) Produced by *Streptomyces* sp. CS-57

Jaya Ram Simkhada, Seung Sik Cho, Hyo Jung Lee, and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received June 20, 2007)

*Streptomyces* sp. CS-57, which was isolated from Korean soil, was found to produce phospholipase D (PLD<sub>57</sub>) as an extracellular enzyme when cultured in medium containing 2% glucose, 1.5% yeast extract, 0.5% trypton, and 0.1% calcium carbonate at 28°C and 160-rpm. PLD<sub>57</sub> was purified using Sepharose CL-6B column chromatography, and DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange column chromatography. The specific activity of the purified enzyme increased 6.7 fold with 3% recovery. The purified enzyme was then analyzed using 12% SDS-PAGE, which revealed that the molecular mass of the purified enzyme was 55 kDa. PLD<sub>57</sub> showed both hydrolytic (H) and transphosphatidylolation (T) activity, and the optimum temperatures of these activities were found to be 45°C and 35°C, respectively. Similarly, both of these activities were found to be optimal at a pH of 7.5. In addition, even after being heat treated at 45°C for up to 2 h, the enzyme activity remained at 100%, and the H-activity was found to be stable at a pH of 6 to 8. Further, enzyme activity occurred in the presence of EDTA, indicating that metal ions are not required for their activity, although some metal ions did marginally increase the activity. Enzyme activity also increased by 75% in the presence of Triton-X 100 at a concentration of 0.375 %; however, none of the other detergents evaluated in this study were found to enhance enzyme activity.

**Key words:** Phospholipase D, Purification, *Streptomyces*, Hydrolytic activity, Transphosphatidylolation activity

### INTRODUCTION

Phospholipase D (PLD EC 3.1.4.4) is an extracellular enzyme that is a member of the PLD super family of proteins (Hammond *et al.*, 1995; Ponting *et al.*, 1996), which is produced by bacteria, plants and mammals (Soucek *et al.*, 1967; Saito *et al.*, 1974). This enzyme exhibits two types of reactions, hydrolysis and transphosphatidylolation. When this enzyme hydrolyzes phospholipids, such as phosphatidylcholine, it forms phosphatidic acid (PA) and choline. Conversely, when this enzyme catalyzes transphosphatidylolation reactions, it forms different phospholipids in the presence of corresponding alcohols (Waite, 1999; Liscovitch *et al.*, 2000). The two reactions catalyzed by PLD compete with each other, and it appears that the product formed during the transphosphatidylolation reaction is often hydrolyzed by PLD (Juneja *et al.*, 1987). Several

studies have been conducted to evaluate the relationship that exists between the hydrolytic and transphosphatidylolation activity of PLD, and it has been found that PLDs produced by *Actinomycetes* show higher transphosphatidylolation activities than those produced by plants and mammals (Juneja *et al.*, 1989; Virto *et al.*, 2000; Hirsche and Ulbrich-Hofmann, 2000). In addition, many investigations have been conducted to evaluate the synthesis of various phospholipids using PLDs produced by *Actinomycetes* (Takami *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993). PLDs have also been implicated in various cellular processes, such as transmembrane signaling, intracellular protein trafficking, secretion, alteration of cell morphology and motility (Morris *et al.*, 1997; Pappan *et al.*, 1997). However, under abnormal conditions, PLDs may also play a critical role in ischemic, traumatic and neurodegenerative disorders of the central nervous system (Phillis and O'Regan, 2004). The transphosphatidylolation reaction is important in the synthesis of scarce phospholipids, such as phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol and novel artificial phospholipids (Juneja *et al.*, 1988). Artificial phospholipids are often the target of interest in pharma-

Correspondence to: Jin Cheol Yoo, Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: 82-62-230-6380, Fax: 82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

## Production and Biological Activity of Laidlomycin, Anti-MRSA/VRE Antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684

Jin Cheol Yoo<sup>1</sup>, Jun Ho Kim<sup>1</sup>, Jung Wan Ha<sup>1</sup>, Nae Soo Park<sup>1</sup>, Jae Kyung Sohng<sup>2</sup>, June Woo Lee<sup>3</sup>, Seong Chan Park<sup>4</sup>, Mi Sun Kim<sup>4</sup>, and Chi Nam Seong<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Sunmoon University, Chungnam 337-708, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Environmental Engineering, College of Applied Science, Catholic University of Pusan, Pusan 607-757, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Republic of Korea

(Received September 26, 2006 / Accepted January 1, 2007)

Culture broth of a streptomycete isolate, *Streptomyces* sp. CS684 showed antibacterial activity on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant enterococci (VRE). Among purified substances from the organism, CSU-1, which is active against MRSA and VRE, is a C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>O<sub>12</sub>Na (M<sup>r</sup>, 721.3875), and identified as laidlomycin. The anti-MRSA and anti-VRE activity of CSU-1 was stronger than oxacillin and vancomycin. Phylogenetic analysis showed that strain CS684 is very similar to *Streptomyces ardens* NRRL 2817<sup>1</sup>, whereas the ability of *Streptomyces* sp. CS684 to produce laidlomycin was shown to be unique.

**Keywords:** Anti-MRSA, Anti-VRE, polyether antibiotic, laidlomycin, *Streptomyces* sp. CS684

Actinomycetes are widely distributed in natural and man-made environments, and play an important role in the degradation of organic matter. They are also well known as a rich source of antibiotics and bioactive molecules and are of considerable importance in industry (Yoo *et al.*, 2002).

Over the last few years, intrinsic or acquired resistance of enterococci and *Staphylococcus aureus* to many antibiotics, in particular, to  $\beta$ -lactams and glycopeptides, has become a major cause of concern. MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) and VRE (vancomycin resistant enterococci) cause a health risk, especially in patients with severe underlying disease or immunosuppression (Chadwick *et al.*, 1996; Coque *et al.*, 1996).

MRSA emerged from the time methicillin was used first in Europe, and its presence has increasingly been detected throughout the world (Francioli *et al.*, 1991). Up to 80% of the nosocomial infections in hospital were due to MRSA (Kim, 2004). In addition to MRSA, from the first report on VRE in 1986 in Europe, their presence has also been increasingly detected worldwide (Van Horn *et al.*, 1996). In Korea, a VRE strain, *Enterococcus durans* was first isolated in 1992. Since then, the prevalence of VRE in hospitalized patients has been rising significantly (Kim *et al.*, 1995; Seong *et al.*, 2004).

Furthermore, there are cases on record of the isolation of MRSA and VRE from animals and environmental sources. Wide use of antimicrobial agents as feed additives for growth promotion in animal husbandry (Van den Boogaard and Stobberingh, 1996) was one of the reasons. The conjugative transfer of high level vancomycin resistance from *E. faecalis* to

*S. aureus* (Nobel *et al.*, 1992) also supports the spreading of MRSA and VRE. Ultimately, increasing use of antimicrobial agents in human medicine and as animal growth promoters has been related to the emergence of MRSA and VRE (Murray, 1995).

To control antibiotic resistant pathogens, polyether ionophore antibiotics such as monensin, laidlomycin, and salinomycin were developed and used as animal feed (Wampler *et al.*, 1998).

This study was aimed to screen an actinomycete strain producing potent antibiotic substance active against VRE and MRSA. Hundreds of streptomycete isolates were obtained from soil samples from various locations in the province of Jeonnam, Korea. Among them, one streptomycete isolate indexed as CS684 in our culture collection was found to produce a potent antibacterial substance against VRE and MRSA.

### Materials and Methods

#### Isolation and identification of microorganism

Actinomycete isolates were inoculated into OSYM medium consisting of 2% oatmeal, 1% dried yeast, 1% mannitol, 1% soybean meal, and 0.2% CaCO<sub>3</sub> (pH 7.0), and incubated at 30°C on a rotary shaker at 180 rpm. The anti-MRSA/VRE activity of cultured broths was assayed by the paper disc diffusion method. Strain CS684 showed highest anti-MRSA/VRE activity among the isolates screened and then selected for the study of antibiotic production.

Morphological and physiological properties of strain CS684 were determined as described by Williams *et al.* (1983). Aerial spore mass color and spore chain morphology of the strain was observed on inorganic salts-starch agar (ISP medium 4; Difco, USA) (Shirling and Gottlieb, 1966).

\* To whom correspondence should be addressed.  
(Tel) 82-8-61-750-3613; (Fax) 82-2-61-750-5459  
(E-mail) scnu@scnu.ac.kr



## Inhibition of Mouse Macrophages Interleukin-12 Production : Suppression of Nuclear Factor- $\kappa$ B Binding Activity by a Specific Factor Isolated from *Scapharca broughtonii*

Seung Hyun Kim, Tae Sung Kim, June Woo Lee<sup>1</sup>, Jung Wan Ha<sup>2</sup>, Nae Soo Park<sup>2</sup>, Hyo Jung Lee<sup>2</sup>, and  
Jin Cheol Yoo<sup>2</sup>

School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, College of Applied Science, Catholic University of Pusan, Pusan 607-757, Korea, and <sup>2</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received August 30, 2006)

Pharmacological inhibition of interleukin-12 (IL-12) production may allow a therapeutic strategy for preventing development and progression of disease in experimental models of autoimmunity. In this study we investigated the effects of an ethanol fraction of the *Scapharca broughtonii*, on the production of IL-12 by mouse macrophages stimulated with lipopolysaccharides (LPS). The ethanol fraction (S3) prepared from *Scapharca broughtonii* potently inhibited LPS-induced IL-12 production in the RAW264.7 monocyte cell-line in a dose-dependent manner. The activation effect of the ethanol fraction (S3) on the IL-12 gene promoter was analyzed by transfecting RAW264.7 cells with IL-12 gene promoter/luciferase constructs. The repressive effect mapped to a region in the IL-12 gene promoter that contained a binding site for NF- $\kappa$ B. Furthermore, activation of macrophages by LPS resulted in markedly enhanced binding activity to the NF- $\kappa$ B site, which significantly decreased upon addition of the ethanol fraction, indicating that the ethanol fraction of the blood shell inhibited IL-12 production in LPS-activated macrophages via inhibition of NF- $\kappa$ B binding activity.

**Key words:** Blood shell, *Scapharca broughtonii*, Interleukin-12, Macrophage, NF- $\kappa$ B, RAW264.7 cell

### INTRODUCTION

Interleukin-12 (IL-12) is a heterodimeric cytokine composed of two disulfide-linked subunits of 35 (p35) and 40 (p40) kDa encoded by two separate genes. Inducible expression of IL-12 has been demonstrated in phagocytic cells and other antigen-presenting cells in response to stimulation by a variety of microorganisms as well as by their products (Ma and Trinchieri, 2001). The expression of the p40 subunit is highly inducible and is regulated primarily at the transcriptional level (Kang *et al.*, 1996). Two major regulatory sites have been identified which bind inducible proteins belonging to the Ets and NF- $\kappa$ B families of transcription factors (Gri *et al.*, 1998).

IL-12 is known to exert multiple biological activities mainly

through T and natural killer cells by inducing their production of interferon- $\gamma$ , which augments their cytotoxicity, and by enhancing their proliferation potential (Adorini, 1999). IL-12 production is critical for the development of T helper type 1 cells and the initiation of cell-mediated immune responses. Recent evidence points to a critical role for IL-12 in the pathogenesis of rodent models of such Th1-mediated autoimmune diseases as type-1 diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, and acute graft-versus-host reactions (Adorini, 1999). Thus, the pharmacological control of IL-12 production may offer a key strategy in understanding the modulation of specific immune-mediated diseases that are dominated by type-1 cytokine responses.

The blood shell (blood ark shell), *Scapharca broughtonii*, is an economically important edible bivalve and widely cultivated off the Southern coast of Korea. Blood ark shells have received attention in pharmacological research due to their contents of various D-amino acid and D-

Correspondence to: Jin Cheol Yoo, Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: 82-62-230-6380, Fax: 82-62-227-3963  
E-mail: jcyu@chosun.ac.kr

부록 2. 특허

등록특허 10-0762573



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년08월29일
A23L 1/212 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0762573
A23L 1/23 (2006.01)	(24) 등록일자	2007년08월21일
A23L 1/221 (2006.01)		

(21) 출원번호	10-2006-0072808	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2006년03월02일	(43) 공개일자
실사청구일자	2006년03월02일	

(73) 특허권자      조선대학교산학협력단  
                         광주광역시 동구 석곡동 375, 조선대학교 산학기획팀

(72) 발명자      정연숙  
                         광주 학구 일죽동 ;

                         황인덕  
                         광주 광산구 신동 ;

                         윤정훈  
                         대전 유성구 학가동 ;

                         과우다알 밀리 프라산  
                         광주 서구 화정4동 ;

                         박가영  
                         광주 남구 주월동 ;

                         전계열  
                         광주 북구 무암동 ;

                         유진원  
                         광주 남구 김현동 ;

                         함정수  
                         서울 서대문구 대현동 ;

(74) 대리인      최규환

(56) 선행기술조사문헌  
KR1020060031740 A

심사관 : 김재현

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 소화속진을 위한 발효액



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(46) 공고일자 2008년02월28일  
(11) 등록번호 10-0807196  
(24) 등록일자 2008년02월19일

(51) Int. Cl.  
A61K 35/56 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2006-0128305  
(22) 출원일자 2006년12월16일  
입사청구일자 2006년12월16일  
(66) 선행기술조사문헌  
US4584197 B

(73) 특허권자  
조선대학교산학협력단  
장주광역시 동구 서석동 376, 조선대학교 산학기  
협합

(72) 발명자  
유진철  
광주 남구 진월동 1  
김재성  
서울 용양구 독1동  
(최연영 지주)

(74) 대리인  
조광형

전체 청구항 수 : 총 2 항

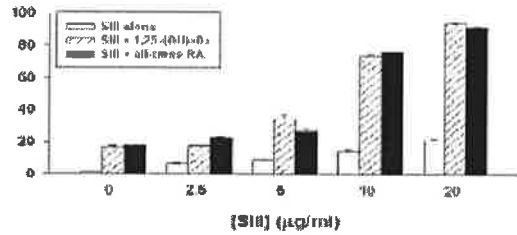
심사관 : 한정희

(54) 피조개 추출물을 포함하는 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 피조개로 부터 유기용매 및 활성탄을 처리하여 수득한 피조개 추출물, 상기 추출물의 제조방법, 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 진균수구성 박멸용 치료제 및 면역-대개 질환의 치료제에 관한 것이다. 본 발명의 피조개 추출물은 진균수구성 폐혈병의 유발을 억제시킬 수 있고, 자가면역질환의 유발을 억제시킬 수 있으며, 항암제 또는 다양한 면역질환의 치료에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
A61K 31/352  
A61P 43/00

(11) 공개번호 10-2004-0014007  
(43) 공개일자 2004년02월14일

(21) 출원번호 10-2002-0047171  
(22) 출원일자 2002년03월09일

(71) 출원인 최원희  
광주광역시 남구 봉선2동

(72) 발명자 최원희  
광주광역시 남구 봉선2동

유진필  
광주광역시 남구 건원동

송재경  
충청남도 아산시 신창면

함경수  
서울특별시 서대문구 대현동

이인화  
광주광역시 서구 봉암동

(74) 대리인 이원희

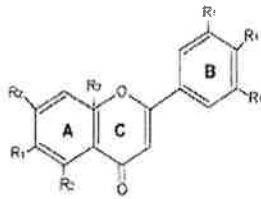
심사청구 : 없음

(54) 플라보노이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 화학감각제

요약

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 화학감각제(chemosensitizer)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 낮은 화학감각 효과를 나타내는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 화학감각제 또는 F-당단백질에 의해 매개되는 다량분해성 억제제에 관한 것이다. 본 발명의 화학감각제는 장암제의 활성을 향상시킬 수 있기 때문에 장암제의 용량을 줄일 수 있고, 부작용이 적기 때문에 장암 화학요법과 병용하여 유용하게 사용될 수 있다.

<화학식 1>



상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub> 은 H 또는 OCH<sub>3</sub> 이고, R<sub>2</sub> 는 H, OH 또는 OCH<sub>3</sub> 이다.





(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0071835  
(43) 공개일자 2010년08월29일

<p>(51) Int. Cl. A01N 33/29 (2006.01) A01P 69/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2006-0130854</p> <p>(22) 출원일자 2006년12월19일 상사청구일자 2008년12월19일</p>	<p>(71) 출원인 조선대학교산학협력단 경주광역시 동구 서석동 376, 조선대학교 산학기 획인</p> <p>(72) 발명자 유진철 경주 남구 전물동 김성훈 경주광역시 장신구 양동 김홍성 경주 북구 문후1동</p> <p>(74) 대리인 최성훈</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

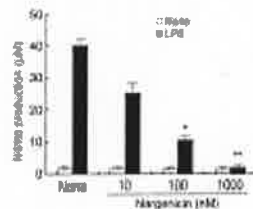
전체 청구항 수 : 총 2 항


(54) 나트륨나신을 포함하는 열충성 신경회생성 질환의 치료용 제약 조성물

(67) 요약

본 발명은 나트륨나신을 주요 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항발증제 및 열충성 신경 회생성 질환용 제약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 ER-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 IL-28 신호를 합성(IL28) mRNA 발현 및 NO 생성을 촉진키 따라서일 수 있으므로 효율적인 항염증제 및 신경회생성 질환의 치료제로 효과적으로 사용될 수 있다.

화 로 도 - 도1



 <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>		<b>(11) 공개번호</b> 10-2009-0093773 <b>(43) 공개일자</b> 2009년09월02일
<b>(61) Int. Cl.</b> A61K 31/40 (2006.01) C07N 1/28 (2006.01) A61P 26/00 (2006.01)	<b>(71) 출원인</b> 조선대학교신약개발단 서울특별시 동구 서석동 375, 조선대학교 신학기 학림	<b>(72) 발명자</b> 송진철 양주 남구 전월동 김희성 서울 중랑구 목1동 평송원 서울특별시 성북구 월곡1동 123-202
<b>(31) 출원번호</b> 10-2008-0107488 <b>(32) 출원일자</b> 2008년10월31일 심사청구일자 없음 <b>(33) 우선권주장</b> 1020080010948 2008년02월28일 대한민국(KR)	<b>(73) 권리인</b> 송진철	

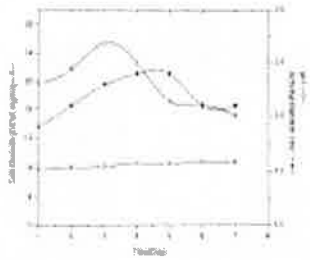
전체 청구항 수 : 총 1 항

**(64) 나르제니신을 포함하는 항암제 조성물**

**(67) 요약**

본 발명은 나르제니신(narasin)을 주요 성분으로 하는 항암제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 특히, 간질수구성 백혈병 치료용 항암제로도 효과적으로 사용될 수 있다.

배 록 도 - 도1





(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0048389  
(43) 공개일자 2010년05월11일

(51) Int. Cl.

G01N 30/09 (2006.01) G01N 30/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0107490

(22) 출원일자 2008년10월31일

실사청구일자 없음

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기  
획팀

(72) 발명자

유권철

황수 남구 진필동

송계경

송남 이상지 방정민 :

조승식

황수광역시 남구 주월동

(74) 대리인

최성용

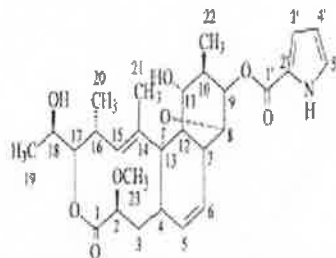
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 나르제니신의 정량분석방법

(57) 요약

본 발명은 노카르디아 속 미생물 배양액중의 나르제니신을 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 정량분석하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 본 발명의 방법은 나르제니신을 미생물 배양 브로쓰로부터 에틸아세타이트로 추출하는 단계, 용액 A (0.5 ml 디포라숨 보스카이르 pH 2.5-용: 아세트니트릴 = 80:20) 및 용액 B (100% 아세트니트릴)를 사용하여 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 215 nm에서 검출하는 단계 및 정량 분석하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법은 무세포 배양 폐지에 존재하는 나르제니신의 양을 신속하고 정확하게 분석하는 방법을 제공하며, 유사한 화합물을 함유하는 기타 세균 배양물의 분석에 유용하게 응용할 수 있음 것으로 사료된다.

