

**수산용 항생제 대체를 위한  
녹차 활성성분 플라보노이드의 미생물 생산**

(Microbial Production of Active Flavonoid Ingredients of  
Green Tea as Alternative Antibiotics in Aquaculture)

**수산용 항생제 대체 플라보노이드의 대량생산 공정개발**

(Development of Mass Production of Flavonoids  
as Alternative Antibiotics in Aquaculture)

이화여자대학교 산학협력단

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수산물 항생제 대체를 위한 녹차 활성성분 플라보노이드의 미생물 생산”의  
보고서로 제출합니다.

2010 년 9 월 20 일

주관연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단  
주관연구책임자 : 윤 여 준  
연 구 원 : 김 은 지  
연 구 원 : 모 상 준  
연 구 원 : 박 제 원  
연 구 원 : 박 성 렬  
연 구 원 : 백 지 혜  
연 구 원 : 윤 진 아  
연 구 원 : 원 선 희  
연 구 원 : 이 미 경  
연 구 원 : 이 종 현  
연 구 원 : Devi Basnet  
연 구 원 : Pramod Shinde  
연 구 원 : 전 수 연  
연 구 원 : 백 형 록  
연 구 원 : 정 기 모  
연 구 원 : 김 보 민  
협동연구기관명 : (주)인트론바이오테크놀로지  
협동연구책임자 : 강 상 현

# 요 약 문

## I. 제 목

- 수산용 항생제 대체를 위한 녹차 활성성분 플라보노이드의 미생물 생산

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 수산용 항생제의 오·남용으로 인한 심각한 환경 오염문제 및 식품 안전문제의 근본적 해결을 위해서는 항생제 대체용 천연항생물질의 개발과 이의 실용화를 위한 대량생산에 대한 연구가 시급한 실정임.
- 녹차의 항균활성을 바탕으로 새로운 개념의 천연항생제를 개발하기 위해서는 각 flavonoid의 단일 성분예 대한 연구가 필수적임. 그러나 유기용매 추출법이나 화학합성 등의 기존방법은 복잡한 정제공정이 필요하거나, 기타 공정 비용이 높은 단점이 있음.
- 따라서 순수한 각 flavonoid 화합물을 보다 경제적으로 공급할 수 있는 새로운 공정의 연구개발이 필요함. 이에 본 과제는 수산용 항생제 대체를 위한 녹차 활성성분 플라보노이드의 미생물 이중숙주 생산시스템의 개발과 대량생산을 통한 천연항생물질로의 개발을 목표로 함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 본 과제의 최종 목표 : 수산용 항생제 대체를 위한 천연항생물질의 개발을 위하여, 녹차 (*Camellia sinensis* L.)에 의해 생산되는 항균 flavonoid 화합물중 대표적인 naringenin, pinocembrin, apigenin, galangin, kaempferol 및 chrysin을 target으로 하여 ① 식물 특이적 flavonoid 계열 화합물의 방선균 이중숙주 생산 시스템의 개발과 ② 발현 시스템의 최적화 및 이중숙주의 대사공학을 통한 생산성 향상 및 산업화 추진

### □ 연구 개발 내용 및 범위

#### ■ 식물유래 flavanone 화합물의 이중숙주 생산시스템 구축

- 방선균 이중숙주에서의 *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 4-coumarate:CoA ligase (ScCCL)와 licorice plant인 *Glycyrrhiza echinata*의 chalcone synthase (CHS), *Pueraria lobata* plant의 chalcone isomerase (CHI) 유전자의 합성 및 발현과 p-coumaric acid 및 cinnamic acid의 feeding에 의한 flavanone 화합물의 조합생합성 시스템 확립

#### ■ 발현시스템 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상

- Integration vector/replication vector 등 발현벡터의 조합, copy number 및 promoter 등의 최적화에 의한 조합생합성의 생산성 향상
- CHS의 기질인 malonyl-CoA의 세포 내 농도 증가를 위한 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 pantothenate kinase (PanK)의 과발현에 의한 naringenin chalcone의 생합성 효

을 향상에 의한 생산성 향상

- 방선균 이종숙주의 codon preference를 고려한 식물유래 유전자의 염기서열 재설계 및 인공유전자 (synthetic gene)의 합성과 발현 최적화에 의한 조합생합성의 생산성 향상

■ 식물유래 flavonol 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

- *Citrus plant* 유래의 flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase (F3H), flavonoid 3' hydroxylase (F3'H) 및 flavonol synthase (FLS) 유전자의 합성 및 발현에 의한 flavonol의 조합생합성 시스템 완성

■ 식물유래 flavone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

- *Petroselinum crispum* 유래의 flavone synthase (FNS I) 유전자의 합성 및 추가 발현에 의한 flavone의 조합생합성 시스템 완성

■ Flavonoid 화합물들의 대량 생산 및 분리정제 공정의 개발

- 소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화
- 중·대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up
- 분리공정 최적화 및 scale-up

■ 확보된 flavonoid 화합물의 *in vitro* 항균활성 검증

- 수산 양식과 관련이 높은 model 균주로 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Lactococcus garvieae*를 선발
- 본 연구를 통해 확보한 flavonoid 화합물의 항균활성을 MIC (minimum inhibitory concentration; 최소저해농도) 측정으로 조사

■ 양식어류에 대한 현장적용 시험

- 넙치를 대상으로 현장적용시험을 통하여 수산용 사료첨가제로의 유효성을 확인

IV. 연구개발결과

구분	연구개발목표	연구개발결과
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 식물유래 Flavanone 화합물의 미생물 이종숙주 생산 시스템 확립</li> <li>▪ 발현 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상</li> <li>▪ 소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 방선균 이종숙주에서 flavanone 화합물인 naringenin 및 pinocembrin의 생산 성공</li> <li>▪ 발현 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상</li> <li>▪ 1L 소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화 (4.0 mg/L naringenin 및 6.0 mg/L pinocembrin 생산)</li> </ul>



구분	연구개발목표	연구개발결과
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavonol 화합물의 이중숙주 생산시스템 구축</li> <li>중·대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up</li> <li>확보된 flavanone 화합물의 <i>in vitro</i> 항균활성 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>방선균 이중숙주에서 flavonol 계열 화합물인 kaempferol 및 galangin의 생산 성공</li> <li>50L 발효조를 기준으로 flavanone 및 flavonol 화합물의 발효조건 최적화 및 저가 배지 성분 선별 (4.4 mg/L naringenin, 6.6 mg/L pinocembrin, 0.6 mg/L kaempferol 및 2.0 mg/L galangin 생산)</li> <li>수산 양식과 관련이 높은 model 균주에 대한 flavanone 화합물의 항균 활성 측정 (산업적 활용에 충분한 정도의 활성을 보유하고 있음을 검증)</li> </ul>
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavone 화합물의 이중숙주 생산시스템 구축</li> <li>Flavonoid 화합물의 분리공정 최적화 및 scale-up</li> <li>확보된 flavonoid 화합물의 항균 활성 검증 및 현장적용 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>방선균 이중숙주인에서 flavone 계열 화합물인 chrysin 및 apigenin의 생산 성공 (4.5 mg/L chrysin 및 5.1 mg/L apigenin 생산)</li> <li><i>in vitro</i> 항균력 시험 및 공격접종을 통한 <i>in vitro</i> efficiency 조사</li> <li>분리공정 최적화 및 scale-up</li> <li>양식어류에 대한 현장적용 시험</li> </ul>

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 항균 활성이 이미 검증된 대표적인 flavanone 화합물 (naringenin, pinocembrin) 뿐만 아니라 flavonol에 속하는 kaempferol 및 galangin, flavone에 속하는 chrysin 및 apigenin을 미생물 이중숙주에서 생산 성공함으로써, 미생물 이중숙주를 이용한 flavonoid 화합물의 생산 스펙트럼이 확대되었음. 이로써 보다 다양한 flavonoid 화합물의 미생물 이중숙주 생산이 가능해졌음.
- 또한 중대형 발효조를 이용한 flavonoid 화합물의 생산 발효조건 최적화를 통해 부작용과 내성이 적은 새로운 개념의 수산 양식용 천연항생제 개발이 가능해질 수 있음.
- 수산양식 어종에서 주로 문제가 되는 bacteria strain에 대한 *in vitro* 항균활성 검증을 통해, 실질적인 수산 양식용 항생제로 상용화할 수 있는 기반을 마련하였음.
- 이를 바탕으로 국내 수산업의 항생제 남용으로 인한 비용 상승, 환경오염, 식품 안전등의 문제를 근본적으로 해결할 수 있는 신개념의 수산용 천연 항생 물질의 상업화가 추진될 수 있음.
- 또한 합성 농약 또는 항생제등을 사용하지 않은 고품질 유기농 먹거리에 대한 사회적 수요를 충족시킬 수 있음.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Recently, a number of reports and on-going investigations have raised concerns about the increasing problems associated with infectious disease in fish and resistance to the antibiotics used in aquaculture. Flavonoids, including flavanone, flavones and flavonols, are plant secondary metabolites that fulfill protection from attack by microbes and insects in plants as well as production of pigmentation in flowers. Thus, Flavonoids might be a good alternative to antibiotics in treating and preventing the diseases encountered in aquaculture. However, the availability of these medicinally important plant secondary metabolites is limited by seasonal and regional variations. In addition, isolation of single compounds from plants is often difficult because of the complexity of secondary metabolites in the plant extracts. Furthermore, extreme reaction conditions and toxic chemicals are required for the chemical synthesis of flavonoids. As a practical alternative, microbial production of flavonoids may facilitate their large-scale production.

In this study, we developed *Streptomyces venezuelae*-based heterologous expression system for production of flavonoids. A plasmid expressing the 4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase from *Streptomyces coelicolor* (ScCCL) and the chalcone synthase from *Arabidopsis thaliana* (atCHS) under the control of a single *ermE\** promoter was constructed and introduced into *S. venezuelae* DHS2001 bearing a deletion of native pikromycin polyketide synthase gene. The resulting strain produced racemic naringenin and pinocembrin from 4-coumaric acid and cinnamic acid, respectively. Placement of an additional *ermE\** promoter upstream of the codon-optimized *atCHS* significantly increased the yield of both flavanones. Moreover, we expanded the applicability of this system to the production of more diverse plant polyketides including flavones and flavonols. A recombinant *S. venezuelae* mutant expressing a codon-optimized flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase gene from *Citrus siensis* and a flavonol synthase gene from *Citrus unshiu*s also successfully produced flavonols (kaempferol and galangin). A plasmid with the synthetic codon-optimized flavone synthase I gene from *Petroselinum crispum* was introduced to *S. venezuelae* DHS2001, leading to the generation of flavones from exogenously fed flavanones.

The flavonoids produced by microbial heterologous host used in this study showed promising *in vitro* antibacterial activities against the model pathogenic strains including *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Lactococcus garvieae*. In addition, the effectiveness of flavonoids as feed additive was evaluated in the field trials.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

- Chapter 1. Introduction
  - 1.1. Purpose of this study
  - 1.2. Necessity of this study
  - 1.3. Scope of this study
- Chapter 2. Overview of the current status of technical development
  - 2.1. Current state of development of related technology
  - 2.2. Current state of this study
- Chapter 3. Experimental procedures and Results
  - 3.1. The first-year research results
  - 3.2. The second-year research results
  - 3.3. The third-year research results
- Chapter 4. Goal achievement and Contribution to the relevant field
  - 4.1. Aim of this study
  - 4.2. Major assessment points
  - 4.3. Goal achievement
  - 4.4. Contribution to the relevant field
- Chapter 5. Research outcome and Application plans
  - 5.1. Published papers
  - 5.2. Intellectual property including patents
  - 5.3. Plans for commercialization
  - 5.4. Further study
- Chapter 6. International science and technology information on this research
- Chapter 7. References

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

### 제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 과학기술적 중요성
2. 연구개발의 사회경제적 중요성
3. 연구개발의 문화적 중요성

### 제 3 절 연구개발의 범위

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

### 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 3 절 3차년도 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구 목표

1. 연구 최종 목표
2. 연도별 세부 목표

### 제 3 절 연구 개발 목표의 달성도

### 제 4 절 관련분야 기술발전에서의 기여도

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 논문 게재 성과

### 제 2 절 특허 및 지적재산권 확보 성과

### 제 3 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

### 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

- ㉠ 녹차 (Green tea, 학명: *Camellia sinensis* L.) 및 그 추출물은 전통적으로 뛰어난 항균 작용을 가진 천연항생물질로 알려져 있으며, 강력한 항균활성으로 인하여 최근 천연항생물질 개발 분야의 연구에 있어서 가장 중요한 연구의 대상이 되고 있음. 특히 축산 분야에서 항생제 대체용으로 효과가 입증되고 있으며 기능성 천연항생제로 떠오르고 있음.
- ㉡ 녹차의 항균활성을 적극적으로 개발하여 기능성 식품 및 단순 사료첨가제로서의 단계를 넘어서 부작용과 내성이 적은 새로운 개념의 천연항생제를 개발하기 위해서는 각 flavonoid의 단일 성분 에 대한 연구가 필수적이며, 녹차 등에 포함되어 있는 flavonoid 화합물은 주로 유기용매로 추출하여 생산되고 있음. 이러한 경우 flavonoid 화합물들의 혼합물인 추출물로부터 순수한 형태한 각 flavonoid의 분리를 위해서는 복잡한 정제공정이 추가적으로 요구되는 단점이 있음.
- ㉢ 또한 다양한 화학적 방법으로 일부 flavonoid의 합성이 가능하나, 위에서 설명한 식물에서의 추출공정과 마찬가지로 순수한 화합물의 대량 공급을 위해서는 공정의 비용이 매우 높은 단점이 있음. 따라서 순수한 각 flavonoid 화합물을 보다 경제적으로 공급할 수 있는 새로운 공정의 연구개발이 필요함.
- ㉣ 따라서 본 과제는 수산용 항생제 대체를 위한 녹차 활성성분 플라보노이드의 미생물 이 종속주 생산시스템의 개발과 대량생산을 통한 천연항생물질의 개발을 목표로 하였음.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 과학기술적 중요성