대표도 - 도1



관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2008.05.13  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0180)  
출원번호 10-2008-0043926 (접수번호 1-1-2008-0336936-24)  
출원인명칭 조선대학교산학협력단(2-2005-017190-3)  
대리인성명 조광형(9-1999-000433-2)  
발명자성명 유진철 이효정 김태성 송재경 성치남 김성준 정현숙 김종춘 강성수 장소영 조승식

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서 등 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.  
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기를 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다. (단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)  
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kiprls.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기를 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.  
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.  
2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.  
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지([www.kipo.go.kr](http://www.kipo.go.kr))를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동  
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터  
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

(19) 대한민국특허청(KR) (11) 공개번호 10-2011-0054983  
 (12) 공개특허공보(A) (43) 공개일자 2011년06월25일

(51) Int. Cl.  
 C12N 1/68 (2008.01) C12R 1/866 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2009-0111797  
 (22) 출원일자 2009년11월10일  
 심사청구일자 2009년11월10일  
 (71) 출원인  
 조선대학교산학협력단  
 광주광역시 동구 석석동 376 조선대학교 내  
 (72) 발명자  
 유권철  
 광주 남구 진월동 1  
 조승희  
 광주광역시 동구 1  
 박성주  
 전라남도 해남군  
 (74) 대리인  
 최성용

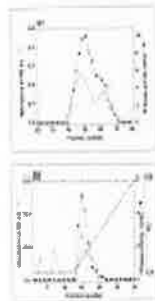
전체 청구항 수 : 총 2 항

(64) 스트렙토마이세스속 균주 유래의 열건용매 효소

(67) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스속 균주 유래의 열건용매 효소에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 효소는 스트렙토마이세스속 균주 *Streptomyces* sp. C3854(수탁번호 ECTC 10631 EP)로부터 분리되고, 특정 효소의 SDS-PAGE 및 효소인 자이보그대과에 의해 약 35 kDa의 분자량을 가지며, 최적 활성은 45°C 및 pH 7-8에서 나타나고, pH 8-9 및 60°C 이하의 온도에서 안정하며, 피브리노겐의 5β-사슬을 가수분해하나, 4α- 및 γ-사슬을 절단하지는 않으며, 아보카세인에 대한 Km, Kcat 및 Kcat/Km 값은 각각 6.2 mg ml<sup>-1</sup>, 306.5 μg min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> 및 158.7 s<sup>-1</sup>이고, 활성은 Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Fe<sup>2+</sup>에 의하여 억압되나, Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>에 의해서는 약한 영향을 받으며, 단백질 활성은 아보모디닌 및 PMSF에 의해 약간 억제되고, 페리클로톡(perfibrate), EDTA 및 EGTA에 의해서는 상당히 억제되는 것을 특징으로 하며, 뛰어난 효소인 분해 능력을 가지므로 열건용매제로서 사용될 수 있다.

도표 도 - 도1



관인생략  
출원번호통지서

출원 일자 2009.11.19  
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0225)  
 출원 번호 10-2009-0111798 (접수번호 1-1-2009-0709655-83)  
 출원인 명칭 조선대학교산학협력단(2-2005-017190-3)  
 대리인 성명 최성용(9-2006-001653-2)  
 발명자 성명 유진철 조승식  
 발명의 명칭 노카르디아속 균주로부터 항균 활성 화합물의 발효 및 분리 정제 방법

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2.
  - 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
  - 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
  - 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매일 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.

\* 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라질 수 있습니다.

  - 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 동의를 승인하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 폐된 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다. 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리되실 예정입니다.
3. 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(결정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.  
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. 미성년자 미성년자의 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직할 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 받을 수 있습니다.
7. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지([www.kipo.go.kr](http://www.kipo.go.kr))를 참고하시기 바랍니다.
8. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동  
 특허청 서울사무소 주소 136-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한근 지식센터  
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

## 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2009.11.06  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 창조번호(0224)  
 출원번호 10-2009-0106758 (접수번호 1-1-2009-0682386-28)  
 출원인명칭 조선대학교산학협력단(2-2005-017190-3)  
 대리인성명 최성용(9-2006-001653-2)  
 발명자성명 유진철 김태성 김승현 이효정 조승식  
 발명의명칭 인상 추출방법을 포함하는 항암제 조성물

### 특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2.
  - 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
  - 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kiporo.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 권의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
  - 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 특별 1차 심사결과통지 예정시기를 역월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원권에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시가 알람 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.

\* 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라질 수 있습니다.

  - 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 동본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 하나)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허(실용신안등록출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.  
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인용 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지([www.kipo.go.kr](http://www.kipo.go.kr))를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동  
 특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터  
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

## 관인생략 출원번호통지서

**출원 일자** 2010.11.23  
**특기 사항** 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0236)  
**출원 번호** 10-2010-0116858 (접수번호 1-1-2010-0764619-97)  
**출원인 명칭** 조선대학교산학협력단(2-2005-017190-3)  
**대리인 성명** 최성용(9-2006-001653-2)  
**발명자 성명** 유진철 유하영 조승식  
**발명의 명칭** 알스토니아속 균주가 분비하는 바이오디젤 생산에 유용한 지방분해 효소

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 건물 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원일 기조로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선권로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자격고환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	0236
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【영칭】	조선대학교산학협력단
【출원인코드】	2-2005-017190-3
【대리인】	
【성명】	최성용
【대리인코드】	9-2006-001653-2
【포괄위임등록번호】	2009-067111-4
【발명의 국문명칭】	탈스토니아속 균주가 분비하는 바이오디젤 생산에 유용한 지방분해 효소
【발명의 영문명칭】	Lipase from <i>Ralstonia</i> sp. CS274 for Producing Biodiesel
【발명자】	
【성명】	유진철
【출원인코드】	4-2000-033153-5
【발명자】	
【성명】	유하영
【성명의 영문표기】	Y00, Hah-Young
【주민등록번호】	
【우편번호】	502-781

## 관인생략 출원번호통지서

**출원 일자** 2011.12.22  
**특기사항** 심사청구(무) 공개신청(무) 정조번호(0249)  
**출원 번호** 10-2011-0140000 (접수번호 1-1-2011-1022317-79)  
**출원인 명칭** 조선대학교산학협력단(2-2005-017190-3)  
**대리인 성명** 최성용(9-2006-001653-2)  
**발명자 성명** 유진철 조승식 최문희 박다정 송재경 성치남 유하영  
**발명의 명칭** 스트렙토마이세스 속 유래의 신규한 지질분해효소 및 그의 생산 방법

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부장번호 : 0131(기공코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(경장), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원권 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록일 전 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 권을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내  
 \* 미국특허상표청의 출원권 기초로 우리나라에 우선권 주장할 때, 출원인이 미국특허청에, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [상자적고항허가서(PTO/SB/S9)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원 사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

### 관인생략 출원번호통지서

**출원일자** 2011.12.23  
**특기사항** 심사청구(유) 공개신청(무) 창조번호(0248)  
**출원번호** 10-2011-0140964 (접수번호 1-1-2011-1027007-92)  
**출원인명칭** 조선대학교산학협력단(2-2005-017190-3)  
**대리인성명** 최성용(9-2006-001653-2)  
**발명자성명** 유진철 조승식 최유환  
**발명의명칭** 중온성 스트럼토타이세스속 유래의 바이오디젤 생산을 촉매하는 신규 냉온-극온성 지질분해효소 및 그의 생산 방법

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 실사 조형상등 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 권을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내  
 \* 미국특허상표청의 출원일 기준은 우리나라에 우선권주장출원 시, 출원일이 미국기준일이며, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자국외출원허가서(PTO/95/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

# 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2011.12.22  
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 검토번호(0250)  
 출원번호 10-2011-0140010 (접수번호 1-1-2011-1022417-36)  
 출원인명칭 조선대학교산학협력단(2-2005-017190-3)  
 대리인명칭 최성용(9-2005-001653-2)  
 발명자명칭 유진철 조승식 최문환  
 발명의명칭 항균 화합물을 생산하는 신규한 스트렙토마이세스속 균주

## 특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(명칭), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허청 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원인 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원권을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안용 12월, 상표·디자인용 6월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 6개월 이내에 미국특허상표청에 [선다국외출원허가서(PTO/39/99)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2011-0-00000000, 상표등록출원 40-2010-00000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년03월14일  
(11) 등록번호 10-1022564  
(24) 등록일자 2011년03월08일

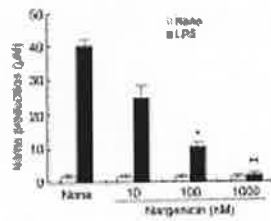
(51) Int. Cl. A61P 35/10 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)	(73) 특허권자 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 석곡동 376 조선대학교 내
(21) 출원번호 10-2008-0192854	(72) 발명자 유권철 장우 남규 권철동 김성훈 광주광역시 광안구 관동성 광주 북구 관동2동
(22) 출원일자 2008년12월10일 심사청구일자 2008년12월10일	(74) 대리인 최성훈
(86) 국제번호 10-2010-0071836	
(43) 공개일자 2010년08월29일	
(68) 선행기술조사문헌 CR19044442970 A1	
전체 청구항 수 : 총 2 항	심사관 : 박정훈

(64) 나트륨이온을 포함하는 염증성 신경퇴행성 질환의 치료용 제약 조성물

(87) 요약

본 발명은 나트륨이온을 주요 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증제 및 염증성 신경 퇴행성 질환용 제약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 ER-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 염증 인자를 합성(A02) mRNA 발현 및 10 배수를 완전히 억제시킬 수 있으므로 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환을 치료제로 효과적으로 사용될 수 있다.

도면 - 도1





# 특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1040468 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2008-0043926 호
	출원일 (FILING DATE (YYMMDD))	2008년 05월 13일
	등록일 (REGISTRATION DATE (YYMMDD))	2011년 06월 02일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
새로운 노카르디아 속 균주 및 그의 발효 배양물의 용도

특허권자 (PATENTEE)  
조선대학교산학협력단( 200171-0\*\*\*\*\* )  
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

발명자 (INVENTOR)  
등록사항관에 기재

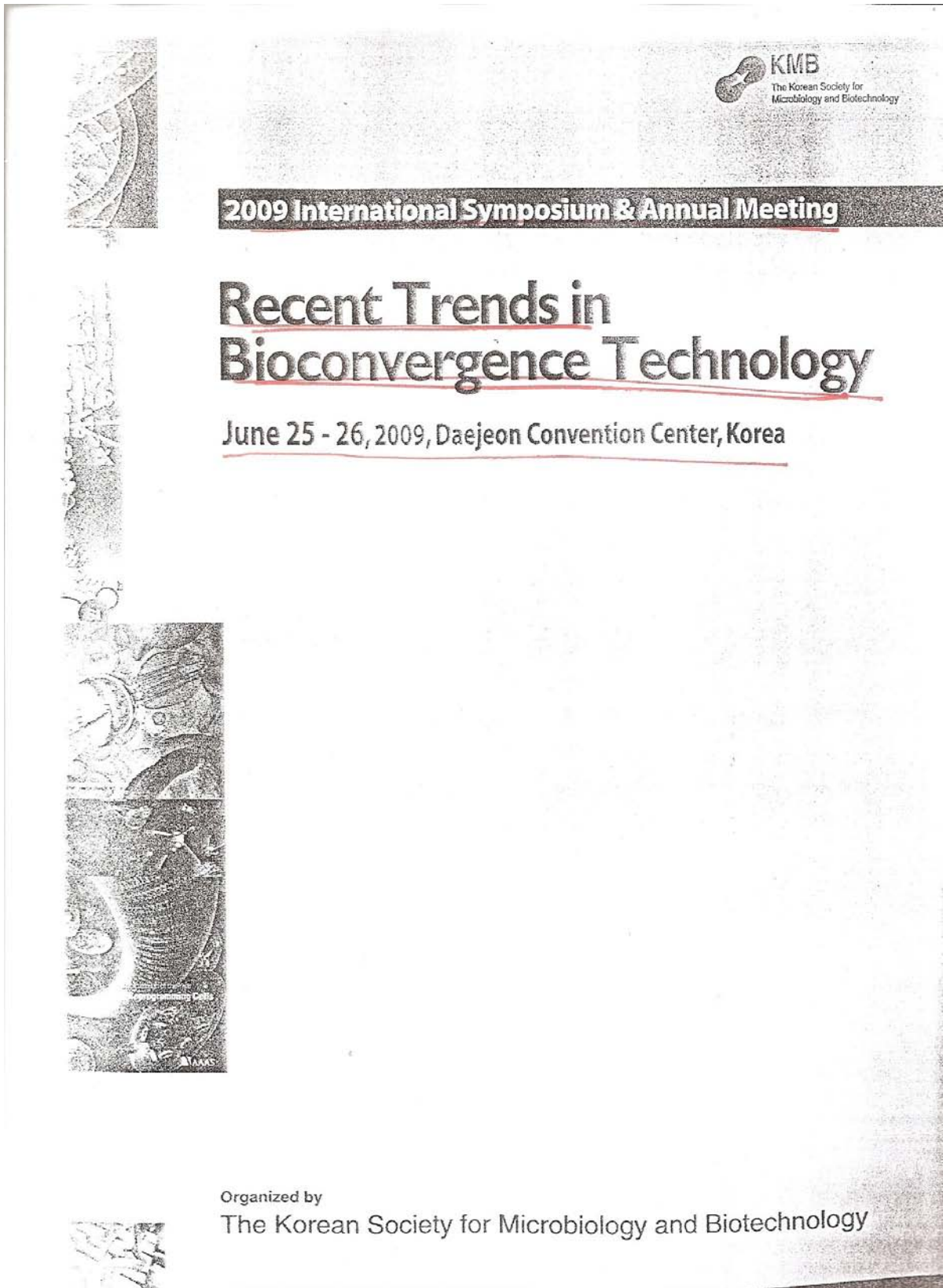
위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록  
되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN  
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2011년 06월 02일



연차등록료 납부일은 실정등록일 이후 4년차부터 매년 06월 02일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인하십시오.

부록 3. 학술회의 발표





F-32

### Production Optimization of Non-Quinone Geldanamycin Derivatives, WK88-1, WK88-2, and WK88-3 from AHBA Synthase Knockout Strain *S. hygroscopicus* AC2

Seo-Jung HONG<sup>1</sup>, Joon-Tae PARK<sup>1</sup>, An-Na MOON<sup>1</sup>, Woncheol KIM<sup>2</sup>, Young-Soo HONG<sup>2</sup>, Dongho LEE<sup>3</sup>, Bang Yeon HWANG<sup>4</sup>, Jae-Hoon KANG<sup>1</sup> and Hong Sub LEE<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratories, Ildong Pharmaceutical Co., Ltd. <sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, <sup>3</sup>Korea University, <sup>4</sup>Chungbuk National University.

\*Corresponding author: hsllee@ildong.com

Hsp90 (Heat Shock Protein 90) inhibitor geldanamycin is a benzoquinone ansamycin antibiotic that binds to N-terminus of Hsp90 as cancer therapeutical target. Because benzoquinone moiety of geldanamycin has hepatotoxicity, non-quinone Hsp90 inhibitors through post modification are studied. Novel non-quinone geldanamycin derivatives were biosynthesized from AHBA(3-amino-5-hydroxy benzoic acid) knockout strain *S. hygroscopicus* AC2. We optimized the large-scale fermentation condition by addition 0.5mg/L 3-aminobenzoic acid and production yield of non-quinone geldanamycin analogues, WK88-1, WK88-2, and WK88-3 was 0.082 g/L, 0.096 g/L, and 0.036 g/L, respectively. Also, structure of these compounds was identified. The new geldanamycin analogues could serve as the starting for the chemical modification of improved anticancer drugs.

**Keywords**: large-scale fermentation, non-quinone geldanamycin derivatives, AHBA synthase knockout strain

F-34

### Mechanism of Macrophage Activation Induced by $\beta$ -glucan from *Panobacillus polymyxa* JB115

Seung-Chun PARK<sup>\*</sup>, Zhi-Qiang CHANG, Myung-Jin CHOI, Seung-Hee JANG and Elias GEBRU

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University.

\*Corresponding author: parksch@knu.ac.kr

In the present study, it was investigated the effect of this  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan on nitric oxide (NO) production in RAW264.7 macrophages, the possible mechanisms involved in such reaction, and the safety profile of the  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan or the *P. polymyxa* JB115 pellet. After exposure to  $\beta$ -glucan, RAW264.7 murine macrophages produced NO in a concentration- and time-dependent manner. Exposure to  $\beta$ -glucan resulted in mRNA expression of i-NOS, the enzyme responsible for catalyzing the reaction to produce NO in macrophages, in a concentration-dependent manner in RAW264.7 cells. A similar result was also observed on the mRNA expression of COX-2 and IL-6. It was also observed that  $\beta$ -glucan significantly activated the expressions of transcriptional factors, both NF  $\kappa$  B and AP1 whereas not STAT1, in a concentration-dependent manner using luciferase reporter assay. Further investigation using specific pathway inhibitors and western blot confirmed that activation of p38 MAPK, NF  $\kappa$  B and AP1 are responsible for NO production induced by  $\beta$ -glucan in RAW264.7 cells.

**Keywords**:  $\beta$ -glucan, COX-2, RAW264.7, p38 MAPK

F-35

### Fluorescent Probe for the Detection of Homocysteine

Kwang-Hwan JHEE<sup>\*</sup> and Lu-an FAN

Dept. of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 730-701, Korea.

\*Corresponding author: khjee@kumoh.ac.kr

Homocysteine (Hcy) and cysteine (Cys) play crucial roles in maintaining biological redox homeostasis and are highly related to some diseases. Hcy is a risk factor for Alzheimer's and cardiovascular diseases and Cys is related to slowed growth, liver damage and weakness. Therefore, accurate and fast determination of Hcy and Cys in serum and plasma is essential and important. Here, we develop a novel pre-column fluorescent derivatizing reagent, 4-maleimide-7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole (NBD-M), for the detection of the Hcy and Cys. Benzofurazan backbone and maleimide group are chosen as the fluorophore and reactive moiety, respectively. Maleimide and 4-chloro-7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole (NBD-Cl) were dissolved in the acetonitrile solution, and was added drop-wise to the solution of maleimide in acetonitrile containing sodium bicarbonate. The mixture was stirred and reacted at room temperature for 1 hour. And then the products were separated by silica gel chromatography and determined by mass spectroscopy. NBD-M can react with Hcy and Cys in 20 minutes, respectively, and the complexes (the derivatives of Hcy and Cys with NBD-M) gave high stabilities.

**Keywords**: homocysteine, fluorescence, 4-maleimide-7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole

F-35

### Influence of Nutritional Factors on the Production of an Antibacterial Substance from *Streptomyces* sp. CS392.

Jin Cheol YOO<sup>1</sup>, Hyo Jeong LEE<sup>2</sup> and Poonam MANDER<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, Korea 501-759. <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Gwang Ju 501-759, Korea. <sup>3</sup>Department of Complementary and Alternative Therapy, Gwangju University, Gwang Ju, Korea, 505-703.

\*Corresponding author: jcyu@chosun.ac.kr

*Streptomyces* sp. CS392 was screened from various actinomycetes strains isolated from Korean soil for the production of an antibacterial substance against various pathogenic organisms, especially against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Since the active substance production was highly influenced with different nutritional factors, in this work we examined the effect of carbon, nitrogen and mineral sources. The media inoculated with 5% seed were grown at 28<sup>o</sup> C and 180 rpm for 3 days and the standard plate assay technique was employed to determine the anti-MRSA effect. The result indicated that glucose, peptone and MgCl<sub>2</sub> were the best carbon, nitrogen and mineral source for the production of the compound into the culture broth of *Streptomyces* sp. CS392.