#### 가. 수산용 항생제 남용의 문제점

- ㉠ 국립수산과학원의 수의과학검역원과 동물약품협회의 자료를 분석한 결과에 따르면 지난해 국내에서 판매·사용된 동물용 항생제의 양은 모두 1천473톤에 이룸. 이 가운데 축산용 항생제는 1천215톤 (전체의 82.5%)을 차지했으며, 수산용 항생제는 258톤 (17.5%)을 차지한 것으로 나타났음. 수산용 항생제는 지난 2003년 165톤에서 2004년 217톤, 지난해 258톤으로 해마다 사용량이 큰 폭으로 늘어난 것으로 밝혀졌음. 그러나 258톤 중에서 수의사의 처방에 따라 사용된 수산용 항생제의 양은 매년 32톤(12%) 내외에 불과함. 따라서 나머지 수산용 항생제는 양식어민들이 자가치료나 질병예방 등의 목적으로 사용하고 있는 실정임.
- ㉡ 2003년에 국립수산연구원이 발표한 「수산용 항생제 관리 시스템 구축」 연구 결과에 따르면, 국내에서 수산용으로 가장 많이 사용되고 있는 옥시테트라사이클린 (판매량 기준 74%)은 장기간 광범위하게 사용해온 결과로 내성률이 80% 이상에 달하는 것으로 보고 되고 있음. 남해안 양식장 6곳을 조사한 결과 50%의 어류에서 항균제가 검출됐고, 살모넬라비브리오균 등의 세균도 페니실린이나 테트라사이클린 등의 항생제에 80~90%에 이르는 내성률을 나타냈음. 축산물도 살모넬라포도상구균 등이 80%의 내성률을 보였음 (Table 1).
- ㉢ 결과적으로 이제는 옥시테트라사이클린으로 치료될 수 있는 질병이 20%밖에 되지 않아 질병 치료에 더 비싼 항생제를 써야하는 현실에 직면했음. 이러한 상황은 수산 생산비용이 증가하는 직접적인 피해 발생을 의미함. 뿐만 아니라 수산용 항생제 및 내성균이 환경을 오염시키는

것은 물론, 수산물에 대한 식품 안전도 크게 해쳐 인간의 건강까지 피해를 줄 것으로 예상됨.

㉔ 또한 WHO도 항생제 내성을 갖는 슈퍼박테리아의 확산을 막기 위해 가축사료에 동물성장촉진제 등 항생제 사용을 자제해 줄 것을 권고하고 있음. 축수산물 내성률이 경제협력개발기구(OECD) 국가 가운데 최고 수준인 우리나라는 아직 적극적인 항생제 제한 정책을 내놓지는 않고 있음. 다만 지난해부터 국가 항생제 내성 안전관리사업을 시작하면서 농수축산물의 항생제 내성과 관련한 장기적인 연구에 들어갔고, 식약청은 농어민에게 항생제 사용을 줄이도록 홍보하고 있음. 그러나 항생제 중에서 잔류허용기준치가 마련된 항목은 옥시테트라사이클린과 옥소린산 두 가지 뿐임. 지난해 수산물 안전성 조사 수는 2817건으로 각각 2만건과 5만건이 넘는 축산물 모니터링 검사와 농산물 잔류농약 검사에 비해서 턱없이 적음.

㉕ 최근 양식 어류의 생산량이 급격히 증가하고 있으므로 (Fig. 1), 수산용 항생제의 오·남용으로 인한 심각한 환경 오염문제 및 식품 안전문제의 근본적 해결을 위해서는 항생제 대체용 천연항생물질의 개발과 이의 실용화를 위한 대량생산에 대한 연구가 시급한 실정임.

#### 나. 녹차 추출물의 천연항생제로서의 효능 및 양식업 적용의 예

㉖ 녹차 (Green tea, 학명: *Camellia sinensis* L.) 및 그 추출물은 전통적으로 뛰어난 항균 작용을 가진 천연항생물질로 알려져 있으며, 특히 축산 분야에서 항생제 대체용으로 효과가 입증되고 있으며 기능성천연항생제로 떠오르고 있음.

㉗ 녹차를 생산하고 있는 해록은 지난 2005년부터 녹차의 살균력을 활용한 녹차농축액을 개발해 해남해양수산사무소와 함께 문내면 양정리 신해수산에서 시험양식을 하였음. 해양수산사무소는 "5개월 동안 실험결과 넙치의 육질이 개선됐고, 항생제 사용량이 크게 줄었으며, 면역력이 증가되는 효과가 입증됐다"고 말했음. 그 후 해록은 완도지역 어류양식장을 대상으로 계속 시험재배를 실시해 고수온 기인 여름철에도 효과가 있음을 증명했고 지난해 해양수산부 혁신우수사례로 선정되었음. 그 결과 해록은 해남군으로부터 군내 15개 어류양식장에 녹차농축액을 모두 공급하는 업체로 선정되었음. 녹차추출액은 음용뿐만 아니라 소독제로도 효과가 커 축사의 환경을 개선하는데도 한 몫을 하고 있어 차세대 항균제로 부상하고 있음 [해남신문, 2007-03-16].