**Keywords**: *Streptomyces* sp. CS392, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, active substance



F-40

#### A Potent Antimicrobial Compound from *Streptomyces* sp. CS392

Jin Cheol YOO, Sung Ju PARK and Seung Sik CHO\*

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, Korea 501-759.

\*Corresponding author: jcyu@chosun.ac.kr

A potent antimicrobial compound was purified from culture broth of *Streptomyces* sp. CS392, a new actinomycetes strain isolated from Korean soil. The compound from the culture broth was extracted using ethyl acetate and then applied to a silica gel column (15 cm × 1.2 cm) followed by preparatory TLC. Purity of the compound was assessed with TLC and UV detection. The compound showed potent antibacterial effect against various pathogenic micro-organisms including methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In MIC test, it displayed stronger anti-MRSA effect than that of nargenicin, but similar effect as of vancomycin, suggesting that it can serve as an effective source of antibacterial agent.

Keywords: *Streptomyces* sp. CS392, isolation, MRSA

F-42

#### New Cytotoxic Spiroketals from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum*

Hwa-Jung NAM, Song-Yi YU, Su-Jung YOO, Hwa-Sun LEE,

Hae-Seul JEONG and Jong-Woong AHN\*

Div. of Marine Environment &amp; Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea.

\*Corresponding author: jwohn@khu.ac.kr

Microorganisms are a plentiful source of structurally diverse bioactive substances. In particular, myxobacteria attract many researchers, since they have many possibilities of producing undiscovered bioactive substances. One of the most prominent examples is epothilones, novel nontaxane antimicrotubule agents obtained from the fermentation of the cellulose degrading myxobacteria, *Sorangium cellulosum*. We have also reported the chemical structures and bioactivities of acyloin compounds isolated from a strain of *S. cellulosum*. In a continuing search for novel bioactive compounds from these organisms, strain KM0141 was found to produce two highly cytotoxic compounds, named spirodienals A(1) and B(2). Their structures were elucidated by spectroscopic analysis. Both compounds demonstrated potent cytotoxicity against human tumor cells. Against human tumor cells such as HCT-15, the activity of 2 was more than 4000 times stronger than that of doxorubicin in terms of IC<sub>50</sub>.

Keywords: *Sorangium cellulosum*, myxobacteria, spiroketal, cytotoxicity

F-41

#### Preparations and Characteristics of High Molecular Weight Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid Hydrogel

Hyo-Jin PARK<sup>1</sup>, Hyun-Mi KIM<sup>1</sup>, Ji-Young BYUN<sup>2</sup>, Mi-Sun KWAK<sup>1</sup> and Moon-Hee SUNG<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Dept. of Bio & Nanochemistry, Kookmin University, Seoul, Korea. <sup>2</sup>BioLeaders Corporation, Daejeon, Korea.

\*Corresponding author: hjinpark@kookmin.ac.kr

Poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) meets the demands of the times with respect to the new biomaterial industry that came up from well-being issues for a healthy life. Naturally occurring polymers have attracted considerable interest from polymer scientists in recent years. This interest arose as a result of an increased awareness of the environment and a desire to produce environmentally safe materials.  $\gamma$ -PGA comes from natural sources and they are also biodegradable. And water absorbable hydrogels have been used as useful materials, so we investigated the application of hydrogel that are made by high molecular mass  $\gamma$ -PGA. That gels showed individual specific water content and property. Also, we compared that gels with chemical cross-linked gel. We considered  $\gamma$ -PGA hydrogel may be used as functional cosmetics material, biomedical material, and so on. This indicates that  $\gamma$ -PGA hydrogel could be used in the various fields of industrial application. [This work was supported by the 'Seoul R&BD Program(10580)']

Keywords: hydrogel, Poly- $\gamma$ -glutamic acid

F-43

#### Identification of Compounds Exhibiting Inhibitory Activity Toward the *Pseudomonas tolaasii* Toxin Tolaasin I

Yoongho LIM\* and Yoonkyung WOO

Konkuk Univ.

\*Corresponding author: yoongho@konkuk.ac.kr

Using *in silico* docking calculations, NMR analysis of target-ligand binding, and hemolytic activity assays, we searched a 30,000-compound library for an effective inhibitor of tolaasin I, a *Pseudomonas tolaasii* toxin that causes virulent infection in mushrooms. Of more than 30,000 compounds screened *in silico*, two compounds were selected. One of these compounds, sorbitoleic acid, bound to tolaasin I and inhibited its hemolytic activity *in vitro*. Therefore, sorbitoleic acid can be a potential inhibitor of tolaasin I.

Keywords: tolaasin, NMR, peptide



# 2009 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies

- **October 22-23, 2009**
- **Hotel-Seoul Kyoyuk Munhwa Hoekwan, Seoul, Korea**

#### Organized by

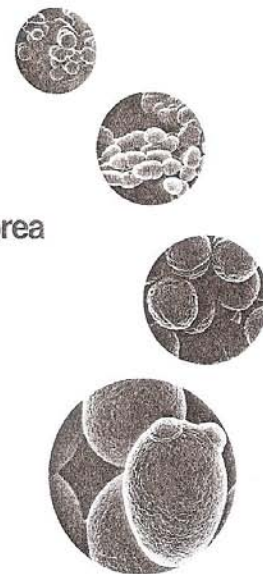
The Federation of Korean Microbiological Societies (FKMS)  
National Institute of Biological Resources

#### Hosted by

The Korean Society for Microbiology (KSMi)  
The Korean Society of Virology (KSV)  
The Korean Society of Mycology (KSMY)  
The Korean Society for Microbiology and Biotechnology (KMB)  
The Microbiological Society of Korea (MSK)

#### Sponsored by

Clinical Trial Center for Functional Foods, Chonbuk National University Hospital  
Clinical Vaccine R&D Center, Chonnam National University  
Infection Signaling Network Research Center, Chungnam National University  
Korea National Institute of Health  
Korea National Microorganisms Research Resources Center  
National Research Foundation of Korea





0003

### Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Putrescine: A Four Carbon Diamine

Jeong Wook Lee, Zhi-Gang Qian, Xiao-Xia Xia, and Sang Yup Lee\*

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology

A four carbon linear chain diamine, putrescine (1,4-diaminobutane), is an important platform chemical having a wide range of applications in chemical industry. Here we report a metabolically engineered strain of *Escherichia coli* that produces putrescine at high titer in glucose mineral salts medium. First, a base strain was constructed by inactivating the putrescine degradation and utilization pathways, and deleting the ornithine carbamoyltransferase chain I gene *argI* to make more precursors available for putrescine synthesis. Furthermore, ornithine decarboxylase and the ornithine biosynthetic genes (*argC-E*) were overexpressed from the *trc* promoter, which replaced the native promoter in the genome, to increase the ornithine pool. Finally, strain performance was further improved by the deletion of the stress responsive RNA polymerase sigma factor RpoS, a well-known global transcription regulator that controls the expression of ca. 10% of the *E. coli* genes. The strategy reported here should be useful for the bio-based production of putrescine from renewable resources. [This work was supported by the Korean Systems Biology Research Project of the Ministry of Education, Science and Technology through Korea Science and Engineering Foundation (M10309020000-03B5002-00000). Further supports by LG Chem Chair Professorship, Microsoft, World Class University Program of the Ministry of Education, Science and Technology, and KAIST Institute for the BioCentury are appreciated].

**Keywords** : putrescine, ornithine, diamine, *Escherichia coli*, sigma factor

0010

### A Detergent, Organic Solvent and Oxidant Stable Alkaline Metalloprotease from *Streptomyces* sp. CS528

Jaya Ram Simkhada, Seung Sik Cho, and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

A 51 kDa metalloprotease from *Streptomyces* sp. CS528 was purified by ion exchange with HQ-poros and gel filtration with Sepharose CL-6B. The activity was optimum at pH 7.5 and 50°C and remained virtually unaltered after 8 and 1 h of exposure to pH 7-10 and 45°C, respectively. Ca<sup>2+</sup> enhanced the activity while Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> suppressed it. EDTA and EGTA, but not PMSF, aprotinin, and pefabloc SC, significantly inhibited the activity, suggesting that it might be a metalloprotease. *K*<sub>m</sub> and *V*<sub>max</sub> for azocasein were 0.75 mg/ml and 1.95 mM/min mg protein, respectively. It displayed high stability towards various detergents, organic solvents and oxidizing agents. These features endow the enzyme an ideal choice for biotechnological applications especially for detergent formulation and enzymatic peptide synthesis.

**Keywords** : organic solvent resistant, alkaline metalloprotease, *Nocardia* sp. CS528

0011

### Transformation of Major Ginsenoside to Minor Ginsenoside from *Panax ginseng* by *Stenotrophomonas* sp. DCY33

Jin Woo Min, Lin Hu Quan, Ho Bin Kim, Na Ri Son, Hyo Yeon Kim, Mi Jang, Yeon Ju Kim, and Deok Chun Yang\*

Korean Ginseng Center for Most Valuable Product and Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University

Ginsenoside (ginseng saponin) is one of most important material in ginseng. The minor ginsenosides has high pharmacological activities than major ginsenoside. ginsenoside into the more active minor forms of ginsenosides, such as Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>2</sub>, and compound K (anti-tumor, antidiabetic, antistress, antioxidant). However, in ginseng, these minor saponins are available in smaller quantities. Therefore, many studies have aimed to convert major ginsenosides to the more active minor ginsenoside with various treatment methods such as heating, acid treatment, and enzymatic conversion. Heating and acid treatment, however, produced side reaction, such as epimerization, hydration. Therefore, enzymatic hydrolysis of appropriate sugar at a specific position is desirable for the production of active minor ginsenosides. In this study, major ginsenosides such as ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc was transformed using glycoside hydrolase enzyme from strain DCY33 and then analyzed by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. Biotransformations of ginsenoside Rb<sub>1</sub> were analyzed using TLC and HPLC. Our results confirmed that the microbial enzyme of strain DCY33 significantly transformed minor ginsenoside such as F<sub>2</sub> and Compound K our results indicate that this is the best possible way to obtain specific ginsenosides using microbial enzymes from strain DCY33 culture.

**Keywords** : ginsenoside, conversion, compound K

0012

### Ergosterol Peroxide and Macrolactone from *Cryptoporus volvatus*

Hyungjun Noh<sup>1</sup>, Hyunbong Park<sup>1</sup>, Sunyoung Um<sup>1</sup>, Hoyoung Lim<sup>1</sup>, Kabyeul Jang<sup>1</sup>, Kanghyo Lee<sup>1</sup>, Seunghwan Kim<sup>1</sup>, and Soonja Seok<sup>2</sup><sup>1</sup>Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science All Rights Reserved, Rural Development Administration. <sup>2</sup>National Agrobiodiversity Center, Rural Development Administration

This study was carried out to investigate chemical ingredient from fruiting body of *Cryptoporus volvatus* and metabolites of *Cryptoporus volvatus* in liquid culture media. Methanol extract from fruiting body and ethyl acetate extract from liquid culture media of *Cryptoporus volvatus* was analyzed by column chromatography, thin layer chromatography, HPLC, mass spectrophotometer. CVM33100Mc21 was isolated by sep-pak cartridge column and C18 preparative HPLC from methylene chloride fraction. From the physico-chemical data, including NMR, MS, the chemical structure of the compound was determined to be an ergosterol peroxide. CY801 was extracted by ethyl acetate with liquid culture media and isolated by silica open column chromatography and C18 preparative HPLC. From the physico-chemical data, including NMR, MS, the chemical structure of the compound was determined to be a macrolactone.

**Keywords** : Ergosterol peroxide, Macrolactone, *Cryptoporus volvatus*

0025

### Isolation of Fungal Strains Producing Gibberellins from Coastal Sand-Dune Plants and Their Effect on the Growth of Waito-c Rice

Young-Hyun You<sup>1</sup>\*, Jong-Wan Kim<sup>1</sup>, Jeong-Sook Hwang<sup>2</sup>, Yeon-Sik Choo<sup>2</sup>, and Jong-Guk Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science and Biotechnology, Kyungpook National University, <sup>2</sup>Department of Biology, College of National Sciences, Kyungpook National University

Endophytic fungi exist in the live plant tissue, and some of them are known for plant growth promotion. Gibberellin is well known plant growth hormone acting on the development and growth of plants. In this study, we focused on endophytic fungi isolated from coastal sand-dune plant and their effect on plant growth. 47 strains of endophytic fungi were isolated from the roots of *Cnidium japonicum*, *Sedum kamtschaticum* and *Lysimachia mauritiana* Lamark. We compared plant length with shoot length by bioassay test on waito-c. As a result, we found that endophytic fungi isolated from the roots of *Cnidium japonicum* have an effect on plant growth promotion. The result of bioassay test showed that plant growth-promotion activity of the strain YHY5379 is similar to that of *Gibberellin fujikuroi*, and those of other strains were less than the strain YHY5379.

**Keywords** : Coastal sand-dune plant, gibberellin, secondary metabolite, endophytic fungi

0027

### An Antioxidative Compound from *Streptomyces* sp. CS428

Yun Hee Choi and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

This study was aimed to purify an antioxidative compound from culture broth of *Streptomyces* sp. CS428, isolated from Korean soil. Culture broth was extracted with ethyl acetate and then applied to a silica gel column (10 cm × 1.2 cm) followed by preparatory TLC. Purity of the antioxidative compound was assessed with TLC and UV detection. The compound was examined for its antioxidative activities with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay. Nitrite scavenging activity, total phenolic content and reducing power of the compound were also assessed. DPPH radical scavenging activity and the reducing power of the compound were 62.5% at 10 mg/ml and 0.513 at 1 mg/ml, respectively. Similarly, its nitrite scavenging activity were 95, 85, and 80% at 10, 5, 2.5 mg/ml, respectively and total phenolic contents increased with increasing electron donating activities. These results indicate that the compound isolated from ethyl acetate extracts of *Streptomyces* sp. CS428 is a strong natural antioxidative compound.

**Keywords** : antioxidative compound, *Streptomyces* sp. CS 428, Characterization

0026

### Production and Purification of a Potent Antimicrobial Compound from *Streptomyces* sp. CS 392

Poonam Mander, Seong Ju Park, and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

*Streptomyces* sp. CS392, capable of producing an antibacterial substance, was isolated from Korean soil. The compound was purified using a silica gel column (15 cm × 1.2 cm) followed by preparatory TLC. Purity of the compound was assessed with TLC and UV detection. Since the active substance production was highly influenced with different nutritional factors, the effect of carbon, nitrogen and mineral sources were examined. The compound showed potent antibacterial effect against various pathogenic microorganisms including methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In MIC test, it displayed stronger anti-MRSA effect than that of nargenicin, but similar effect as of vancomycin, suggesting that it can serve as an effective source of antibacterial agent.

**Keywords** : antimicrobial compound, *Streptomyces* sp. CS 392, Characterization

0028

### Fermentation Process Characteristics of *Nocardia* sp. CS682 for Nargenicin Estimation

Seung Sik Cho and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

Nargenicin (Nodusmicin, 9-(1H-pyrrole-2-carboxylate), an immunostimulative compound proposed for animal feeding, was purified from *Nocardia* sp. CS682, isolated from Korea. To assure that the standard compound generates reliable information about the crude substrate production, we investigated a relationship that exists between medium pH and the amount of nargenicin production during its scale up process (using 5 L to 500 L fermentor). Results of this study provides a reliable guideline which is helpful to predict the amount of nargenicin present in the 5 to 5000 L culture broth of *Nocardia* sp. CS682 without proceeding the lengthy calibration procedure.

**Keywords** : *Nocardia* sp. CS682, Nargenicin, Fermentation





**F-35****Xanthorhizol Inhibits and Eradicates Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococcus* spp. (MRCNS) Biofilms**Yuya RUKAYADI<sup>1</sup>, Sangwon HAN<sup>2</sup>, Dongjun YONG<sup>3</sup> and Jue Kwan HWANG<sup>4</sup>\*<sup>1</sup>Dept. of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea; <sup>2</sup>Yonsei University; <sup>3</sup>Dept. of Biomaterials Science and Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea; <sup>4</sup>Dept. of Laboratory Medicine & Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea.

\*Corresponding author: jhwang@yonsei.ac.kr

MRCNS infections have emerged as a worldwide problem and clinical strains of MRCNS exhibit reduced susceptibility to antimicrobial agents due to their ability to establish biofilm. The aim of this study was to investigate the inhibition and eradication activity of xanthorhizol against 28 isolates of clinical MRCNS. The clinical MRCNS biofilms were formed in the wells of 96-well microtiter plates, in TSB medium. A 0.4% crystal violet was used to stain the biofilm. MICs of xanthorhizol against 28 clinical MRCNS isolates range 2-16 µg/ml and static minimum inhibition concentration (SMIC) of xanthorhizol against 28 isolates of clinical MRCNS was 8-fold - to 128-fold (8-128 µg/ml) greater than the concentration required to inhibit planktonic growth (MIC). Xanthorhizol was able to eradicate the MRCNS biofilms with biofilm eradication concentration (BEC) range 16-256 µg/ml. These results suggest that xanthorhizol has potential to inhibit the growth and eradicate the biofilm formed by clinical MRCNS isolates.

**Keywords:** Biofilm, Methicillin resistant *Staphylococcus*, Xanthorhizol

**F-37****Comparison of Functional Effect of *Chunggoljyang* Prepared with Various Soybean Cultivars**

Hyung Eun KIM, Min Jwa KIM and Yong Suk KIM\*

Department of Food Science &amp; Technology, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Republic of Korea

\*Corresponding author: kimsy66@jnu.ac.kr

To improve the quality of *chunggoljyang* with better functional effect such as antioxidant activity, fibrinogen activity, and inhibitory activity against angiotensin converting enzyme, thirty type of *chunggoljyang* were prepared with different soybean cultivars: large sized soybeans (20 cultivars), small sized soybeans (3 cultivars), and colored soybeans (7 cultivars). Antioxidant activity were determined by DPPH radical scavenging activity, polyphenol contents, and SOD-like activity and those were ranged 81.59 (Jinsu) - 91.18% (Daejeong), 30.83 (Hudon) - 40.38 mg% (Wookwang), 10.48 (Jesuk) - 47.12% (Saeol), respectively. When plasmin 1 unit was 100%, fibrinogen activity of *chunggoljyang* prepared with *Jinsu* and *Chonggol2* were higher 223.89% and 151.29%, respectively, than those of other soybean cultivars. Inhibitory activity against angiotensin converting enzyme showed significant difference among *chunggoljyang* prepared with various soybean cultivars. Those of *chunggoljyang* prepared with *Chonggol2*, *Jehwang*, and *Daeol* were 49.28%, 41.45%, and 38.85%, respectively. From the results, *chunggoljyang* prepared with *Wookwang* and *Chonggol2* showed higher functional characteristics than those of other *chunggoljyang*.

**F-36****Isolation and Characterization of Six Different Fusaricidins Produced by *Paeirobacillus polyxyza* E681 and Their Possible Role as Elicitors of Induced Systemic Resistance on Plants**

Seo-yeon KIM, Soo-Young PARK, Soo-Kwon CHOI, Cheong-Min RYU and Seung-Hwan PARK\*

Industrial Biotechnology &amp; Bioenergy Research Center, KRIBB, Daejeon, Rep. of Korea

\*Corresponding author: shwan7@kribb.re.kr

*Paeirobacillus polyxyza* E681 produces a lipopeptide antibiotic, fusaricidin, having excellent antimicrobial activity against plant pathogenic fungi and gram-positive bacteria. Fusaricidin is composed of six amino acids residues and contain an unusual fatty acid side chain, 15-guanidino-3-hydroxyoctadecanoic acid. In this study, the fusaricidin have been purified from the culture broth of strain E681 by butanol extraction, silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography. Firstly, six fractions containing different fusaricidins with molecular masses of 883, 897(2), 911(2) and 925 Dalton, respectively, were obtained. We analyzed the amino acid composition of each fraction and found that those are fusaricidin A, fusaricidin B, LI-F5a, LI-F5b, LI-F8a and LI-F8b. Besides its known antifungal and antibacterial activities, the fusaricidins were exploited to assess response to plants by examining elicitation of induced systemic resistance (ISR) against a bacterial pathogen in pepper. The purified fusaricidins were directly-applied in the pepper seedlings and tested on ISR against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* seven days after leaf-infiltration. Even 11 nM fusaricidin application significantly decreased symptom development compared to water control.

**Keywords:** Fusaricidins, Lipopeptide, Induced systemic resistance

**F-38****Identification and production of antimicrobial compound from *Streptomyces* sp. CS392**

Jin Chol YOO, Seung Suk CHO and Poosam MANDER\*

Department of Pharmacy, Chonnam University, Kwangju 501-759, Republic of Korea

\*Corresponding author: jyo@chonnam.ac.kr

Actinomycetes strain CS392 was found to exhibit broad spectrum of antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms. The 16S rRNA sequence revealed that the strain is closely related to *Streptomyces lavendulae* with 98.22% sequence homology. Based on genetic, morphological and biochemical characteristic, the strain CS392 was confirmed as belonging to the genus *Streptomyces* and we named as *Streptomyces* sp. CS392. The production of antibiotic from the strain was found to be most favorable when cultured for 2 days at 28°C and 180 rpm in a shaking incubator using glucose and peptone as respective carbon and nitrogen sources. The antibiotic was extracted using ethylacetate (1:1 v/v) and partially purified using both column and thin layer chromatographic techniques. Two antibiotic compounds, based on its different solubility on ethyl acetate and methanol, were identified. Antimicrobial activity of the compound against different pathogenic strains was assessed using the minimum inhibitory concentrations (MICs). It was found to be active against eight different strains including MRSA 693E, MRSA (2-32), MRSA (4-5), MRSA (4-21), *Stenococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 1924), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1928) and *Amycolobacterium magnum* (ATCC 9341).

**Keywords:** Actinomycetes, *Streptomyces* sp. CS392, Antibiotic



## G-2

A Novel Low Molecular Weight Fibrinolytic Enzyme from *Streptomyces* sp. CS628

An Cheol YOO and Jaya Ram SIMKHADA\*

Department of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-739, Republic of Korea.

\*Corresponding author: jyo@chosun.ac.kr

High blood pressure, acute myocardial infarction, ischemic heart diseases, stroke etc are cardiovascular diseases which are primary causes of global death. Streptokinase, urokinase-type plasminogen activator, tissue plasminogen activator, bacterial plasminogen activator are widely using thrombolytic agents for therapeutic purposes. These agents are expensive, exhibit low fibrin specificity, and have undesired side effects. Therefore, continuous efforts have been focused for the search for an alternate source to overcome the existing shortcomings. A novel fibrinolytic protease was purified from an isolate of *Streptomyces*, isolated from Jeonnam province, Korea with sequential chromatographic steps. Purity and molecular mass of the purified enzyme were evaluated with SDS-PAGE and fibrin zymography. Various biochemical properties of the enzyme such as effects of pH, temperature and various additives on the enzyme activity and stability as well as kinetic parameters were evaluated.

**Keywords:** *Streptomyces*, Fibrinolytic enzyme, Protease

## G-4

Cloning of an endo-1,4- $\beta$ -xylanase A from *Phanerochaete chrysosporium*, and its expression in *Pichia pastoris*

Nguyen Duc HUY, Ae-Young MO, Yu-Lin SON, Dae-Hyuk KIM,

Bo-Ra KWON and Seung-Moon PARK\*

Div. of Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea.

\*Corresponding author: smpark@chonbuk.ac.kr

An enzyme of the glycosidase hydrolase family 10 endo-1,4- $\beta$ -xylanase A from *Phanerochaete chrysosporium* was cloned into the pPIC2a and pPIC2a vectors and expressed in *Pichia pastoris* under the control of the methanol inducible alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter. Enzyme assay indicated that both intrinsic signal peptide and *P. pastoris*  $\alpha$ -factor secretion signal peptide were efficient in mediating Xylanase A secretion. Xylanase A activity reached 2.01 unit/ml in medium culture after induction for three days with 1% methanol. The enzyme activity in this study is four times higher than previously reported Xylanase expression in *Aspergillus niger*. The optimal temperature and pH for the enzyme are 70°C and 4.5, respectively.

**Keywords:** *Phanerochaete chrysosporium*, *Pichia pastoris*, Xylanase

## G-3

## Useful Screening Strategy of Exocellulase from Metagenomic Resources using High-throughput Screening (HTS) Based on Robot System and Its Gene Cloning

Kyoung-Cheol KO<sup>1</sup>, Yurion HAN<sup>2,3</sup>, Bong Seok SHIN<sup>2,3</sup>, Seon-Ok RUM<sup>1</sup>, Jong Hyun CHOI<sup>1</sup>, Geon-joong KIM<sup>1,2</sup> and Jae Jun SONG<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Enzyme Based Fusion Technology Research Team, Microbe-based Fusion Technology Research Center, KRIBB, 1404 Sirjeong-dong, Jeongeup, Jeonbuk 580-185, Korea <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonnam National University, 300 Yong-bong Dong, Buk-Gu, Gwangju 500-737, Korea.

\*Corresponding author: jjsong@kribb.re.kr

To screen exocellulase from metagenomic resources is difficult compare with endocellulase due to limited assay protocol, expensive substrate and low sensitivity. This new strategy combined with high-throughput screening (HTS) system based on robot control system could screen exocellulases from various metagenomic resources more fast, sensitive and easy than previously reported screening methods. The exocellulase activity was measured about catalytic properties with fluorogenic glycosides, 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-cellobioside, as substrates for screening of exo-type cellulase. This approach would be powerfully applied for other useful enzyme screening from metagenomic resources. A novel *celEx399* gene encoding exocellulase (CelEx399) in metagenomic resources was cloned with shotgun method. The amino acid sequence was 64% identical to that of beta-glucosidase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. (This work was supported by a high throughput screening (HTS)-based Integrated Technology Development grant from the MEST, and a basic research grant from KRIBB.)

**Keywords:** High-throughput screening (HTS), Metagenome, Exocellulase

## G-5

Identification, partial purification and characterization of lipase from *Ralstonia* sp. CS274 and its application in biodiesel production.Jin Cheol YOO<sup>1</sup>, Seung Sik CHO<sup>2</sup> and Hah-Young YOO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy & Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 500-737, Republic of Korea.

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-739, Republic of Korea.

\*Corresponding author: jcyoo@chosun.ac.kr

To isolate a lipase as a biocatalyst for biodiesel synthesis, we screened 790 strains from soil samples and a strain named CS274 that produced a profound lipase activity was selected. We determined 16S rDNA gene sequences of the strain and constructed a phylogenetic tree based on the sequences which showed that the strain should be classified as a new strain under the genus *Ralstonia*. Therefore, we proposed the new strain as *Ralstonia* sp. CS274. A lipase from culture broth of the strain was partially purified using gel filtration with Sepharose CL-6B and ion exchange with DEAE Sepharose CL-6B. The lipase was able to catalyze transesterification of vegetable oil and methanol to biodiesel. Various biochemical properties of the enzyme including various conditions for the biodiesel production were studied. We also investigated the substrate selectivity pattern of lipase to apply biodiesel production from waste oil or blended oils.

**Keywords:** Lipase, Biodiesel, *Ralstonia* sp. CS274

**G-30****Identification, Production and Characterization of an Extracellular Lipase from *Streptomyces* sp CS133**

Jin Cheol YOO and De Jeong PARK\*

Department of Pharmacy, Chonm University, Kwangju 501-751, Republic of Korea.

\*Corresponding author: jyo@chonm.ac.kr

Microbial lipases today occupy a place of prominence among biocatalysts owing to their ability to catalyze a wide variety of reactions in aqueous and non-aqueous media. A new actinomycetes isolate CS133 was screened for lipase production and was selected for physicochemical studies. The 16S rRNA pattern of the strain possessing 99.79% homology to that of *Streptomyces antibioticus* strongly suggests that it belongs to genus *Streptomyces*. The optimal medium consisted of soybean 1%, lactose 1% and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.01% with initial medium pH 6.8. Optimal activity for lipase was found at 40°C and pH 8. Additionally the enzyme remained unaltered when treated at 40°C for 120 min and was stable in alkaline range. The enzyme activity was enhanced by Triton X-100 to 5-fold, and metal ion like  $\text{MgSO}_4$  and KCl slightly enhanced the activity. Lipase from CS133 was also able to produce biodiesel. These characteristic features of CS133 suggest that it might be of a great importance in biodiesel production and other industries.

**Keywords:** Microbial lipases, Biocatalyst, *Streptomyces*

**G-31****Quality Characteristics and Physiological Functionality of Traditional Rice Wines in Chungnam Province of Korea**Jong Soo LEE\*, Mi Young LEE<sup>2</sup>, Si Youl SUNG<sup>2</sup>, Heon Kag KANG<sup>2</sup>, Hoag Seob BYUN<sup>2</sup>, Sang Mi JUNG<sup>2</sup> and Jung Hwa SONG<sup>1</sup><sup>1</sup>Dept. of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-715, Korea <sup>2</sup>Public Health & Environmental Research Institute of Chungcheongnam-do, Daejeon 300-801, Korea.

\*Corresponding author: biotech@psu.ac.kr

The goal of this study was to characterize the quality and physiological functionality of some traditional rice wines in Chungnam province, Korea. Non-sterilized and commercial sterilized traditional rice wines from five traditional rice wine factories of Chungnam province were collected and investigated for nutritional component, noxious compounds and physiological functionality. Ethanol content ranged from 16.1–18.3% and pH ranged from 3.27–4.76, and they also contained 0.15% to 0.35% of total acid. All traditional rice wines contained 0.15–139.9 mg% of amino nitrogen and 2.5–25.7% of total sugar. Among organic acids, lactic acid was contained 7.4–29.6 mg%, and succinic acid and propionic acid were also contained 0.2–2.7 mg% and 0.7–8.3 mg%, respectively. Antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity were showed 37.0–86.0% in all rice wines, however, the other physiological functionalities were low or not detected.

**Keywords:** Physiological functionality, Nutritional component, Traditional rice wines

**G-32****Enhanced Production of Itaconic Acid through a Modified Strain Improvement Strategy and Statistical Medium Optimization in Fungal Fermentations of *Aspergillus terreus***Woo-Shik SHIN<sup>1</sup>, Yong-Seob JEONG<sup>2</sup>, Chulhwan PARK<sup>3</sup>, Sangyong KIM<sup>4</sup>, Dehoon LEE<sup>5</sup> and Gi-Taek CHUN<sup>6</sup>\*<sup>1</sup>Dept. of Molecular Bioscience, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea <sup>2</sup>Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, South Korea <sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Kwangju National University, South Korea <sup>4</sup>Korea Institute of Industrial Technology, South Korea

\*Corresponding author: gychun@kangwon.ac.kr

Itaconic acid biosynthesized by the fungal cells of *Aspergillus terreus* in a branch of the TCA cycle is utilized in the manufacture of various synthetic resins. For enhanced production of itaconic acid, a modified method for selecting high-yielding and also highly stable mutants was developed using a high-throughput system. In parallel with the intensive strain improvement, medium optimization was also conducted using statistical methods such as full factorial design (FFD), steepest ascent method (SAM) and response surface method (RSM). A synthetic medium (SM) was developed for the investigation of the producers' fermentation physiology, and also a semi-synthetic medium (SSM) for the mass production of itaconic acid in bioreactor cultures, respectively. Notably, it was found that the production level of itaconic acid was strongly negatively affected by the added phosphate amount in both the production media, showing that the biosynthetic pattern of itaconic acid follows a typical secondary metabolic pathway. In addition, for development of fermentor-operation strategy for optimal supply of dissolved oxygen (DO), oxygen mass transfer rate coefficient ( $k_La$ ) was determined in various modes of impeller-agitation speed (rpm) and  $\text{O}_2$ -sparging rate (vvm) in a 5-liter stirred-bioreactor system.

**Keywords:** Itaconic acid, Medium optimization, Oxygen mass transfer rate coefficient ( $k_La$ )

**G-33****Production of Biodiesel Using Cross-linked Enzyme Aggregates of Methanol-tolerant Lipase from *Photobacterium lipolyticum***

Jin Yee HAN and Hyung Kweon EDM\*

Dept. of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, Korea

\*Corresponding author: hkim@catholic.ac.kr

Biodiesel is defined as methyl and ethyl esters of long chain fatty acids produced from vegetable oils or animal fats. Lipase enzymes have been occasionally used to produce this biofuel. Recently, biodiesel production using immobilized lipase has received a great attention. Through the enhanced stability and reusability, immobilized lipase can contribute to reduce the biodiesel production cost. In this study, methanol-tolerant lipase M37 from *Photobacterium lipolyticum* was immobilized using cross-linked enzyme aggregate (CLEA) method. The yield of CLEA preparation was about 90%. CLEA M37 showed optimum temperature of 30°C, and optimum pH of 9.0. It was stable up to 50°C and in a pH range of 4.0–11.0. Both soluble M37 and CLEA M37 were stable in the presence of high concentration of ethanol, propanol and butanol. That is, their activities were almost maintained even in the presence of 30% (v/v) of each solvent. It was demonstrated that both soluble M37 and CLEA M37 could produce biodiesel from olive oil and fish oil. In this M37-mediated biodiesel production processes, methanol, ethanol, and propanol could be used as solvents as well as substrates. In addition, CLEA M37 could be easily recovered and re-used many times for the production of biodiesel.

**Keywords:** Biodiesel, Lipase, Cross-linked enzyme aggregate



## G-34

Characterization of Antibacterial Substance-producing *Bacillus* sp. 6-3 Isolated from Korean pickle-*Kimchi*

Jin Cheol YOO and Yun Hee CHOI\*

Department of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 581-759, Republic of Korea.

\*Corresponding author: jcy6@chosun.ac.kr

A bacterial strain producing antibacterial substance was isolated from a typical Korean pickle -*Kimchi* and identified as *Bacillus* sp. 6-3. Antibacterial activity was evaluated by disc diffusion method against *Listeria monocytogenes* as a test organism. Cell precipitate from overnight grown culture was active against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, MRSA- 650E, *Bacillus subtilis*, *Attageneis faecalis* ATCC 1004, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, *Escherichia coli* KCTC 1923 and *Listeria monocytogenes*. The optimal medium composition for production of the antimicrobial substance from the *Bacillus* sp. 6-3 were 1% glucose and 1% tryptone. The optimum temperature and pH for the growth of the strain were 37°C and pH 5.0, respectively. The antibacterial activity was higher in neutral to slightly acidic pH than in alkaline pH. The optimal shaking speed to grow and to produce antibacterial substance from the *Bacillus* sp. 6-3 were 160-180rpm. The optimal culture time for antibacterial activities were in the range of 12-24 h.

**Keywords:** *Bacillus* sp. 6-3, *Listeria monocytogenes*, Antibacterial activity

## G-36

Enhancement of Apparent Oxygen Tolerance of *In vivo* hydrogen production by Engineering *Vitreoscilla* HemoglobinByung Hoon JO<sup>1</sup>, Jaon Y.H. KIM<sup>2</sup> and Hyung Joon CHA<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Dept. of Chemical Engineering, POSTECH, Pohang 790-784, Korea. <sup>2</sup>IBIG, POSTECH, Pohang 790-784, Korea.

\*Corresponding author: hycha@postech.ac.kr

*Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) is a bacterial hemoglobin. It has a potential of broad biotechnological application since this protein exerts many positive effects on cellular events such as protein synthesis, cell growth in hypoxic condition. We applied VHb in hydrogen production where oxygen sensitivity of hydrogenase should be solved for hydrogenase to be used as an efficient biocatalyst. With recombinant *Escherichia coli* BL21 system with heterologously expressing [NiFe]-hydrogenase from *Hydrogenovibrio marinus*, which was shown to be able to produce hydrogen, we hypothesized that VHb may enhance O<sub>2</sub> tolerant hydrogen production by serving as an O<sub>2</sub> diffusion barrier. We showed that VHb co-expressing recombinant strain didn't only produce more H<sub>2</sub> gas in terms of absolute amount compared with the negative control, but also exhibited higher 'apparent' oxygen tolerant property. This effect was a composite result of both O<sub>2</sub>-dependent and O<sub>2</sub>-independent processes. The possibility that the increased hydrogen production was due to the promoted synthesis of recombinant [NiFe] hydrogenase by VHb was strongly excluded by the additional experiments. In conclusion, VHb can be applied to bihydrogen production in *E. coli*, giving the enhanced apparent oxygen tolerance.

**Keywords:** Hydrogenase, VHb, Oxygen tolerance

## G-35

Potential Probiotic Properties of Phytase Producing *Lactobacillus salivarius* FC113Eun-Kyung LEE<sup>1</sup>, Na-Kyoung LEE<sup>1</sup>, Hye-Il CHANG<sup>2</sup> and Hyun-Dong PAIK<sup>3\*</sup><sup>1</sup>Dep. of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. <sup>2</sup>School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 116-701, Korea.

\*Corresponding author: hvpaik@knu.ac.kr

Probiotics are live microorganisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit on hosts and they are used as an alternative to the use of antibiotics in animals. Phytase as an animal feed supplement is increased the bioavailability of phosphorus in monogastric animals. In this study, phytase producing *L. salivarius* FC113 isolated from chicken feces was characterized for probiotic use in animals. High phytase activity (401.6 U) of *L. salivarius* FC113 was observed. Production of interleukin-1  $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), and nitric oxide (NO) were measured by *in vitro* culture experiments. The amount of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  in concentration of 10<sup>7</sup> CFU/ml from *L. salivarius* FC113 were approximately 175.5 $\pm$ 36.40 pg/ml and 353.5 $\pm$ 61.79 pg/ml, respectively and NO was approximately 33.88 $\pm$ 15.99  $\mu$ M in concentration of 10<sup>7</sup> CFU/ml. *L. salivarius* FC113 was highly resistant to artificial gastric juice (pH 2.5, 1%(w/v) pepsin) and it showed antimicrobial effect against avian pathogens. Based on results from the API ZYM kit, *L. salivarius* FC113 produced 12 enzymes. Also, *L. salivarius* FC113 was showed resistance to several antibiotics. These results show that *L. salivarius* FC113 has potential for probiotic use as an alternative to the use of antibiotics in animals.

**Keywords:** Animal probiotics, Phytase activity, *Lactobacillus salivarius*

## G-37

Isolation and Characterization of Hydrogen Production Bacterium *Enterobacter* sp. ES392Eun-Sook LEE<sup>1</sup> and Sung-Jong JEON<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Dept. of Biomaterial Control, Dept. of Biotechnology & Bioengineering, Ilju-Ilju Industry R&D, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea. <sup>2</sup>Dept. of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea.

\*Corresponding author: jeon.sj@deu.ac.kr

A hydrogen-producing bacteria (strain ES392) was isolated from pond water located in the Dong-Eui University, Busan, Korea. The cells were long-rod type (1.4  $\mu$ m), about 0.6  $\mu$ m in diameter. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA sequence and biochemical studies indicated that ES392 belonged to the genus *Enterobacter* sp. The optimum pH and temperature for hydrogen production was 7.5 and 35°C, respectively. The optimization of medium compositions which maximize hydrogen production from *Enterobacter* sp. ES392 was determined. As a result, the maximum hydrogen production was obtained under the conditions of 4% (w/v) sucrose, 0.5% (w/v) yeast extract and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). In batch culture, hydrogen gas of 3411 ml/l was totally produced for 36 h.