㉘ 전남 완도 현창수산은 양식장 경쟁력 향상을 위해 녹차를 광어 양식에 활용, 차별화된 고품질 고기를 생산해내는데 성공했음. 2004년부터 녹차에서 추출한 녹차액을 생사료와 혼합해 광어에 먹인 결과, 물고기 병에도 강하고 적조에도 잘 견디는 녹차 광어를 생산, 본격 시판하고 있다고 밝혔음. 특히 이 녹차 광어는 녹차에 함유된 '플라보놀(flavonol)'이라는 성분에 의해 비린내가 없으며 단단하고 탄력 있는 육질이 만들어져 소비자들의 반응이 매우 좋은 것으로 보

<Table 1> 주요 항생제에 대한 국내 축·수산물의 내성률

분류	주요 세균종	주요 항생제	내성률(%)
축산물	대장균	에리트로마이신	80
	포도상구균	테트라사이클린	80
	장구균	세포탁심	80
	살모넬라균	에리트로마이신	80
수산물	살모넬라균	클린다마이신	80~90
	포도상구균	페니실린, 테트라사이클린	80~90
	비브리오균	암피실린	80~90
	대장균	클린다마이신	80~90
	장구균	옥사실린	80~90
사람	포도상구균	페니실린	92

자료: 식약청 2003년 국가항생제 내성 실태조사

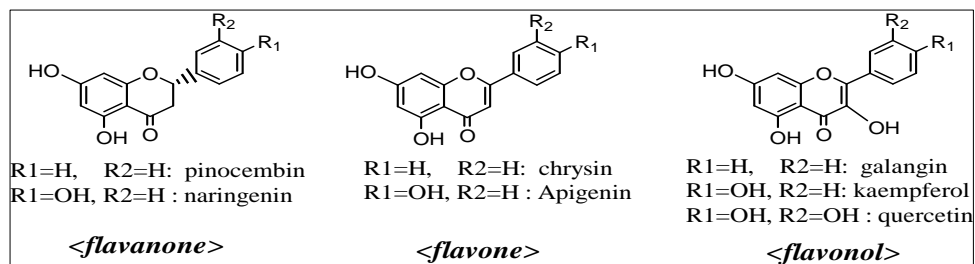


<Figure 1> 양식어류 생산량 추이

도되었음 [한국수산신문, 2007-03-19].

#### 다. Flavonoid 계열 화합물의 항생효과

- ㉓ 녹차의 주요 생리활성성분인 flavonoid 화합물은 항산화 (antioxidant), 암예방 (cancer chemopreventive), 항천식 (antiasthmatic), 항염증 (anti-inflammatory) 등의 활성을 갖는 건강 증진용 기능성 식품 (health-promoting nutraceutical)으로 인식되면서, 식물 내 flavonoid의 생합성에 관련된 대사경로를 밝히고자 하는 연구와 이에 근거한 대사공학에 의한 식용 식물의 flavonoid의 생산성 향상 및 조성의 변화에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있음 [Trends in Plant Science, 1999, 4(10), 394-400]. 특히, flavonoid 계열 화합물은 강력한 항균활성 (antimicrobial activity)으로 인하여 최근 천연항생물질 개발 분야의 연구에 있어서 가장 중요한 연구의 대상이 되고 있음 [International Journal Antimicrobial Agents, 225(26), 343-356].
- ㉔ 최근에는 여러 flavonoid 화합물의 mixture인 녹차 추출물의 항균활성에 대한 연구뿐 아니라, 분리 정제된 단일 flavonoid 화합물들의 항균활성을 정량적으로 연구하여 천연항생제를 개발하려는 연구가 진행 중임.
- ㉕ Flavonoid 화합물은 chalcone, flavanone, flavone, flavonol, flavandiol, anthocyanin, condensed tannin (proanthocyanidins), aurone, isoflavonoid 등의 소그룹으로 나눌 수 있으며 [Plant Physiology, 2001, 126, 485-493], 단일 성분으로서 항균활성이 정량적으로 검증된 대표적인 화합물로서는 flavanone 그룹에 속하는 naringenin과 pinocembrin, flavonol 그룹에 속하는 kaempferol, galangin, quercetin, flavone 그룹에 속하는 apigenin 등이 있음 [International Journal Antimicrobial Agents, 2005, 225(26), 343-356] (Fig. 2).



**<Figure 2> Flavonoid 화합물의 분류 및 대표적 항균 flavonoid 화합물의 구조**

#### 라. 단일 활성성분의 천연항생제로의 개발 필요성

- ㉖ 녹차의 항균활성을 적극적으로 개발하여 기능성 식품 또는 단순 사료첨가제로서의 단계를 넘어서 부작용과 내성이 적은 새로운 개념의 천연항생제를 개발하기 위해서는 각 flavonoid의 단일 성분에 대한 연구가 필수적이며, 녹차 등에 포함되어 있는 flavonoid 화합물은 주로 유기용매로 추출하여 생산되고 있음. 이러한 경우 flavonoid 화합물들의 혼합물인 추출물로부터 순수한 형태의 각 flavonoid 분리를 위해서는 복잡한 정제공정이 추가적으로 요구되는 단점이 있음.

- ㉔ 또한 다양한 화학적 방법으로 geneistein 등 일부 flavonoid의 합성이 가능하나 [Phytochemistry, 2002, 60(3), 205-211], 위에서 설명한 식물에서의 추출공정과 마찬가지로 순수한 화합물의 대량 공급을 위해서는 공정의 비용이 매우 높은 단점이 있음. 따라서 순수한 각 flavonoid 화합물을 보다 경제적으로 공급할 수 있는 새로운 공정의 연구 개발이 필요함.

## 2. 연구개발의 경제·산업적 중요성

- ㉕ 녹차 추출물의 양식어류에 대한 항생제 대체 효과 및 육질개선 등의 긍정적 효과가 입증되었으나, 실질 활성성분의 규명을 통한 보다 체계적인 연구를 위해서는 항균 활성을 보이는 flavonoid 화합물의 단일성분으로서의 공급이 요구되며 현재 판매되고 있는 각 flavonoid 화합물들은 매우 고가이므로 실험실에서뿐만 아니라 양식현장에서는 순수 화합물을 이용한 실험연구가 거의 불가능한 실정임.
- ㉖ 또한 저가 어종의 경우, 녹차 추출물의 사육수 및 사료의 첨가는 경제적 부담으로 인해 우수한 항생제 대체 및 육질개선의 효과에도 불구하고 광범위하게 적용이 어려우므로 장기적으로 녹차의 항균성분의 보다 경제적인 생산과 공급방법의 개발이 필요함.