**Keywords:** Hydrogen production, *Enterobacter*, Medium composition.



Proceedings

2010 한국미생물학회연합  
국제학술대회  
International Meeting  
of the Federation of Korean  
Microbiological Societies

- October 14(Thu)~15(Fri), 2010
- Seoul KyoYuk MunHwa HoeKwan, Seoul, Korea

**Organized by**

The Federation of Korean Microbiological Societies (FKMS)

**Hosted by**

The Korean Society for Microbiology and Biotechnology (KMB)

The Korean Society for Microbiology (KSMi)

The Korean Society of Virology (KSV)

The Korean Society of Mycology (KSMy)

The Microbiological Society of Korea (MSK)

**Sponsored by**

Korean Federation of Science and Technology Societies

Korea National Microorganisms Research Resources Center

Korean Academy of Medical Sciences

National Institute of Health, KCDC

Maeil Dairies Co., Ltd.

 한국미생물학회연합  
<http://www.fkms.kr>

**DO25****Anaerobic Digestion of the Residue from Algal Ethanol Fermentation**Jeong-Hoon Park<sup>1,2</sup>, Sang-Hyoun Kim<sup>1</sup>, Yong Jin Kim<sup>2</sup>, and Jeong-Jun Yoon<sup>3</sup><sup>1</sup>Civil, Environmental and Architectural Engineering, Korea University, <sup>2</sup>Ren Technology Center, Korea Institute of Industrial Technology, <sup>3</sup>Environmental Engineering, Daegu University

Seaweeds, macro algae, have enormous potential to be the proper source for bioethanol. Seaweeds can grow faster with higher CO<sub>2</sub> fixation ability than land plants. We can cultivate them on the huge area of sea by free sun light without any nitrogen-based fertilizer. Furthermore, they normally do not contain lignin, which means that sugars can be obtained without the expensive lignin removal. The amount of bioenergy produced by the biomass of red algae is greater than any other source of biomass. Although there are a myriad of reasons for algal ethanol fermentation, an advantage of production that is not often discussed will be demonstrated in this paper: the opportunity of anaerobic digestion for resource recovery and reuse of residue in the production of algal ethanol. The residue is mainly produced from hydrolysis and fermentation unit processes. The authors investigated the feasibility of methane production from the residue.

**Keywords :** Anaerobic Digestion, Red Algae, Ethanol Fermentation**DO26****A New Glycosylated Fibrinolytic Protease from *Streptomyces***Jaya Ram Srinikethada and Jin Cheol Yoo<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chosun University

A fibrinolytic protease was purified from a newly isolated *Streptomyces* strain by hydrophobic interaction followed by a size exclusion chromatography. Maximal activity was at 50-55°C and pH 8.0, and the enzyme was stable between pH 8.0-12.0 and below 40°C. The activity was completely inhibited by PMSE and pefabloc sc and showed higher specificity towards chromogenic substrate for chymotrypsin, indicating that it is a chymotrypsin-like serine protease. Molecular weight was determined to be 9,439.5 Da by MALDI-TOF. It migrated as a single polypeptide chain corresponding to 18 kDa in SDS-PAGE. The discrepancy in the molecular weight might be because of high sugar content; therefore sugar content was analyzed. The enzyme was found to contain 0.1 mg/ml glucose. The first 15 amino acids of N-terminal sequence were IAGGQAIYAGGGRRS, which are significantly different from so far known fibrinolytic enzymes. High degree of differences in N-terminal sequences from the known fibrinolytic enzymes incorporating with remarkably higher fibrinolytic activity than that of plasmin elucidate the novelty of the enzyme.

**Keywords :** fibrinolytic protease, *Streptomyces*, purification, characteristics, plasmin**DO27*****In Vitro* and *In Vivo* Fibrinolytic Activity of a Low Molecular Weight Fibrinolytic Protease from a *Streptomyces* Strain**Jaya Ram Srinikethada, Seung Sik Cho, and Jin Cheol Yoo<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chosun University

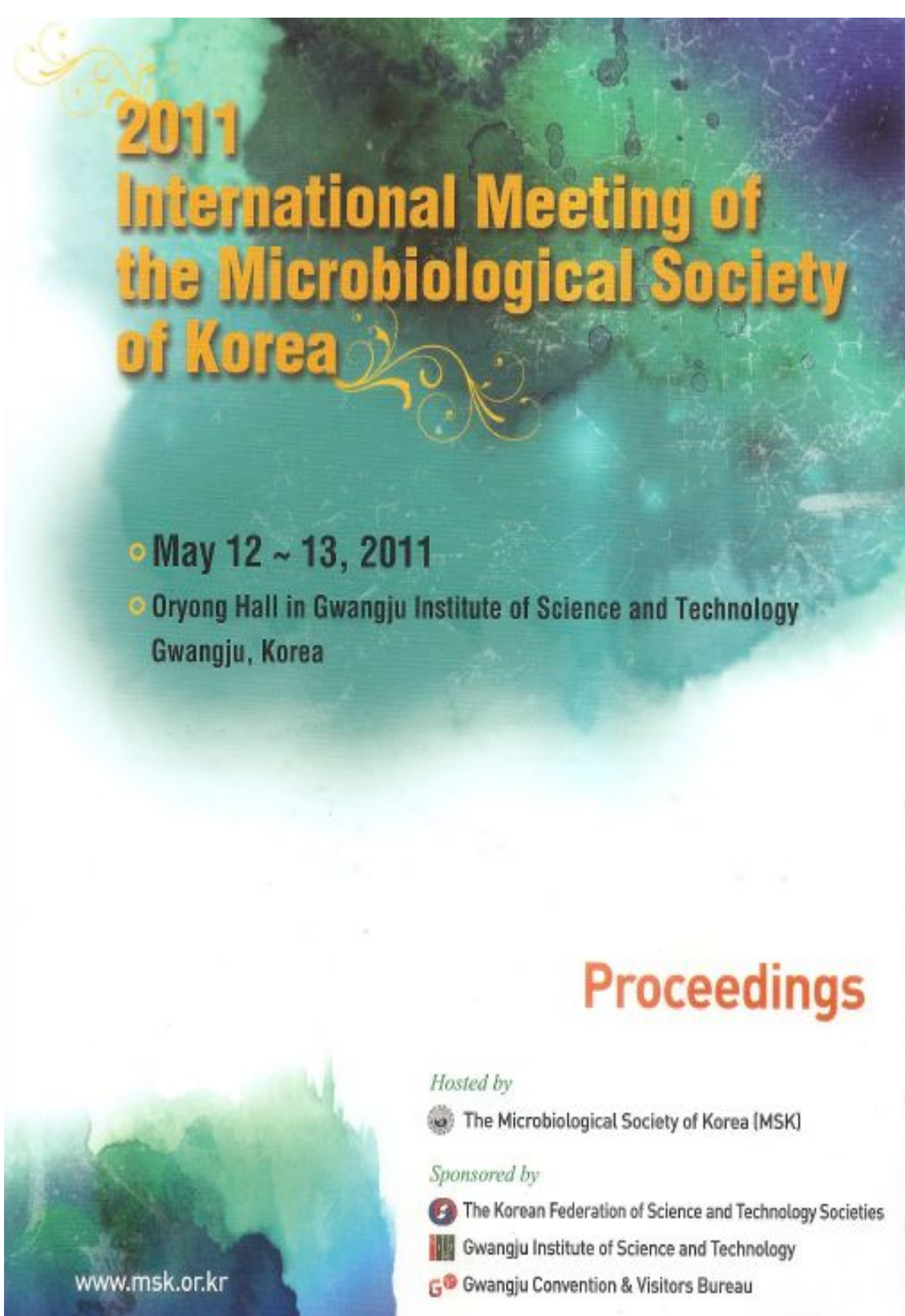
In this study, we compared *in vitro* and *in vivo* fibrinolytic activity of a fibrinolytic protease isolated from a new strain of *Streptomyces* with other prominent fibrinolytic enzymes— plasmin and urokinase. Molecular weight of the enzyme evaluated by MALDI-TOF is 9,439.5 Da which makes it the lowest molecular weight fibrinolytic enzyme reported so far. Fibrinolytic activity of the enzyme was 14.3±2.3-fold stronger than that of plasmin; however its activity was almost 2±0.15-fold weaker than that of urokinase. The activity was same in plasminogen- rich and plasminogen-free fibrin plate, implying that it does not activate plasminogen to plasmin. To evaluate the thrombolytic function *in vivo*, effect of the enzyme on carrageenan induced tail-thrombosis was investigated in mice. Tail-thrombus of the enzyme treated group was shorter than the physiological saline treated group and the decrement in the tail-thrombus was correlated with the enzyme dose, suggesting that the enzyme can be a strong candidate for thrombolytic therapy.

**Keywords :** fibrinolytic activity, *in vivo* activity, *Streptomyces*, Tail-thrombus, plasmin**DO28****Anti-Inflammatory Action of an Antimicrobial Substance, CRY, Isolated from a *Streptomyces* Strain**Seung Sik Cho and Jin Cheol Yoo<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chosun University

CRY, an antimicrobial compound purified from fermentation broth of *Streptomyces* sp. MO418, was found to inhibit the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6). CRY dose dependently inhibited NO production and inducible NO synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 macrophages activated with lipopolysaccharide (LPS). And, CRY showed nitric oxide-scavenging effect concentration-dependently. To investigate the signaling pathway for NO inhibition by CRY, we examined nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation in RAW 264.7 cells. We concluded that CRY inhibits the synthesis of pro-inflammatory cytokines and suppresses LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. CRY should be considered as a promising drug that has anti-inflammatory effect for preclinical and further pharmaceutical studies.

**Keywords :** *Streptomyces* sp. MO418, antimicrobial compound, NO production, lipopolysaccharide, inflammatory





# 2011 International Meeting of the Microbiological Society of Korea

- May 12 ~ 13, 2011
- Oryong Hall in Gwangju Institute of Science and Technology  
Gwangju, Korea

## Proceedings

*Hosted by*

 The Microbiological Society of Korea (MSK)

*Sponsored by*

 The Korean Federation of Science and Technology Societies

 Gwangju Institute of Science and Technology

 Gwangju Convention & Visitors Bureau

[www.msk.or.kr](http://www.msk.or.kr)

## G001

### Characterization of *p*-hydroxybenzoate Hydroxylase and *m*-hydroxybenzoate Hydroxylase from *Chromohalobacter* sp. HS-2

Wonduck Kim<sup>1</sup>, Yul Park<sup>1</sup>, Hye Gyoung Oh<sup>2</sup>, and Si Wook Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Primer Research center for controlling of Harmful Algal Bloom, Chonam University, <sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, BK21 Team for Biohydrogen Production, Chonam University

The genome of *Chromohalobacter* sp. HS-2, a moderate halophile, contains the supra-peritonic gene structure in which various genes for benzene metabolism located. In this study, two genes, *p*-hydroxybenzoate hydroxylase gene (*phbA*) and *m*-hydroxybenzoate hydroxylase gene (*mhbA*), in the gene cluster were characterized. The hydroxylase genes were cloned and overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant hydroxylase proteins were purified with a Ni-NTA column and following assays showed the optimal pH, temperature,  $V_{max}$  and  $K_m$  values for each enzyme. Interestingly, two recombinant enzymes retained significant activity under high NaCl concentration (up to 7%). HPLC analysis was performed to evaluate bioconversion capacity of the enzymes in the resting cells of *E. coli* BL21 (DE3) and it revealed that the recombinant *MhbA* converted 50% of *m*-hydroxy-benzoate into protocatechuate and the recombinant *phbA* converted 70% of *p*-hydroxy-benzoate into protocatechuate at 30°C, respectively. Currently, site directed mutagenesis experiment is performed to clarify roles of specific amino acid residues in *MhbA* for substrate specificity and enzyme activity.

[This research was supported by MEST.]

## G002

### Functional Analysis of Simultaneously Synthesized Peptide and Gold Nanoparticles Hybrid Spheres and Their Application Approaches

Jungok Kim<sup>1</sup> and Hor-Gil Hur<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Environmental Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology, <sup>2</sup>International Environmental Research Center, Gwangju Institute of Science and Technology

Hybrid spheres containing peptides and gold nanoparticles has been simultaneously synthesized in water using AG4 (NPSSLFRYLPSD) peptides which acted as a reducing agent to guide the nucleation and growth of gold nanoparticles and a precursor to form sphere-like structure by self-assembly. The self-assembled peptide spheres remain stable even after selective removal of the gold nanoparticles by iodide etching. The amino acids containing the aromatic functional group in the peptide sequence significantly affect the construction of sphere structures. The surface of gold nanoparticles containing hybrid spheres has been functionalized using thiol group linked to biomolecules. The ability to synthesize nanoparticle and self-assembled peptide structures with controlled size and composition in an environmental benign way will allow fabricating new class of multi-functional organic-inorganic hybrid superstructures for various biomedical and electronic applications.

[Supported by the National Research Foundation of Korea (NRF: 2010-0029224) grant and the 21C Frontier Microbial Genomics and Applications Center Program (2010-K000560) funded by the Korea government (MEST)]

## G003

### The 5'UTR Analysis of Human-Specific LINE-1

Seyoung Min<sup>1</sup>, Junghun Lee<sup>2</sup>, and Kyudong Han<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Advance Science, <sup>2</sup>Department of Neurobiomedical Science & WCU Research Center, Dankook University

Long interspersed elements (L1s) account for ~17% of the human genome. The human genome contains ~2,000 copies of human-specific L1s. However, among them, approximately 80 L1 copies are able to retrotranspose actively in the human genome, and they are called retrotransposition-competent L1s. The 5' untranslated regions of the human-specific L1s contain two promoters and several transcription-binding sites. Thus, we examined the sequence structures of the human-specific L1s and the mutation rate of their 5' UTR to understand the evolutionary history of L1s in the human genome. In addition, we calculated ages of the human-specific L1s, based on the neutral mutation rate by using multiple sequence alignment, network analysis, and megalign program, and characterize L1 structural components including 5'UTR, ORF1, ORF2, 3'UTR, poly (A) tail, and TSD. Our results showed that the mutation rate of 5' UTR is six times faster than those of other components of L1s, 3' UTR and partial ORF2. Thus, we suggest that relatively high mutation rate of 5' UTR in L1s could play a key role in regulating L1 retrotransposition activity and the number of retrotransposition-competent L1s in the human genome.

## G004

### Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Inhibitor Isolated from Newly Screened *Streptomyces* Strain

Yun Hee Choi, De Jeong Park, and Jin Cheul Yoo

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chonam University

As a part of an ongoing program developing biomedically applicable substances from microbial sources, we have focused on *Streptomyces*, which are rich source of novel compounds. We have selected a strain, indexed as strain-384 in our collection, that produced anti-MRSA (and VRSA, VRE) substance. An active compound with strong anti-inflammatory activity was purified from fermentation broth of the strain and named as CS384. It was found to inhibit the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6). Further, CS384 was found to regulate the expression of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The compound dose-dependently inhibited NO production and also blocked LPS-induced iNOS and COX-2 expression. It potently inhibited the translocation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) into the nucleus by I $\kappa$ B degradation following I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation, indicating that CS384 inhibits NF- $\kappa$ B activation. In conclusion, the results suggest that CS384 inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells by blocking NF- $\kappa$ B activation pathway.

## G005

### Purification and Immuno-stimulatory Activity of a Polysaccharide from *Streptomyces* sp. CS468

Yun Hee Choi and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

A polysaccharide from *Streptomyces* sp. CS468 was precipitated with ethanol and further purified by stepwise chromatography on Sepharose CL-6B and Sephadex G-50 column. The polysaccharide was detected at 490 nm after colorimetric assay with phenol-sulfuric acid method. To study the immunostimulatory action mechanism, we have examined stimulation of nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) induced by CS468. The modulation of iNOS expression by CS468 was evaluated by western blotting. Taking all the results together, we conclude that purified compound, CS468, stimulating immune functions of macrophages can serve as a strong immunostimulatory compound.

## G006

### Isolation of a Novel *Lactobacillus* Strain Secreting Broad-spectrum of Antibacterial Compound

Yun Hee Choi, Jung Wan Ha, and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

*Lactobacillus* strain CS-A1 was found to exhibit broad spectrum of antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms. The 16S rDNA sequence revealed that the strain is closely related to *Lactobacillus pentosus* with 99.862% sequence homology. The production of antibiotic from the strain was found to be most favorable when cultured for 3 days at 37°C and 180 rpm in a medium containing glucose and peptone as carbon source and beef extract, yeast extract as nitrogen source. The antibiotic was extracted using ethylacetate (1:1 v/v) and partially purified using both column and thin layer chromatographic techniques. Antimicrobial activity of the compound against different pathogenic strains was assessed using the antimicrobial spectrum. It was found to be active against all tested Gram-negative and Gram-positive bacteria. The result suggests that *Lactobacillus* strain CS-A1 produces high quality antibiotic that might be very useful to control varieties of pathogenic microbial growth.

## G007

### Purification and Characterization of a Novel Peptide Antibiotic from Newly Isolated *Bacillus* sp. CS61

Yun Hee Choi and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

A strain designated as CS61 in our collection showed high degree of sequence similarity in 16S rDNA analysis with *Bacillus amyloliquefaciens* (99.79%), therefore, it is classified as *Bacillus* sp. CS61. The strain produced an extracellular peptide antibiotic after almost three days of cultivation in the optimized liquid medium. The peptide antibiotic produced by the strain (CS61) was purified using a gel permeation chromatography on Sephadex G-50. CS61 was homogeneous in Tricine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine SDS-PAGE) with apparent molecular weight of 1,083 Da. First ten amino acid sequences of the amino terminal were AINXDAAYLA, which are different from so far reported peptide antibiotics. CS61 was examined for its antioxidative activities with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay and reducing power estimation. DPPH radical scavenging activity and the reducing power of the compound at 10 mg/ml were 25%, and 0.6 respectively. These results suggest that the peptide antibiotic isolated from *Bacillus* sp. CS61 is a natural peptide antibiotic with antioxidative activity.

## G008

### Isolation and Characterization of a Compound Effective Against Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) and *Staphylococcus aureus* (VRSA) from *Bacillus subtilis* CS19

Yun Hee Choi, Jin Hee Park, and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

A potent antimicrobial compound was purified from culture broth of *Bacillus* sp. CS19, a new *Bacillus* strain isolated from Korean soil. The production of antibiotic from the strain was found to be most favorable when cultured for 3 days at 37°C and 180 rpm in a shaking incubator using mannitol and beef extract as respective carbon and nitrogen sources. The compound from the culture broth was extracted using ethyl acetate and then applied to a reverse-phase column (5 cm × 1.2 cm) followed by preparatory TLC. Purity of the compound was assessed with TLC and UV detection. The compound showed potent antibacterial effect against various pathogenic resistant microorganisms including Vancomycin-resistant enterococci (VRE) and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA). To investigate the anti-inflammatory effect, we examined the production of nitric oxide. Results showed that CS19, without affecting cell viability, inhibited the production of NO production in RAW 264.7. These findings suggest that CS19 is a potent antimicrobial and anti-inflammatory agent.



## G009

### Beneficial Effect of an Antimicrobial and Anti-inflammatory Agent on 12-O-tetradecanoylphorbol Acetate Induced Ear Edema in Mice

Seung Sik Cho and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, Chosun University

*Streptomyces* sp. CS392 produced three anti-VRSA/VRE and anti-inflammatory substances (C1, C2 and C3). These compounds inhibited the production of pro-inflammatory cytokines, NO production, and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages. To investigate *in vitro* and *in vivo* relationship these compounds were assayed for topical anti-inflammatory activity by TPA-induced ear edema model. The anti-inflammatory activities (% inhibition) in the TPA-induced ear edema test shown by C1, C2 and C3 were 22.1%, 16.7% and 29.2%, respectively. These compounds thus showed slight inhibition of edema formation without any side effect. Using each ear punch biopsies, protein samples were taken from ear whole cell lysate and further investigated the effect of these compounds on iNOS expression by western blot analysis. Three compounds were found to inhibit TPA-induced expression of iNOS. In conclusion, These compounds have topical anti-inflammatory activity mediated via inhibition of iNOS expression. These findings seem to give a clear reason for the use of these compounds in the treatment of inflammation.

## G010

### Protective Effect of Compound C3, Produced by *Streptomyces* sp. CS392, in Dextran Sodium Sulfate Induced Mice Colitis

Seung Sik Cho and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, Chosun University

In this study, we investigated protective effect of antimicrobial and anti-inflammatory compound C3, produced by *Streptomyces* sp. CS392, on a mice model of colitis. Colitis was induced in ICR mice by administration of dextran sulfate sodium (DSS) (3%, w/v) in drinking water. DSS colitis model was well characterized morphologically and biochemically. DSS produced decrease in colon length accompanied by mucosal edema and bloody stool. To assess the dose effect on DSS-induced colitis, 1, 3, or 10 mg/kg/day of C3 was administered by intraperitoneal injection. Besides measuring colon length, we have estimated disease activity index (DAI) for a week, taking into account of body weight, stool consistency and gross bleeding. Pro-inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-6 (IL-6), were determined using immunoassays. C3 prevented shortening of colon length and reduced DSS-induced DAI scores including a decrease in weight loss, diarrhea, gross bleeding, and the infiltrations of immune cells. C3 also suppressed iNOS expression and abnormal secretions of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , and IL-6.

## G011

### Purification, Biochemical Properties and *In Vivo* Fibrinolytic Activity of an Extracellular Protease Secreted by a *Streptomyces* strain

Jaya Ram Srinivasulu, Praveen Mander, and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, Chosun University

In an effort to isolate a potential candidate for thrombolytic therapy, a proteolytic enzyme with strong fibrinolytic activity was purified from a newly isolated *Streptomyces* strain. Molecular weight, optimum pH, optimum temperature, pH stability, and thermostability of the enzyme were 17.6 kDa, pH 8.0, 50-55°C, pH 5.0-12.0 and  $\leq 40^\circ\text{C}$ , respectively. The activity was inhibited by PMSF and pepstatin and showed higher specificity towards chromogenic substrate for chymotrypsin, indicating that it is a chymotrypsin-like serine protease. Furthermore, amino acid side chain modification study suggests the involvement of Ser, Asp/Glu and His in the catalytic activity of the enzyme.  $K_m$  and  $V_{max}$  values determined with S-2586, a substrate specific to chymotrypsin, were 27  $\mu\text{M}$  and 313 mM/min mg, respectively. The first 15 N-terminal amino acids were IAGGQAIYAGGRRS, which are significantly different from other fibrinolytic enzymes. *In vivo* fibrinolytic activity of the enzyme was 14.3 $\pm$ 2.3-fold stronger activity than that of plasmin suggesting its pronounced potentiality in the thrombolytic therapy.

## G012

### *In Vivo* Efficacy of a New Low Molecular Weight Fibrinolytic Enzyme from Bacteria

Jaya Ram Srinivasulu and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, Chosun University

A fibrinolytic enzyme with strong fibrinolytic activity, FP28, was purified from a *Streptomyces* strain, recently isolated from Korea soil. The purified enzyme displayed very strong fibrinolytic activity in the *in vitro* experiments; therefore its *in vivo* efficacy was also evaluated considering its potential clinical application. To evaluate the thrombolytic function *in vivo*, effect of the enzyme on carrageenan induced tail-thrombosis was investigated in ICR mice. Tail-thrombus of the enzyme treated group was significantly shorter than the physiological saline treated group and the decrement in the tail-thrombus was correlated with the enzyme dose. The results strongly suggest that the enzyme can be a potential candidate for thrombolytic therapy.


www.ksbb.or.kr


2011년도  
한국생물공학회  
추계  
학술발표대회 및  
국제심포지움

2011 KSBB Fall Meeting &  
International Symposium

October 05(Wed) - 08(Sat), 2011  
Songdo Convensia, Incheon

Biotechnology -  
The Next Leading Edge in Global  
Economy

주최  한국생물공학회

후원  인천광역시  인천국제공항공사



미생물공학

- PME01** Enhancing biocatalytic production of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by the site-directed mutagenesis on the molecular surface of Vitamin D3 hydroxylase (P450 Vdh)  
Taiki NISHIOKA, Noriko IMOTO, Yoshiaki YASUTAKE<sup>1</sup> and Tomohiro TAMURA<sup>1</sup>  
 Lab. of Molecular Environment Microbiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, JAPAN.  
<sup>1</sup>Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Sapporo 062-8517, JAPAN.
- PME02** Development of an expression platform by using the actinomycete *Rhodococcus erythropolis* as a host cell-protein expression and protein degradation  
Hea-Yeon YUN, Noriko TAMURA<sup>1</sup> and Tomohiro TAMURA<sup>1</sup>  
 Lab. of Molecular Environment Microbiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, JAPAN.  
<sup>1</sup>Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Sapporo 062-8517, JAPAN.
- PME03** Isolation and Characterization of a New *Klebsiella pneumoniae* Strain Having Improved Growth Characteristics  
Valarasu MARIADHAS, Ashok SOMASUNDAR and Sunghoon PARK  
 Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Pusan National University, Busan 607-735.
- PME04** An alkaline lipase from *Streptomyces* sp. CS273 with organic solvent tolerance property and its application in biodiesel production  
Poonam MANDER and Jin Cheol YOO  
 Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.
- PME05** Identification and characterization of *Lactobacillus* sp. CS0A producing antibacterial compound against Gram-positive and Gram-negative pathogenic microorganisms

Seung Sik CHO, Jaya Ram SIMKHADA, Yun Hee CHOI, Da Jeong PARK, Jin Hee PARK and Jin Cheol YOO

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.

- PME06** Synergistic antimicrobial effect of nargenicin isolated from *Nocardia* sp. CS682 with other commercial antibiotics  
Yun Hee CHOI and Jin Cheol YOO  
 Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.
- PME07** Identification and Screening of High Efficient Aldehyde Dehydrogenase for the Production of 3-Hydroxypropionic Acid from Glycerol by *Klebsiella pneumoniae*  
Yeounjoo KO, Ashok SOMASUNDAR and Sunghoon PARK  
 Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Pusan National University, Busan 607-735.
- PME08** Cloning and Expression of Invasion Plasmid Antigen H (*ipaH*) Gene of *Shigella sonnei*  
Myung-Suh SONG, Hyun-Ju UM, Hongik KIM<sup>1</sup>, Jihoo MIN<sup>2</sup> and Yang-Hoon KIM  
 Dept. of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763,  
<sup>1</sup>R&D Division, Vitabio, Inc., 483 Expo-Ro, Yuseong-Gu, Daejeon 300-824, South Korea,  
<sup>2</sup>Graduate School of Semiconductor and Chemical Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756.
- PME09** PCR-based Tandem Epitope Tagging of Chromosomal Genes for *Streptomyces* Genome Engineering  
Ji-Nu KIM, Jeong Sang YI, Bo-Rahn LEE, Byung-Kwan CHO<sup>1</sup> and Byung-Gee KIM  
 School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul, South Korea.  
<sup>1</sup>Department of Biology, KAIST, Daejeon, South Korea.
- PME10** Effects of different calcium salts on the calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii*  
Choco Michael GOROSPE, Sang-Hyun HAN, Seong-Geun KIM and Jae-Seong SO  
 Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon, 402-751.

Proceedings

2011 한국미생물학회연합  
국제학술대회

# International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies

- October 13(Thu)~14(Fri), 2011
- Seoul KyoYuk MunHwa HoeKwan, Seoul, Korea

#### Organized by

The Federation of Korean Microbiological Societies (FKMS)

#### Hosted by

The Korean Society of Virology (KSV)

The Korean Society for Microbiology (KSMi)

The Korean Society of Mycology (KSMy)

The Korean Society for Microbiology and Biotechnology (KMB)

The Microbiological Society of Korea (MSK)

#### Sponsored by

Ministry of Environment

Infection Signaling Network Research Center, Chungnam National University

Korean Federation of Science and Technology Societies

Korea National Microorganisms Research Resources Center

National Institute of Biological Resources

 한국미생물학회연합  
<http://www.fkms.kr>

**HO65****Anti-inflammatory Effects of CS384 in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells**

Yun Hee Choi, Seung Sik Cho, and Jin Cheol Yoo\*

\*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

The aim of the present study was to investigate the anti-inflammatory effect of CS384, produced by *Streptomyces* sp. CS384. We have focused on *Streptomyces* because this genus is the prime source of novel compounds. We have selected a strain, indeed as strain-384 in our collection, which produced anti-MRSA (anti-VRSA and anti-VRE) substance. The compound was purified by reverse-phase C18 column with 50% acetonitrile linear gradient. MICs of the compounds against 36 pathogenic strains were determined using the agar dilution method. In RT-PCR and western blotting analysis, CS384 was found to inhibit gene expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6). Further, CS384 was found to regulate the gene expression of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Further, the compound dose-dependently inhibited NO production and also blocked LPS-induced iNOS and COX-2 expression.

**Keywords:** Raw 264.7, Inflammation, *Streptomyces*

**HO66****Application of *Paenibacillus polymyxa* E681 for Development of Anti-fungal Cement Mortar**Sung-jin Park<sup>1</sup>, Jong-Myong Park<sup>1</sup>, Woo-Jung Kim<sup>1</sup>, and Sa-Youl Shim<sup>2</sup>\*

\*School of Life Science, Kyungpook National University, School of Architecture &amp; Architectural Engineering, Kyungpook National University

The aim of this study is to utilize of *Paenibacillus polymyxa* E681 to suppress fungal growth which causes pollution on the surface of cement structure and building. The cement mortar containing *P. polymyxa* E681 exhibited outstanding antifungal effect on *Aspergillus niger* that is easily discovered in the interior and exterior of concrete buildings. Also, the cement crack treated with *P. polymyxa* E681 showed no fungal growth but the crack of non-treated bacteria was polluted by widespread growth of fungi. In addition to the investigation of the possible advantages of bacteria application, the experiments of compressive strength, crack remediation, and water permeability were carried out. In this study, the various advantages of using *P. polymyxa* E681 to prevent fungal growth and improve the durability of cement material were found.

**Keywords:** *Paenibacillus polymyxa* E681, Antifungal cement mortar, *Aspergillus niger*, compressive strength, crack remediation

**HO67****A lipase from *Streptomyces* sp. CS133 with Organic Solvent Tolerance Property and Its Application in Production of Biodiesel from Vegetable Oils**

Peonam Mander and Jin Cheol Yoo\*

\*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

An organic solvent tolerant lipase is highly desirable for enzymatic transesterification. In response to such desirability, a lipase from *Streptomyces* sp. CS133 has been purified to homogeneity. Furthermore, its biochemical characteristics were investigated. Relative molecular mass of the purified enzyme was estimated to be 39.8 kDa by SDS-PAGE. The optimum temperature for the lipase activity was found to be 40 °C and had a good stability when it was below 50 °C. The optimum pH for the activity of lipase was 7.5 and was stable at pH 5.0 – 9.0. The lipase showed hydrolysis efficiency towards various *p*-nitrophenyl esters, but showed the highest hydrolytic activity towards long chain *p*-NP palmitate C<sub>16</sub>. It showed non position specificity for triolein hydrolysis. Its catalytic involvement in biodiesel production was confirmed by performing enzymatic transesterification of vegetable oils.

**Keywords:** Lipase, Biodiesel, *Streptomyces*

**HO68****Antifungal Activities of 4-(*o*-Tolylamino)-2-(3-phenylprop-1-enyl)quinolin-8-ol and Its Derivatives**Yi-Na Kim<sup>1</sup>, Youngho Jang<sup>1</sup>, Ah-Ra Goh<sup>1</sup>, Da-Mi Cheon<sup>1</sup>, Daeok Choi<sup>2</sup>, and Sang Ki Choi<sup>2</sup>\*

\*Department of Biological Sciences, Seoul National University, School of Chemistry and Pre-med, Seoul National University

Many pathogenic fungi tend to acquire resistance to the antifungals although a number of antifungal drug has been developed. Thus it is necessary to develop novel drug based on new target proteins in fungi. We previously reported that 3-methyl-1-(2-methylphenyl)-1H-Pyrrole[5,2-*c*]quinolin-8-ol was novel antifungal compound reducing growth of pathogenic fungi significantly. To improve efficiency of chemical synthesis of the compound as well as antifungal activity further, we tried to modify the chemical and examined the antifungal activities. 4-(*o*-Tolylamino)-2-(3-phenylprop-1-enyl)quinolin-8-ol and its 8-methoxylated compounds was synthesized and checked antifungal activities. Growth of yeasts *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida lusitanae*, and *Cryptococcus neoformans* was inhibited over 50% at RPMI medium containing 0.1µg/ml 4-(*o*-Tolylamino)-2-(3-phenylprop-1-enyl)quinolin-8-ol, but not at 8-methoxylated compounds. This result indicates that 8-hydroxy group of 8-hydroxyquinoline was more important for the activity than 8-methoxy group. Growth inhibition of *Candida* species by *N*-alkylated compound 4-(*N*-Allyl-*o*-tolylamino)quinolin-8-ol induced approx. 50 times, indicating that 2-alkylation is more active than *N*-alkylation. These data would be useful in the development of potential antifungal molecules.

**Keywords:** Antifungal, antifungal activities



**HO73****Observation of Phleichrome Overproducing Mutants and Investigation of its Metabolism by Molecular Tools in *Cladosporium phlei***

Kum-Kang So, Ngoc-Luong Nguyen, Jung-Mi Kim, and Dae-Hyuk Kim

Department of Biology, Chonbuk National University

Phleichrome pigment produced by a *Cladosporium phlei* is a pathogenic toxin of timothy plant (*Phleum pratense*). Phleichrome reacts with oxygen molecules following light activation to produce highly toxic reactive oxygen species. Phleichrome is structurally similar to chlorochrome and several other 4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone fungal toxins. Phleichrome has a huge potential to be used as photodynamic agent for treatment of cancer and viral infection. Using the UV mutagenesis method we were successfully in obtaining two mutant strains that overproduced phleichrome in different culture conditions compared with the wild type strain. In particular, the M0035 strain overproduce phleichrome in V8 juice medium while the M0045 strain overproduce V8 juice medium supplemented with glucose and malt extract. To gain insight into the metabolic pathway of phleichrome production we also performed to clone and sequence several Polyketide synthase (PKS) genes. Among these gene, a non-reducing type PKS is of special interest because it is known that in most fungal pigments, non-reducing PKS genes play the central role in their metabolic pathways. Biological characterization of the gene has studied to determine its role in the production of phleichrome and open possibility of metabolically engineering this pathway for overproduction of the desired substance. In addition, the biological activity of phleichrome purified from M0035 mutant has also investigated *in vitro*.

**Keywords:** *Cladosporium phlei*, phleichrome, polyketide synthase

**HO74****A Potent Antimicrobial Peptide from *Bacillus* sp. CS32**

Do Jeong Park and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

*Bacillus* sp. CS32 was screened from a large number of *Bacillus* strains isolated from Korean soil for the production of an antibacterial substance against various pathogenic organisms, especially against multi drug resistant *Staphylococci* and *Enterococci*. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA showed that the strain was 99.39 % similar to *Bacillus licheniformis* ATCC 14580(T). An antimicrobial peptide was partially purified from culture broth of the strain. The peptide showed potent antibacterial effect against various pathogenic microorganisms including methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant *enterococci* (VRE). In MIC test, it displayed wide antimicrobial effect; we are suggesting that it can serve as an effective antibacterial peptide for clinical application.

**Keywords:** antimicrobial peptide, *Bacillus* sp. CS32, MRSA

**HO75****Studies of the *metK* Gene on Secondary Metabolite Production of *Streptomyces acidiscabies***

Wijeong Kim, Duho Son, Yongil Hwang, and Sunuk Choi

Department of Food Science and Biotechnology, Ajou University

Thaxtomin produced by *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, and *S. negibiscabies* causes potato scab disease. The disease is known as deep-pitted lesions, raised scab and common scab to surface, and results economically in a serious loss to the crop. In addition, S-Adenosyl-L-methionine synthetase (SAM-s) catalyzes the biosynthesis of SAM from ATP and L-methionine. SAM plays important roles in the primary and secondary metabolism of the cell. A *metK* encoding a SAM-s from *S. acidiscabies* was searched by PCR using the primers designed from the two highly conserved regions, and then an intact 1.2-kb *metK* gene of *S. acidiscabies* was cloned by genomic Southern hybridization with PCR product as a probe and then studied. In order to verify the function of the cloned *metK* gene, a *metK* high expression vector for *Streptomyces* strains was constructed by using pSET152ET, and then was introduced into *S. lividans* TK24 as host by transconjugation using *E. coli* ET12567(pUZD802). Thaxtomin and actinorhodin production of the ascogiant containing the *metK* high expression vector was compared with a control strain. [This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2010-0008443)]

**Keywords:** thaxtomin, *S. acidiscabies*, Potato scab disease

**HO76****Optimization of Production of Alginate Monosaccharide Using Alginate Lyase of *Sphingomonas* sp. MJ-3**Jung Won Shin<sup>1</sup>, Mi Ri Ryu<sup>1</sup>, Sung Hae Choi<sup>2</sup>, Hee Sook Kim<sup>2</sup>, and Eun Yeon Lee<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, <sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyungpook University

Alginate is a polysaccharide produce from brown seaweed. Recently, the recombinant alginate lyase from marine bacterium, *Sphingomonas* sp. MJ-3, was cloned and characterized to be a lyase with catalytic  $\beta$ -elimination activity. MJ-3 alginate lyase can be used for degrading alginate into alginate monosaccharides in order to use alginate as renewable carbon source. The conditions of recombinant protein expression and alginate degradation reaction were optimized. The specific activity of the alginate lyase was 1.5-fold enhanced. Alginate was successfully degraded into unsaturated monosaccharides by the recombinant alginate lyase as the biocatalyst.

**Keywords:** monosaccharification, catalytic activity, alginate lyase

# 2012 한국생물공학회 춘계학술발표대회 & 국제심포지움

## 2012 KSBB SPRING MEETING & INTERNATIONAL SYMPOSIUM

2012. 4. 11(수) ~ 13(금)  
창원 컨벤션센터  
April 11~13, 2012  
Changwon Exhibition Convention Center



• 준비위원회 •

학술	재무
위원장: 주우홍 교수 (청원대)	위원장: 이재현 대표 (다인바이오)
위 원: 김용성 교수 (아주대)	위 원: 김성구 교수 (부경대)
김철준 교수 (경상대)	김재호 박사 (한국식품연구원)
류희욱 교수 (송실대)	김진현 교수 (공주대)
서태석 교수 (KAIST)	민준홍 교수 (중앙대)
이운열 교수 (경희대)	박성훈 교수 (부산대)
전태준 교수 (인하대)	배경동 박사 (베르나바이오테)
최선욱 교수 (경남대)	양영렬 박사 (CJ)
최병대 교수 (경상대)	이상열 교수 (가천대)
	이은교 박사 (KRIBB)
	원종인 교수 (홍익대)
	정병현 박사 (KRIBB)

주최 : 한국생물공학회

## A novel hyperalkaline xylanase from a newly isolated *Streptomyces* strain

Seung Sik Cho<sup>1</sup>, Jaya Ram Simkhada, Yun Hee Choi, and Jin Cheol Yoo\*

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo University Jeonnam, Korea.<sup>1</sup>*

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.*

### Abstract

*Streptomyces* sp. CS802, recently isolated from Korean soil, produced xylanase in corn-cob medium. An extracellular xylanase (Xyn802) was purified by a single step gel filtration and biochemically characterized. It showed high activity in extremely alkaline condition with optimum pH at 12.0 and exhibited stability between pH 7.5 and 13.0. It produced xylobiose and xylotriose as the major products from xylan, suggesting its endoxylanase nature. N-terminal amino acid sequences of Xyn802 were ADRNANRD which are significantly different from the reported xylanase. The activity was enhanced by various detergents and a reducing agent and stable in range of organic solvents. Xyn802 produced by utilizing corn-cob, an agro-waste material, might be a novel xylanase based on its peculiar biochemical characteristics. Due to lack of cellulase activity and ability of producing xylooligosaccharides from xylan, Xyn802 can be a suitable candidate for pre-bleaching of paper pulps and generating xylooligosaccharides.