## 3. 연구개발의 사회·문화적 중요성

- ㉗ 전 세계적으로 가축 사육이나 양어장에서 성장촉진이나 질병치료 목적으로 사용된 항생제의 잔류와 대사물질에 의한 인축 독성 및 환경오염 등이 사회적인 문제가 되고있음. FAO (세계식량기구)·OIE (국제수역사무국)·WHO (세계보건기구)는 동물약품의 안전사용을 위하여 지속적으로 인체용과 동물용으로 사용되는 항생제의 종류를 구별하여, 수의사의 처방에 따라 필요한 곳에 최소한의 유효수량만을 사용하여야 함을 강조하고 있음. 그러나 우리나라는 축수산업에서 동물용 항생제를 사실상 무차별적으로 판매하고 있으며, 자가진료라는 명목으로 무분별한 사용을 허용하고 있음.
- ㉘ 또한 보다 안전한 합성농약 또는 항생제등을 사용하지 않은 고품질의 유기농 먹거리에 대한 수요가 증가함에 따라 친환경적이며 독성이 적은 천연항생물질 개발의 중요성 및 시급성이 대두되고 있음.
- ㉙ 이러한 문제점을 해결하기 위하여 국제적으로 동물 항생제의 사용량을 줄여나가고 있으며, 「국가항생제내성안전관리사업」을 총괄하고 있는 식약청은 수산용 항생제 사용이 인체에 미치는 영향을 평가하고 인체 위해를 최소화하기 위한 국제 전략을 수립하기 위해 관련 국제기구인 FAO/WHO/OIE/Codex와 공동으로 제 3차 국제전문가 회의 (Joint FAO/WHO/OIE Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance)를 개최하여 수산용 항생제 사용 및 항생제 내성에 관한 위해평가 및 위해관리 추진을 위한 권장사항을 확립하는 등 적극적으로 올바른 항생제 사용을 유도하고 항생제 내성으로 인한 위해를 줄이는 노력을 하고 있음.
- ㉚ 인축 독성 및 환경오염 등 수산용 항생제의 문제점을 해결하면서 양식어류를 보호할 수 있는 기술적 방안으로 주로 녹차 등으로부터 생산되는 이차대사산물인 천연항생물질의 개발이 유력하게 제시되고 있음.



### 제 3 절 연구개발의 범위

#### 1. 식물유래 flavanone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

- ㉠ 방선균 이종숙주에서 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 유래의 4-coumarate:CoA ligase (ScCCL)와 licorice plant인 *Glycyrrhiza echinata* 유래의 chalcone synthase (CHS), *Pueraria lobata* 유래의 chalcone isomerase (CHI) 유전자의 합성 및 발현과 p-coumaric acid 및 cinnamic acid의 feeding에 의한 flavanone 화합물의 조합생합성 시스템 확립

#### 2. 발현시스템 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상

- ㉠ Integration vector/replication vector 등 발현벡터의 조합, copy number 및 promoter 등의 최적화에 의한 조합생합성의 생산성 향상
- ㉡ CHS의 기질인 malonyl-CoA의 세포 내 농도 증가를 위한 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 pantothenate kinase (PanK)의 과발현에 의한 naringenin chalcone의 생합성 효율 향상에 의한 생산성 향상
- ㉢ 방선균 이종숙주의 codon preference를 고려한 식물유래 유전자의 염기서열 재설계 및 인공유전자 (synthetic gene)의 합성과 발현 최적화에 의한 조합생합성의 생산성 향상

#### 3. 식물유래 flavonol 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

- ㉠ Citrus plant 유래의 flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase (F3H), flavonoid 3' hydroxylase (F3'H) 및 flavonol synthase (FLS) 유전자의 합성 및 발현에 의한 flavonol의 조합생합성 시스템 완성

#### 4. 식물유래 flavone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

- ㉠ *Petroselinum crispum* 유래의 flavone synthase (FNS I) 유전자의 합성 및 추가 발현에 의한 flavone의 조합생합성 시스템 완성

#### 5. Flavonoid 화합물들의 대량 생산 및 분리정제 공정의 개발

- ㉠ 소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화
- ㉡ 중·대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up
- ㉢ 분리공정 최적화 및 scale-up

#### 6. 확보된 flavonoid 화합물의 *in vitro* 항균활성 검증

- ㉠ 수산 양식과 관련이 높은 model 균주로 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Lactococcus garvieae*를 선발
- ㉡ 본 연구를 통해 확보한 flavonoid 화합물의 항균활성을 MIC (minimum inhibitory concentration; 최소저해농도) 측정으로 조사

#### 7. 양식어류에 대한 현장적용 시험

- ㉠ 넙치를 대상으로 한 현장적용에서 사료첨가제로의 가능성을 확인

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 1. 국내기술동향

- ㉔ 국내 천연물유래 생리활성물질 생합성에 대한 연구는 1990년대 중반부터 활성화되기 시작하여 몇 가지 주요 천연화합물에 대한 연구가 진행되고 있으며 국제전문학술지에 결과가 발표되기 시작했음. 그러나 대부분 생합성 유전자의 확보와 생합성 경로 규명 및 방선균 조절기작에 초점을 맞춘 연구로서 조합생합성에 의한 신규물질의 창출과 유용 이차대산산물의 이종숙주 생산기술의 개발에 대한 연구는 전무한 상태이며, 본격적으로 생합성 유전자의 조합을 통해 다양한 이차대산산물의 유도체를 생산할 수 있는 조합생합성 기술과, 유전자 조작이 어려운 야생 미생물균주 또는 식물로부터 얻은 거대 생합성 유전자집단의 이종숙주 발현을 통한 유용 이차대산산물의 이종숙주 생산기술은 국내에서는 본 연구실만 보유하고 있는 고유의 핵심기술임.
- ㉕ 국내 항생제 대체용 천연항생물질 개발에 관한 연구는 식물 추출물 등의 효능 평가에 관한 연구가 주로 이루어지고 있으며, 본과제의 목표와 같이 식물 추출물 중, 단일 활성 성분의 미생물을 이용한 대량생산에 관한 연구는 예가 없음.

#### 2. 국외기술동향

##### 가. 유용 물질의 이종숙주생산 동향

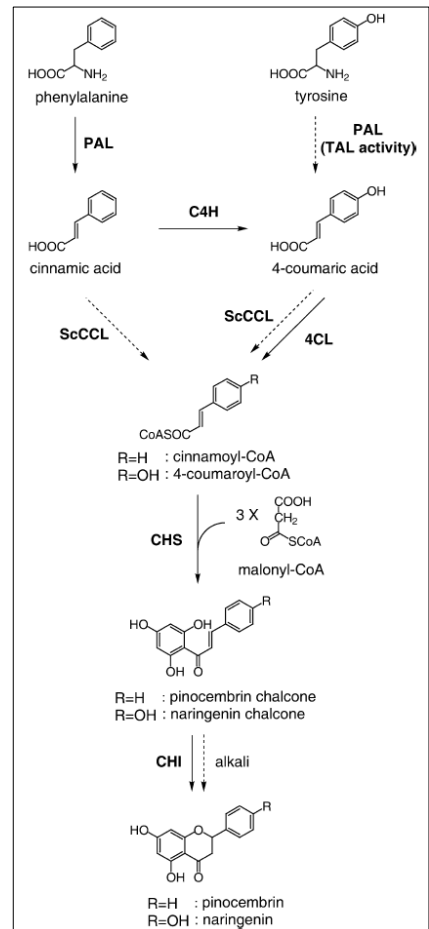
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Kosan Bioscience, USA (Stanford University, Chaitan Khosla)	방선균 유래 polyketide 계열 화합물의 이종숙주 생산을 위한 <i>Streptomyces coelicolor</i> 이종숙주 개발 및 multiple expression vector 개발	Erythromycin 등 macrolide 계열 항생제의 유도체 개발을 통한 개량 항생제 개발, 임상시험 중
	Myxobacteria 유래 polyketide 계열 화합물의 이종숙주 생산을 위한 <i>Myxococcus xanthus</i> 이종숙주 및 발현 시스템 개발	Epothilone의 대량생산을 통한 임상완료
University of Michigan, USA (David H. Sherman)	Marine cyanobacteria 유래 생리활성물질의 생합성 유전자집단 확보	해양미생물 유래 천연화합물의 실용화 기반 구축
Saarland University, Germany (Rolf Muller)	Myxobacteria 유래 polyketide-polypeptide hybrid 화합물의 이종숙주 생산을 위한 <i>Pseudomonas putida</i> 이종숙주 및 발현 시스템 개발	Myxochromides S의 이종숙주 내 대량생산 달성

##### 나. Flavonoid 화합물의 미생물 생산 동향

- ㉔ *E. coli* 에서 flavanone의 생합성에 필요한 효소들의 발현 시, Fig. 3의 2번째 단계의 C4H의 활성화에 필요한 P-450 reductase가 존재하지 않으므로 flavanone의 생산이 불가능

함. 그러나 일본 동경대의 Horinouchi 그룹은 *E. coli*를 이종숙주로 사용하여 yeast인 *Rhodotorula rubra*의 PAL이 tyrosine을 기질로 사용하여 coumaric acid를 생산할 수 있다는 사실을 이용하여, 이를 방선균인 *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 4-coumarate:CoA ligase (ScCCL), licorice plant인 *Glycyrrhiza echinata*의 CHS의 유전자들과 조합 발현하여 flavonoid 화합물 중 가장 간단한 구조의 flavanone인 naringenin을 소량 생산하는데 성공하였음 (Fig. 3) [Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(5), 2699-2706].

- ㉔ 미국 미네소타 대학의 Schmidt-Dannert 그룹은 유사한 방법을 사용하였으나, PAL을 *Rhodobacter shpaeroides*의 tyrosine ammonia lyase (TAL)로, 나머지 유전자들은 *Arabidopsis thaliana* 유래의 유전자들로 대체함으로써 생산성을 향상시킬 수 있었다고 보고한 바 있음 [ChemBioChem, 2004, 5(4), 500-507].
- ㉕ 이들 선행연구들은 재조합 미생물을 이용하여 flavonoid 화합물의 생산 가능성을 입증하였으나, ① 산업화를 위해서는 생산성이 낮으며, ② flavonoid 화합물 중 보다 유용한 항균활성을 보이는 화합물의 생산에는 성공하지 못한 문제점이 남아있음.



<Figure 3> 식물에서 flavanone 생합성 경로 (실선)와 *E.coli*에서 조합생합성에 의한 flavanone의 생합성 경로 (점선)

#### 다. 향후 전망

- ㉖ 따라서 실제 유용한 항균활성의 보다 복잡한 구조의 화합물의 조합생합성이 가능하고, 산업화가 가능한 수준으로 생산성이 향상된 미생물을 이용한 flavonoid 화합물의 조합생합성 시스템의 개발이 필요함.
- ㉗ 즉, 보다 다양한 구조의 항균 활성의 flavonoid 화합물의 미생물 대량생산이 실현되면, 신개념의 천연 항생물질의 개발이 가능할 것임.

### 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- ㉘ 전세계적으로, 수산양식업에서의 항생제 과다 사용 규제 및 내성 문제 해결에 대한 요구가 증대되고 있는 시점에서, 새로운 개념의 천연항생제를 개발하는 연구는 국내외적으로 반드시 필요한 기술임.
- ㉙ 본 연구팀의 연구결과인 식물 유래 flavonoid 화합물의 미생물 생산 기술은 국내에서는 독보적인 위치에 있으며, 국외적으로는 앞서 언급한 미국 미네소타 대학의 Schmidt-Dannert 그룹이나 미국 버팔로 대학의 Koffas 그룹에서 이루어지고 있음. *E. coli*나 *Saccharomyces cerevisiae*를 이종숙주로 이용하여 flavonoid를 생산하는 이들 그룹과 비교하여, flavonoid 생합성의 중요한 factor인 malonyl-CoA의 양이 풍부한 *Streptomyces*를 이종숙주로 사용하는 본 연구팀의 기술은 독자적인 장점을 가지고 있기에 앞으로도 충분한 경쟁력을 가

질 것으로 예상됨.

㉔ 본 연구결과의 국내외적인 기술 수준과 비교하면 다음 표와 같음.

기술사항	기술수준의 분석평가
대사경로 조합기술	미생물을 이용한 항생물질의 생산은 세계적으로 초기단계에 있으므로 천연물의 생합성 유전자에 대한 기초연구들이 대학 및 국가기관연구소에서 진행되고 있어 경쟁력이 있음. 1990년대 초부터 진행된 항생제 생합성 유전자에 대한 기초연구는 이제 상당부분 진척이 되었고, 이를 이용한 신규 항생제의 설계는 감염성 질환에 사용되는 항생제를 대상으로 산업화에 응용되어 조합생합성에 의한 새로운 천연항생물질 개발 가능성과 시장성이 크며, flavonoid와 같은 천연 항생물질의 경우 임상실험을 단축할 수 있으므로 산업화하는데 걸리는 시간을 단축할 수 있음.
미생물 이종숙주 도입 및 발현기술	발효 미생물 분야로부터 성장한 국내 미생물 산업은 유전체 연구 결과를 상용화할 수 있는 기반도 잘 구축되어 있으며 국내의 항생물질 생산 균주의 발효 및 관련 산업기반 시설, 연구인력 수준은 선진국 수준에 근접하였음.
발현산물 분석기술	본 연구팀은 미생물에서 생산된 flavonoid 화합물을 모두 분석하였으며 이에 대한 축적된 노하우를 확보하였음. 이에 flavonoid 화합물의 발효 및 구조 분석에 관한 기술수준, 연구인력 수준은 선진국 수준에 근접하였음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과  
 제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과