## **An extracellular alkaline xylanase active in broad range of temperature originated from a microbial source.**

Pradeep G.C. and Jin Cheol Yoo\*

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.*

### **Abstract**

Industrial waste materials has become one of the global challenges and remained as a centre of attraction for the production of value added materials such as bioethanol and oligosaccharides. In an attempt to address the current situation, CS428, a new soil isolate capable of producing industrially applicable lignocellulose degrading enzyme, was isolated from Korean soil. An extracellular xylanase produced by the strain in culture medium containing 1.25% beech wood was purified and biochemically characterized. Enzyme production was highest at 2 to 3 days and the medium pH was found increasing with the increase in enzyme activity. The enzyme was thermostable and displayed broad range of pH stability (from pH 4.0 to pH 12.0). Further, the enzyme showed maximum activity at pH 12.0 and at 60°C with activity in broad temperature range (30 to 75°C). Because of high range of pH and thermostability, this enzyme can be a good candidate in the field of bioindustries.

## An alkaline and moderately thermostable xylanase from a new soil isolate

Md. Arifur Rahman, and Jin Cheol Yoo\*

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.*

### Abstract

In an attempt to isolate xylanase from microbial sources, *Streptomyces* sp. CSWu-1 was recently isolated from Korean soil and identified according to various characteristics including 16S rRNA sequencing. The strain produced high xylanase activity (XynWu-1) in xylan medium. Production profile showed that the highest activity was produced at 80 h when cultivated at 28°C and 120rpm. The enzyme was optimally active at 50°C and at pH 11.0, suggesting that the enzyme is alkaline and moderately thermostable. One peculiar characteristic of XynWu-1 is that it was highly dependent on buffer concentration and its maximum activity was found below 25mM.



**Purification and biochemical characterization of a thermostable xylanase  
from Korean soil bacteria**

Jaya Ram Simkhada and Jin Cheol Yoo\*

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.*

**Abstract**

*Streptomyces* sp. CSWu2 was recently isolated from Korean soil as a xylanase producer. An extracellular xylanase with 38 kDa molecular size was purified by a single step gel filtration using HQ-poros and various biochemical characteristics of the enzyme were determined. It showed high activity in neutral to alkaline condition and showed thermostability upto 60°C. It produced xylose and xylobiose as the major products from xylan. The activity was suppressed by most of the metal ions except potassium. The enzyme hydrolyzed corncob more efficiently than rice stem or rice husk. The thermostable and alkaline enzyme could be useful in various facets of biotechnology such as in xylooligosaccharides production, bioethanol production etc.

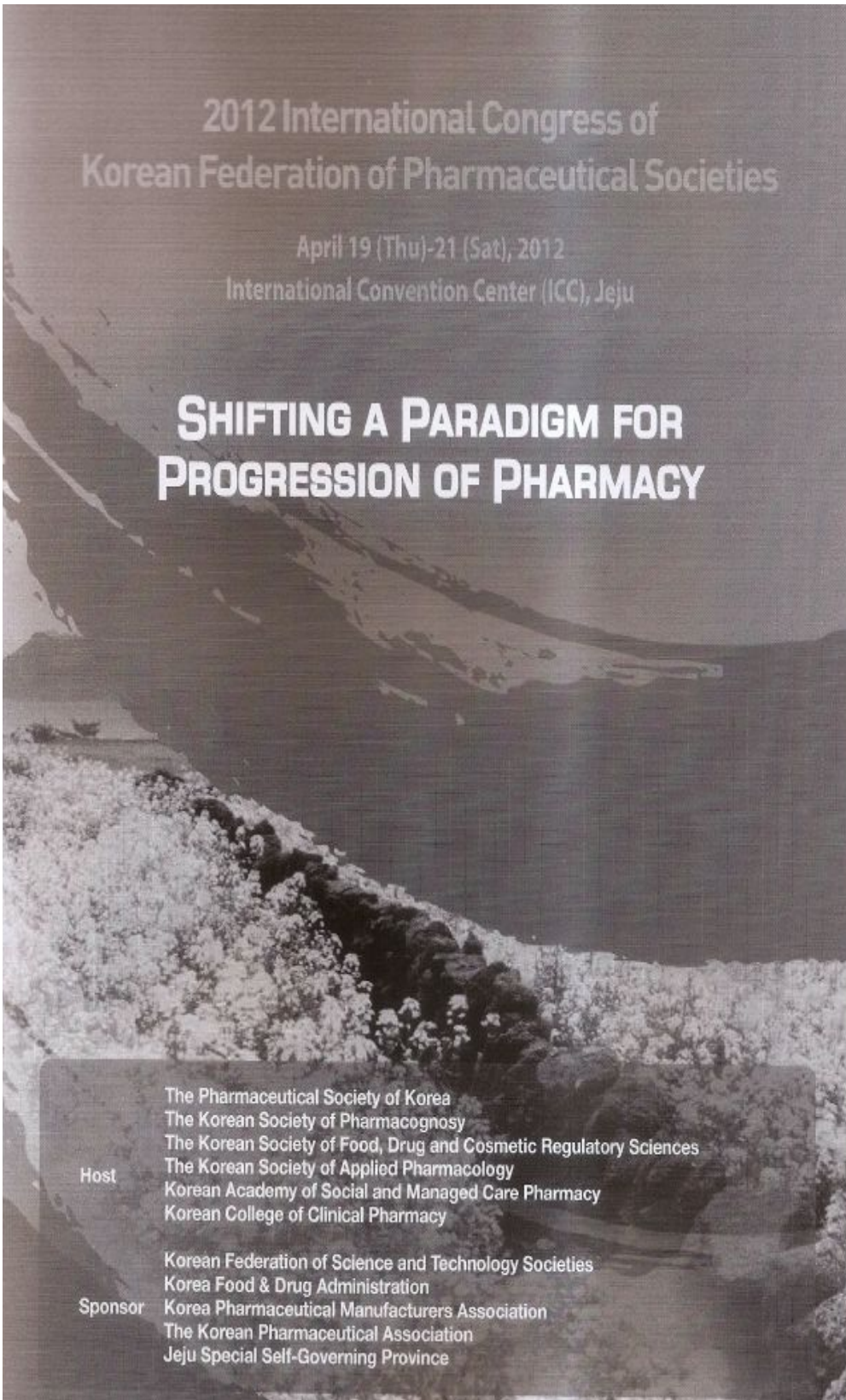
## Screening of *Streptomyces* strains capable of producing cellulase using CMC-agar plate

Jaya Ram Simkhada, Yo Na Park, Yoon Seok Choi, and Jin Cheol Yoo\*

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.*

### Abstract

Cellulose is a linear polymer of glucose units linked together by  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds and is found as a major component of plant biomass that is naturally degraded by cellulolytic fungi and bacteria. Cellulose hydrolysis to glucose is performed *via* the synergic action of three cellulolytic enzymes: endo- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exo- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.91) and  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21). Production of glucose from agro industrial waste which can be utilized to produce value added products such as bioethanol is center of attraction of this era. Although there are several reports of potent cellulose producer from wide variety of microorganisms, it is rare from *Streptomyces*, which is known as the major producer of commercial antibiotics. In an attempt to screen *Streptomyces* strains capable of producing several cellulolytic enzymes from many *Streptomyces* strains preserved in our laboratory, carboxymethyl cellulose (CMC)-agar plate method was used. Out of 62 strains, we found cellulolytic activity produced by 61 strains. Thus, although qualitative, we can conclude that almost all (~98%) *Streptomyces* strains are producer of cellulolytic enzymes in CMC-agar media, which can give a significant insight in the related field.



2012 International Congress of  
Korean Federation of Pharmaceutical Societies

April 19 (Thu)-21 (Sat), 2012  
International Convention Center (ICC), Jeju

**SHIFTING A PARADIGM FOR  
PROGRESSION OF PHARMACY**

Host

The Pharmaceutical Society of Korea  
The Korean Society of Pharmacognosy  
The Korean Society of Food, Drug and Cosmetic Regulatory Sciences  
The Korean Society of Applied Pharmacology  
Korean Academy of Social and Managed Care Pharmacy  
Korean College of Clinical Pharmacy

Sponsor

Korean Federation of Science and Technology Societies  
Korea Food & Drug Administration  
Korea Pharmaceutical Manufacturers Association  
The Korean Pharmaceutical Association  
Jeju Special Self-Governing Province



albumin) by mixing with oil (Incomplete Freund's Adjuvant) with GA (BSA/GA/IFA) or without GA (BSA/IFA) on days 1 and 22. For a positive control, a mixture of BSA plus Complete Freund's Adjuvant (BSA/CFA) was used. One week after the booster, antisera were collected from each of these mice groups in order to determine the IgG specific for BSA. IgG isotyping, and the induction of IFN and IL-4, respectively. Results showed that GA up to 50  $\mu$ M activated T cells without killing them. In that range of the GA concentration, GA enhanced the proliferation of T cells in a dose-dependent fashion. Analyses of the antisera revealed that the BSA/GA/IFA induced the IgG production app. 70% more than did the BSA/IFA in mice ( $P < 0.05$ ). In addition, the GA addition in the formula increased the ratio of IgG2a to IgG1, which indicates a Th1 immune response. The cytokine profiling revealed that the BSA/GA/IFA enhanced the production of IFN (Th1 type cytokine), whereas BSA/IFA produced IL-4 (Th2 type cytokine) more. Combined together, these data indicate that GA has the immunoregulatory activity which is polarized towards a Th1 immunity.

**P5-16 Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by *Streptomyces* sp. extract through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells.**

CHO Seung Sik, CHOI Yun Hee<sup>1</sup>, YOO Jin Cheol<sup>2\*</sup>

Department of Pharmacy, Mokpo National University, Muan, Jeonnam, 534-729, Korea, <sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea., <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

\*Corresponding author : jcyu@chosun.ac.kr

Presenting author : jcyu@chosun.ac.kr

The anti-inflammatory effects of *Streptomyces* sp. extract(SE) isolated from the Korean soil *Streptomyces* strain in Raw 264.7 cell was investigated. SE reduced lipopolysaccharide (LPS)-induced protein levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) and the mRNA expressions of iNOS, COX-2, tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), in a concentration-dependent manner, as determined by Western blotting and RT-PCR, respectively. Furthermore, SE inhibited the LPS-induced DNA binding activity of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB). These results suggest that the down regulation of iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  expression by SE are achieved by the down regulation of NF-kB activity, and that is also responsible for its anti-inflammatory effects.

**P5-17 Antibacterial and Anti-inflammatory activities of PA5 compound produced by *Bacillus subtilis* from Korean traditional kimchi**

MANDER Poonam, CHO Seung Sik<sup>1</sup>, YOO Jin Cheol \*

Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea., <sup>1</sup>Department of Pharmacy, Mokpo National University, Muan, Jeonnam, 534-729, Korea

\*Corresponding author : jcyu@chosun.ac.kr

Presenting author : jcyu@chosun.ac.kr

The antimicrobial and anti-inflammatory activities of PA5 compound isolated from *Bacillus subtilis* were investigated. Antimicrobial activity was measured using paper disc diffusion method. PA5 inhibited the growth of various gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, MRSA and VRSA. PA5 was applied for the suppression of lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory response in macrophages. It was found to reduce nitric oxide (NO) production from LPS stimulated Raw 264.7 cells. MTT assay showed that PA5 inhibited growth of Raw 264.7 cells in a dose dependent manner. Pretreatment of Raw 264.7 cells with PA5 reduced the iNOS and expression of mRNA. These results suggest the use of PA5 compound as an anti-inflammatory and antimicrobial drug.

# Bioenergy Korea Conference 2012

## International Symposium

바이오에너지 코리아 컨퍼런스 2012 국제심포지엄

- 농촌진흥청 50주년 기념 -

April 24~25, 2012

Kimdaejung Convention Center, Gwangju, Korea

2012. 4. 24(화)~25(수)

광주, 김대중컨벤션센터

**Program**  
**Abstracts**  
**Participants**

*Organized by*



The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering



Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy  
& Biomaterials, Chonnam National University



Rural Development Administration



BK21 Higher Education Center for Bioregulator Research



Research Institute for Catalysis, Chonnam National University

mol/min/L (7U/L), MG decolorization by MnPH4 showed higher removal rate than the reaction to which 100  $\mu$ M H2O2 was directly added. Within 90 minutes of incubation, the coupling reaction could rapidly decolorize MG up to 124.6  $\mu$ M. These results suggest that rGLOX is useful as a H2O2-generating enzyme in MO decolorization by rMnPH4.

A26

**Heterologous expression and characterization of manganese peroxidase isozyme isolated from *Phanerochaete chrysosporium***

Saravanakumar Thiyyagarajan<sup>1</sup>, Hyun-Young Kim<sup>2</sup>, Jung-Mi Kim<sup>3</sup>, Dae-Hyuk Kim<sup>3</sup>, and Seung-Moon Park<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea, <sup>2</sup>LED-Agritbio Fusion Technology Research Center, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea, <sup>3</sup>Institute for Molecular Biology and Genetics, Center for Fungal Pathogenesis, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea  
TEL: +82-63-850-0837, FAX: +82-63-850-0834

The cDNA encoding manganese peroxidase isozyme H4 (MnPH4), isolated from *Phanerochaete chrysosporium*, was expressed in *Pichia pastoris*. The recombinant MnPH4 was efficiently secreted into the medium upon hemin supplementation, at a maximum concentration of 500 U/L, and the purified rMnPH4 was used to decolorize various types of industrial dyes. rMnPH4(0.5U) was able to decolorize 100ppm of anthracene, azo, and triphenylmethane dyes by 99%, 40%, and 68% within 60 minutes. Use of HOBT (1 mM) as a redox mediator increased the decolorization rate of the azo dye, methyl orange but did not increase the decolorization rate of the triphenylmethane dye, malachite green. This rMnPH4 and a redox mediator will improve decolorization of effluents from the textile industry in an energy efficient and eco-friendly manner.

A27

**An ammonium sulfate sensitive thermostable xylanase from *Streptomyces* for the conversion of agro-industrial waste materials**

Jaya Ram Simkhad<sup>a</sup>, Hah-Young Yoo<sup>a</sup>, Don Hee Park<sup>b</sup>, Seung Wook Kim<sup>a</sup>, and Jin Cheol Yoo<sup>a</sup>  
Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.

<sup>a</sup>Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul, Korea

<sup>b</sup>Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy & Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

TEL: +82-062-230-6380, FAX: +82-062-227-3963

*Streptomyces* sp. Wu2 was newly isolated and identified from Korean soil. The strain produced a highly active xylanase (Xynwu2) in culture medium. It was purified to homogeneity by a single step protocol using anion exchange chromatography. The xylanase was ~38 kDa size as estimated by SDS-PAGE and xylan-zymography. It was thermostable and its activity was slightly enhanced by nonionic detergents. Its activity was inhibited by EDTA, EGTA and divalent metal ions. Xynwu2 was highly sensitive to ammonium sulfate and the activity can be recovered after desalting out. It produced xylose and xylobiose from xylan. Importantly, it efficiently degraded corncob, an agro-industrial waste material as evidenced by scanning electron micrography. Therefore, Xynwu2 can be a potential candidate for converting lignocellulosic waste material into glucose which can be eventually used to produce bioethanol. The enzyme thus could be a potential candidate in various facets of biotechnology including bioenergy.

A28

**Purification and biochemical characterization of a novel alkaline xylanase from *Streptomyces* sp. CS428**

Pradeep G.C., Yoon Seok Choi, Seung Sik Cho<sup>1</sup>, and Jin Cheol Yoo<sup>a</sup>

Department of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Mokpo National University, Muan, Jeonnam, 534-729, Korea

TEL: +82-062-230-6380, FAX: +82-062-227-3963

Industrial waste materials has become one of the global challenges and remained as a centre of attraction



for the production of value added materials such as bioethanol and oligosaccharides. In an attempt to address the current situation, *Streptomyces* sp. CS428, capable of producing industrially applicable lignocellulose degrading enzyme, was isolated from Korean soil. An extracellular Xylanase of approximately 37 kDa, produced by the strain in culture medium containing 1.25% beech wood was purified and biochemically characterized. Enzyme production was highest at 2 to 3 days and the medium pH was found increasing with the increase in enzyme activity. The enzyme was thermostable and displayed broad range of pH stability (from pH 4.0 to pH 12.0). Further, the enzyme showed maximum activity at pH 12.0 and at 80°C with activity in broad temperature range (30 to 90°C). Because of high range of pH and thermostability, this enzyme can be a good candidate in the field of bioindustries.

A29

**A novel salt dependent alkaline xylanase from *Streptomyces* sp. CSWu-1**

Md. Arifur Rahman, Yun Hee Choi and Jin Cheol Yoo\*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.  
TEL: +82-062-230-6380, FAX: +82-062-227-3963

*Streptomyces* sp. CSWu-1, recently isolated from Korean soil, produced xylanase in various medium. Especially, the strain produced high xylanase activity (XynWu-1) in xylan medium. An extracellular xylanase activity (XynWu-1) was purified by DEAE-sepharose chromatography and HQ-porus chromatography. The xylanase was ~34 kDa size as estimated by SDS-PAGE and xylan-zymography. The purified enzyme was optimally active at 60°C and at pH 11.0, suggesting that the enzyme is alkaline and moderately thermostable. Also, XynWu-1 was highly dependent on buffer concentration and its maximum activity was found below 25mM. XynWu-1 activity was enhanced with detergent, oxidizing & reducing agent, metal ion & organic solvent.