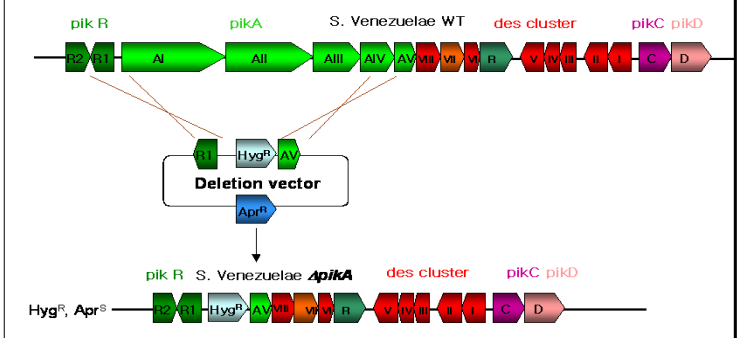
연구 내용	연구결과	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)
<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 Flavanone 화합물의 미생물 이종숙주 생산 시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4-coumarate:CoA ligase (ScCCL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI) 유전자의 발현 벡터 제작 및 형질 전환</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4-coumaric:CoA ligase (ScCCL), chalcone synthase (CHS), 3종의 chalcone isomerase (CHI) 유전자의 합성 및 발현 벡터 제작</li> <li>- <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) 유래의 4-coumarate:CoA ligase (ScCCL, GenBank accession no. AL939119), <i>Arabidopsis thaliana</i> 유래의 chalcone synthase (CHS, GenBank accession no. AF112086), <i>Arabidopsis thaliana</i> 유래의 chalcone isomerase (CHI, GenBank accession no. NM_115370) 유전자를 합성하고 Fig. 4A와 같은 기본 발현 벡터를 제작하였음.</li> <li>- <i>A. thaliana</i> CHI 이외에 2종의 <i>Medicago sativa</i> (GenBank accession no. M91079), <i>Pueraria lobata</i> (GenBank accession no. D63577) 유래의 CHI를 합성하여 Fig. 4B, C의 발현벡터를 추가로 제작하였음.</li> </ul> <div style="text-align: center;"> <p><b>&lt;Fig. 4&gt; Flavanone 생합성 유전자의 발현 벡터</b></p> </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 완성된 발현 벡터를 이종숙주로 개발한 <i>Streptomyces venezuelae</i> DHS2001 [Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72, 763-769] (Fig. 5)에 형질 전환하였음.</li> </ul>

연구 내용	연구결과	연구수행방법 (이론적 · 실험적 접근방법)
-------	------	----------------------------

식물유래 Flavanone 화합물의 미생물 이종숙주 생산 시스템 구축

4-coumarate:CoA ligase (ScCCL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI) 유전자의 발현 벡터 제작 및 형질 전환

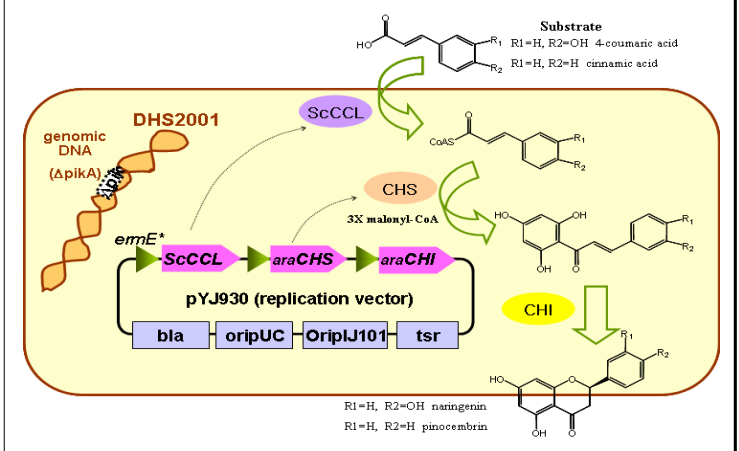
*S. venezuelae*는 *Streptomyces* 계열 균주 중 ①성장 속도가 빠르며 ②transformation 등의 유전자 조작이 매우 용이하고 ③염색체상의 유전자 제거 및 치환이 용이하며 ④다양한 flavonoid 화합물의 생합성에 필요한 전구체들을 자연 생산할 수 있는 장점이 있음.



<Fig. 5> *Streptomyces venezuelae* DHS2001 이종숙주 제작

Phenylpropanoic acid (4-coumaric acid 또는 cinnamic acid)의 feeding을 통하여, 방선균 이종숙주에서 flavanone 생산

형질전환된 *S. venezuelae* 들연변이주에 Fig. 6에서와 같이 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid를 feeding 하면, ScCCL에 의해 coumaroyl-CoA와 cinnamoyl-CoA로 활성화됨. 이어서 CHS에 의해 3개의 malonyl-CoA unit이 단계적인 축합반응을 거쳐 각 기질에 해당하는 chalcone 화합물이 생성됨.



<Fig. 6> 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid의 feeding을 통한 flavanone 생산 과정

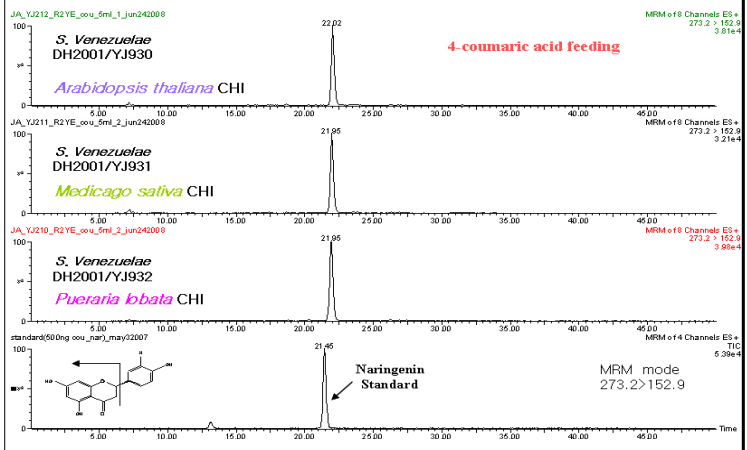
식물유래 Flavanone 화합물의 미생물 이종숙주 생산 시스템 구축

- 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid의 feeding을 통해, flavanone 화합물인 naringenin 및 pinocembrin의 생산 성공

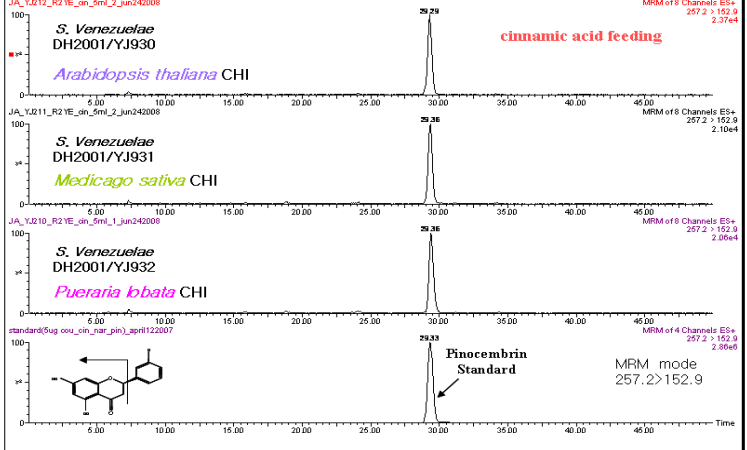
- Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)의 동시발현과 Phenylalanine (Phe) 또는 tyrosine (Tyr) feeding을 통하여 flavanones 생산

이렇게 생성된 chalcone 화합물은 CHI 또는 혐기조건 (pH 9)하에서 화학적으로 flavanone인 naringenin과 pinocembrin을 형성함.