A30

**Ethanol production using whole plant biomass of Jerusalem artichoke by *Kluyveromyces marxianus***

Seonghun Kim, Jang Min Park, Jeong Woo Seo, and Chul Ho Kim

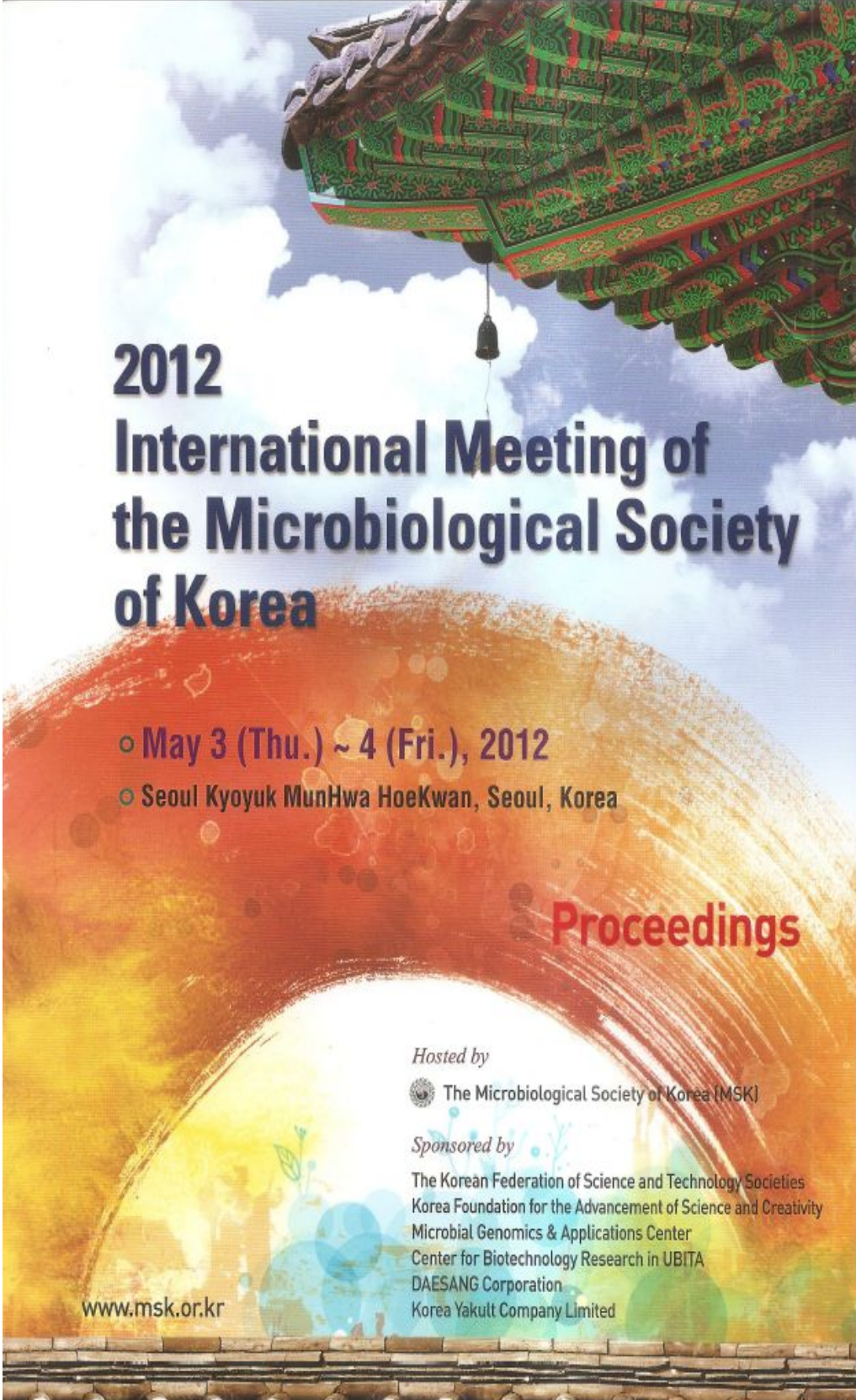
Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology  
181 Ipsin-gil, Jeongeup 580-185, Korea  
TEL: +82-63-570-5113, FAX: +82-63-570-5109

Jerusalem artichoke, one of the low-requirement sugar crops, is an inexpensive and widely available non-grain raw biomaterial containing cellulose and hemicelluloses in the stalk and a high content of inulin in the tuber. However, the lignocellulosic component in Jerusalem artichoke stalk reduces the fermentability of the whole plant for efficient bioethanol production. In this study, Jerusalem artichoke stalk was pretreated consequently by diluted acid, alkali-treatment and then enzymatically hydrolyzed. In the sequential acid/alkali-pretreatment for Jerusalem artichoke stalk, approximately 90% of the hemicellulose and 60% of the lignin can be removed from the biomass. Under optimum condition, the ratio of cellulose to lignin in the pretreated stalk was 3.9 under the optimum chemical pretreatment process. This value was 2.5-fold higher than that of the untreated biomass. In enzymatic hydrolysis, approximately 88% of the glucan and xylan were converted to glucose and xylose, respectively. Batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of pretreated stalk and tuber by *Kluyveromyces marxianus* CBS1555 were effectively performed, yielding 29.1 g/L and 70.2 g/L ethanol, respectively. In fed-batch fermentation, ethanol productivity was 0.255 g ethanol per gram of dry Jerusalem artichoke biomass, or 0.361 g ethanol per gram of glucose, with a 0.924g/L/h ethanol productivity. These results show that combining the tuber and the stalk hydrolysate is a useful strategy for whole biomass utilization in effective bioethanol fermentation from Jerusalem artichoke.

A31

**A Strategy for enhancement of bioethanol production using the hydrolysate of alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber**

Seonghun Kim, Jang Min Park, Anna Yu, Jeong Woo Seo, and Chul Ho Kim  
Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology  
181 Ipsin-gil, Jeongeup 580-185, Korea



# 2012 International Meeting of the Microbiological Society of Korea

- May 3 (Thu.) ~ 4 (Fri.), 2012
- Seoul Kyoyuk MunHwa HoeKwan, Seoul, Korea

**Proceedings**

*Hosted by*

 The Microbiological Society of Korea (MSK)

*Sponsored by*

The Korean Federation of Science and Technology Societies  
Korea Foundation for the Advancement of Science and Creativity  
Microbial Genomics & Applications Center  
Center for Biotechnology Research in UBITA  
DAESANG Corporation  
Korea Yakult Company Limited

[www.msk.or.kr](http://www.msk.or.kr)



## C001

### Effect of Contact Lens-Clearing Solutions to Free-Living Amoeba Causing Human Keratitis

Suk-Yul Jung

Department of Biomedical Laboratory Science, Namsoul University

*Acanthamoeba* of free-living amoebae are opportunistic protozoan parasites, which can cause chronic encephalitis and acute blinding keratitis. Recently, a lot of human cases have been reported with hazardous or dirty-use contact lens container. In general, lens clearing solutions have used to clean contact lens containers and contact lenses by storing lens into the solutions and rubbing lens using hands. In this study, commercially used seven different kinds of contact lens clearing solution were analyzed how effective to phenotypes and genotypes of *A. castellanii* which were well known to induce keratitis. The lens clearing solutions e.g., RGP care sol'n, Bio true, Complete multi-purpose sol'n, Clivell, Total care 1, Opti-free replenish, Boston simplus Multi-action sol'n, were treated into the wells of *A. castellanii* trophozoites with concentration of 10%, 50% and 90% respectively. Bio true showed less effect of cytotoxicity to *Acanthamoeba* than other six solutions by applying lactate dehydrogenase assay. Morphologically the amoeba was mostly destroyed and showed very irregular types, even if the amoeba were still alive.

## C002

### Purification and Characterization of Antibacterial Peptide from *Bacillus* sp. Isolated from Korean Soil

Yun Hee Choi and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

A bacterial strain producing antibacterial peptide was isolated from Korean soil and identified as *Bacillus* sp. CSP32. The peptide was purified to homogeneity through ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-50 column chromatography. Molecular weight of the purified peptide was estimated to be about 5,000–6,000 Da by tricine-SDS-PAGE. Antibacterial activity was evaluated by disc diffusion method against *Micrococcus luteus* as a test organism. The production of antibacterial peptide from the strain was found to be most favorable when cultured for 3 days at 37°C and 180rpm in shaking incubator, using glucose and peptone, beef extract as respective carbon and nitrogen sources. Cell-free supernatant from overnight grown culture was active against *Micrococcus luteus*, Methicillin resistant *staphylococcus aureus* (MRSA 693E) and vancomycin-resistant enterococci (VRE).

## C003

### Copper Sulfate Potentiate Inhibition Effect of Nitric Oxide Production by Manumycin

Ok Kim<sup>1</sup>, Seung Sik Cho<sup>2</sup>, and Jin Cheol Yoo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chosun University, <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Mokpo National University

Manumycin, one of the manumycin group metabolites isolated from new *Streptomyces* strain named CS392. We reported the antimicrobial and anti-inflammatory activity of manumycin *in vitro* and *in vivo*. Manumycin showed strong anti-VRSA (and VRE) activity and dose dependently inhibited inflammatory protein expression in RAW 264.7 macrophages activated with lipopolysaccharide (LPS). *In vivo* studies, manumycin showed anti-inflammatory activities in 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) induced mouse ear edema model and dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis model. Inhibition of IKK and other inflammatory protein expression was observed in the presence of manumycin in the range of 0.1–5µg/ml. And copper also inhibit NF-κB signaling by blocking IKK activation in high concentration (~1mM). Manumycin and copper in combination in a ratio of 1:10 inhibited the expression of inflammatory mediators in the presence of lipopolysaccharide(LPS) in RAW264.7. Manumycin in combination with copper revealed a significant synergistic interaction for suppressing the expression of inflammatory mediators and may provide a useful approach to the treatment of inflammatory diseases.

## C004

### Enzymatic Transesterification of Soybean Oil and Waste Cooking Oil Using a Microbial Lipase (LP273) from *Streptomyces* sp. CS273

Poonam Mander and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

The main objective of this work was to isolate a biocatalyst able to catalyze a transesterification reaction for biodiesel production. Thus an extracellular lipase from *Streptomyces* sp. CS273 was produced and purified. SDS-PAGE was performed to determine the apparent molecular mass. Similarly for activity staining, zymography was performed which allowed the detection of active proteins. Various biochemical properties of the lipase were determined. The optimum temperature for the lipase activity was found to be 40°C and had a good stability when it was below 50°C. The optimum pH for the activity of lipase was 8 to 8.5 and maintained over 80 % activity in the pH range 7.0–9.5. The lipase showed hydrolysis efficiency towards various *p* nitrophenyl esters, but showed the highest hydrolytic activity towards *p*-NP myristate C<sub>14</sub>. The enzyme displayed significant stability in the presence of organic solvents. The enzyme efficiently catalyzed the synthesis of biodiesel production using commercial soybean oil and waste cooking oil.

## C005

### Optimization of medium composition and fermentation conditions using response surface methodology for production of manumycin by *Streptomyces* sp. CS 392

Poonam Mander, Yoon Seok Choi, Jin Hee Park, and Jin Cheol Yoo

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

Optimization of fermentation medium and fermentation condition for manumycin production by *Streptomyces* sp. CS392 was carried out. The antimicrobial activity from the strain was maximized by using a dual stage, multivariate statistical optimization framework based on the response surface methodology (RSM) considering a lab-scale fermentation process. In the first stage, multiple nutrient constituents of the fermentation broth were jointly optimized. In the subsequent stage, fermentation culture conditions were optimized. Based on the empirical model derived from the dual-stage statistical optimization framework, 39.8 % of cumulative enhancement in the antibiotic activity was obtained at the concurrent optimal settings (optimal nutrient composition : 29.82 g/l glucose, 7.6 g/l peptone, 4.678 g/l MgCl<sub>2</sub> and 0.5 g/l casamino acid; and optimal fermentation condition : incubation period 47.5 h ; incubation temperature 29.15°C and pH 8.36.

## C006

### Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Kimchi

Miran Kang, Ji Hye Kim, Sung-Hee Park, Tae-Woon Kim, Hyun Ju Kim, Ja Young Jang, and Eung-Soo Han

World Institute of Kimchi

The consumption of kimchi, a Korean traditional food, has been increased widely in demand for improved well-being life. But, studies about probiotics from kimchi have not been clarified. We focus on the live microorganisms, even though it remains unclear whether the only live bacteria are necessary for a clinical effect comparing with dead bacteria. Probiotics are live microorganisms when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. They have many beneficial effects on the gastrointestinal tract such as preventing colon cancer, improving immune function, preventing infections and preventing harmful bacterial growth. The objective of the study is to identify and to study the probiotic properties among strains isolated. They were cultured in a MRS broth at 30°C. Then isolates were tested to resist to gastric acid and bile acid. Among the isolates, some strains that showed superior ability to resist gastric acidity and bile cytotoxicity were selected. The API ZYM kit was used to study enzyme activity. The adhesive ability to the Caco-2 epithelium cells was also studied.

[Supported by grants from WiKim]

## C007

### Cultural Characteristics of the Entomopathogenic Nematodes *Steinernema carpocapsae*-PC and Symbiotic Bacteria

Dong Hee Kang<sup>1</sup>, Kyung Bon Koo<sup>2</sup>, Hyung Chul Lee<sup>2</sup>, Min Su Kang<sup>1</sup>, Sung Ryong Kim<sup>1</sup>, Seung Jin Hong<sup>1</sup>, and Hyun Soo Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, <sup>2</sup>Ecwin Company

In order to use the entomopathogenic nematode and the symbiotic bacteria, as a biological control agent for agriculture, the cultural characteristic of enhancing the growth was investigated. Entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*-PC was selected from the 6 strains that are isolated from the soils of Korea, by the insect-baiting technique, which uses the larvae of *Galleria mellonella* and *Spodoptera litura*. The growth rate by the nitrogen source was high, after adding the yeast extract (71.4%) than the peptone (64.3%). The addition of soybean, canola and corn oil, respectively, increased the growth of *S. carpocapsae*-PC, and especially corn oil (100 g/L) increased with 82.3%. The optimum pH, temperature and agitation speed for the excellent growth were 8, 25°C and 100 rpm, respectively. *Photarhabdus temperata*-GD, that is the symbiotic bacterium, was selected from 5 strains by measuring of the growth rate. *P. temperata*-GD showed to grow excellently, in a new medium (composition not shown), that was developed by Ecwin Company. Optimal agitation speed and aeration rate for the best growth in a 7 L jar fermenter were found to be 200 rpm and 0.5 vvm.

## C008

### Identification and Characterization of *wblA*-dependent *tmcT* Regulation during Tautomycin Biosynthesis in *Streptomyces* sp. CK4412

Ji-Hye Nah, Si-Sun Choi, Dongju Kim, and Eung-Soo Kim

Department of Biological Engineering, Inha University

Tautomycin (TMC) is an unusual linear polyketide compound esterified with a cyclic anhydride. It exhibits novel activated T cell-specific immunosuppressant as well as anti-cancer activities. Here, we confirm that *TmcT* acts as another TMC pathway-specific positive regulator, except *TmcN* which previously reported, within the TMC biosynthetic cluster. We also identified a 0.39 kb *wblA* ortholog (named *wblA<sub>tmc</sub>*) from *Streptomyces* sp. CK4412 via genomic DNA library screening that showed 96% amino acid identity compared to a previously-known *S. coelicolor wblA*. Targeted gene disruption of *wblA<sub>tmc</sub>* in WT exhibited approximately 3-fold higher TMC productivity than that in the wild-type strain. Moreover, transcription analyses of the TMC biosynthetic and regulatory genes revealed that the expression of *tmcT* was strongly down-regulated by *wblA<sub>tmc</sub>*. These results imply that the TMC biosynthetic regulation network is controlled by two pathway-specific positive regulators, *WblA<sub>tmc</sub>*-dependent *TmcT* as well as *WblA<sub>tmc</sub>*-independent *TmcN* in *Streptomyces* sp. CK4412.

[This work was supported by grant No. MEST 2011 0000073 from the KOSEF.]

부록4.분리동정한균주의기탁증


BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT  
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT**

issued pursuant to Rule 7.1

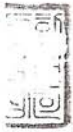
TO : YOO, Jin Cheol  
College of Pharmacy, Chosun University  
375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759  
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:  <b><i>Nocardia</i> sp. CS682</b>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  <b>KCTC 11297BP</b>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION :	
The microorganism identified under I above was accompanied by: : <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on <b>March 6, 2008</b> .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: <b>Korean Collection for Type Cultures</b>  Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):    OH, Hee-Mock, Director Date: <b>March 14, 2008</b>

## 부록 5. 기술이전

1차년도 과제수행 결과로 대한뉴팜(주)과 기술이전계약을 체결하여 본 본연구 과제물의 산업화를 앞당기는 계기를 마련하였음.

# 기술이전계약서



■ 계약명 : 새로운 노카르디아 속 균주 및 이의 페티실린 내성 포도상 구균 균주에 유효한 화합물을 포함하는 가축 사료첨가제

2008년 03월 18일

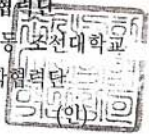
계약당사자

'갑' 조선대학교 산학협력단

주소 : 광주 동구 서석동 조선대학교

기관 : 조선대학교 산학협력단

대표 : 장 완 식



'을' 대한뉴팜(주)

주소 : 서울 관악구 남현동 1062-4

상호 : (주) 대한뉴팜

대표 : 대표이사 박 명 래



기술이전책임자 : 김종성



변삼환



양지수



담당자 : 김종성

연락처 : 062-230-6137

담당자 :

연락처 :



## 부록 6. 수상 실적

### 2008 서울국제발명전시회 금상

특허: 10-2008-18949

새로운 노카르디아 속 균주와 이의 메티실린 및 반코마이신 내성균주에 대한 항생 물질

조선대 유진철 교수 서울국제발명전시회 금상 수상  
호남신문 [2008-12-18 00:00]



최근 서울 코엑스에서 열린 '2008 서울국제발명전시회'에서 조선대학교 유진철 교수(약학대학 약학과)가 금상, 장해춘(자연과학대학 식품영양학과) 이진이 교수(전자정보공과대학 제어계측로봇공학과)가 은상을 각각 수상했다.

제9119호

# 표창장

조선대학교  
교수 유진철

귀하는 평소 맡은 바 직무에 정려하여 왔으며  
특히, 농림수산 식품 과학기술 분야의 창의적  
기술개발로 농어업인의 소득증대 및 농식품  
산업발전에 기여한 공이 크므로 이에 표창함

2009년 10월 27일

교육과학기술부장관 안병만



## DCS 682 판매 현황 및 마케팅 계획

1. 제품명 : DCS 682
2. 과제명 : 2007년 농림기술개발기획과제(ARPC)  
“가축사료용 항생제 대체물질 산업화 기술개발”  
(총괄 연구 책임자 : 조선대학교 유 진철 교수)
3. 완제품 제조 및 판매사 : 대한뉴팜㈜
4. 판매개시 : 2009년 2월
5. 판매누계액(2009년 6월 누계) : 98,200,000원
6. 3개년 판매 예상액
  - 1) 2009년 : 1,000,000,000원
  - 2) 2010년 : 2,000,000,000원
  - 3) 2011년 : 3,000,000,000원
7. 다국적기업과의 마케팅 제휴 모색
  - 현재 3개사와 해외시장 마케팅 관련 협의 중
  - 2011년 본격 해외시장 마케팅 목표.
  - 마케팅 제휴 성공시 3년차에 500억 매출 달성 예상

대한뉴팜(주) 대표이사

배 건 우



부록 8. 언론홍보자료

**별호를 이용 사유장가게 개발 완료**

2009년 11월 22일 09시 00분 입력

국주총 조준희 교수 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상

조준희 교수는 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상자로 선정되어 고령지역에 귀농귀공을 도울 수 있게 되었다. 조 교수는 2011년 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상자로 선정되어 고령지역에 귀농귀공을 도울 수 있게 되었다. 조 교수는 2011년 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상자로 선정되어 고령지역에 귀농귀공을 도울 수 있게 되었다.

**조선대 유진철 교수 농림수산 과학기술대상 선정**

2009년 11월 22일 09시 00분 입력

유진철 교수 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상

유진철 교수는 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상자로 선정되어 고령지역에 귀농귀공을 도울 수 있게 되었다. 유 교수는 2011년 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상자로 선정되어 고령지역에 귀농귀공을 도울 수 있게 되었다.

**기회 좋은 분 기사**

- 기대수확량 증가
- 농민들의 농산물 가격 상승
- 농민들의 농산물 가격 상승
- 농민들의 농산물 가격 상승
- 농민들의 농산물 가격 상승
- 농민들의 농산물 가격 상승
- 농민들의 농산물 가격 상승
- 농민들의 농산물 가격 상승

**광주드림**

**조선대 유진철 교수 농림수산 과학기술대상 수상**

조선대 유진철 교수는 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상자로 선정되어 고령지역에 귀농귀공을 도울 수 있게 되었다. 유 교수는 2011년 "농림수산식품 과학기술 대상" 수상자로 선정되어 고령지역에 귀농귀공을 도울 수 있게 되었다.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 가축사료용 항생제 대체물질 산업화 기술개발(국내 토양세균이 생산하는 발효물을 이용한 사료 첨가제 개발)사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 가축사료용 항생제 대체물질 산업화 기술개발(국내 토양세균이 생산하는 발효물을 이용한 사료 첨가제 개발) 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.