- 본 연구에서는 1.2 mM 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid를 feeding하여, ScCCL, CHS, CHI의 작용을 통해 flavanone 화합물인 80 µg/L naringenin 및 160 µg/L pinocembrin이 생산되는 것을 LC/ESI-MS/MS로 확인하였음 (Fig. 7, 8).



<Fig. 7> 방선균 이종숙주 DHS2001에서 naringenin 생산 확인

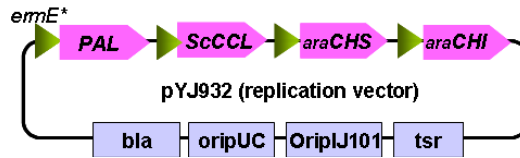


<Fig. 8> 방선균 이종숙주 DHS2001에서 pinocembrin 생산 확인

- ScCCL, CHS, CHI 외에 PAL의 동시발현을 통한 방선균 이종숙주에서 flavanone 생산
- Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)와 tyrosine ammonia-lyase (TAL)의 기능을 동시에 가지는 Streptomyces maritimus 유래의 PAL (GenBank accession no. AF254925) 유전자를 합성하여 ScCCL, CHS, CHI와 동시발현이 가능한 벡터를 완성 (Fig. 9) 하고 이종숙주에 형질전환하였음.

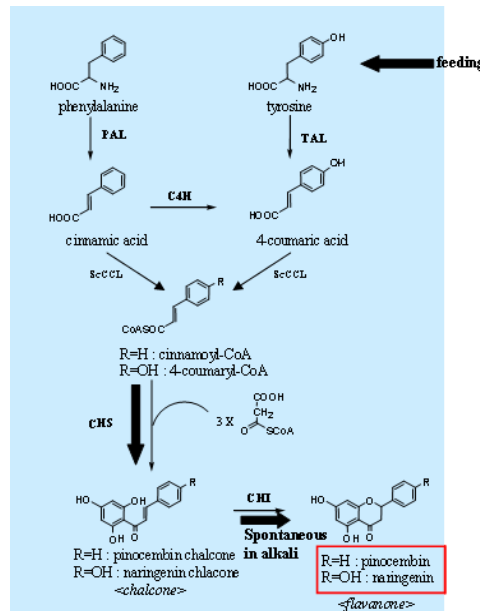
식물유래  
Flavanone  
화합물의  
미생물  
이종숙주  
생산  
시스템  
구축

Phenylalanine  
ammonia-lyase  
(PAL)의  
동시발현과  
Phenylalanine (Phe)  
또는 tyrosine (Tyr)  
feeding을 통하여  
flavanones 생산



<Fig. 9> PAL, ScCCL, CHS, CHI  
유전자의 동시 발현을 위한 벡터

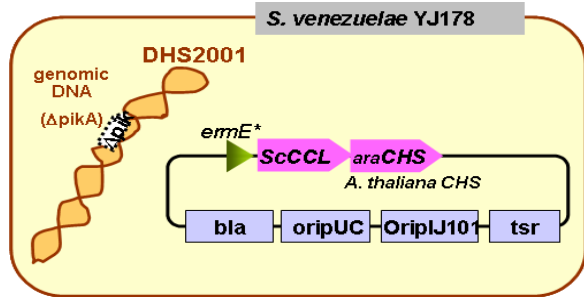
- Fig. 10에서와 같이 Phenylalanine (Phe) 또는 tyrosine (Tyr) 아미노산을 feeding 하여, 이종숙주로부터 10 µg/L naringenin 및 20 µg/L pinocembrin을 생산하였음. ScCCL, CHS, CHI의 발현을 통한 flavanone 생산 시스템과 비교하였을 때 생산량이 감소하였음.
- 따라서 본 연구팀은 flavanoid 생합성 경로의 중간체로 첨가해주는 amino acid와 phenylpropanoic acid의 가격을 비교하였음. 그 결과 amino acid인 phenylalanine과 tyrosine의 시중 판매 가격은 phenylpropanoic acid인 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid와 비교하여 약간 저렴하나, 대량 구입 시 가격면에서 큰 차이가 나지 않음. 이에 이후에 실시할 연구에서는 4-coumaric acid와 cinnamic acid를 전구체로 시작하는 시스템을 사용하기로 결정함.



<Fig. 10> Phenylalanine 또는  
tyrosine의 feeding을 통한  
flavanone 생산과정



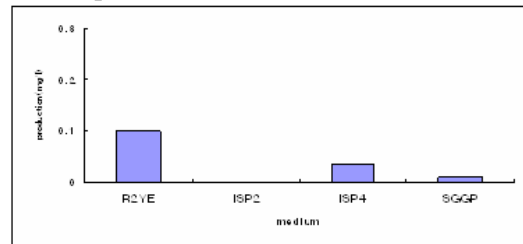
<ul style="list-style-type: none"> <li>소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산 배지의 조성, 배양시기, Inoculum size, agitation 효과 등에 대한 조사를 바탕으로 소형 발효조에서의 발효 조건 최적화 및 생산성 증대</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>발효배지 조성, 배양시기별 생산성 조사</b></li> <li>다음으로 본 연구팀은 방선균 이종숙주에서 flavanone 생산 시스템을 최적화하기 위해, 우선적으로 생산배지를 선정하였음. 방선균 생산배지로 알려져 있는 배지 중 네 가지 종류 (SGGP, ISP2, ISP4, R2YE)를 일차적으로 선정하였으며, 각 배지의 조성은 Table 2와 같음.</li> </ul> <table border="1" data-bbox="710 526 1420 963"> <tr> <td colspan="2"><b>R2YE</b></td> <td colspan="2"><b>ISP4</b></td> </tr> <tr> <td>Sucrose</td> <td>103g</td> <td>Soluble Starch</td> <td>10g</td> </tr> <tr> <td>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></td> <td>0.25g</td> <td>Dipotassium Phosphate</td> <td>1g</td> </tr> <tr> <td>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</td> <td>10.12g</td> <td>Magnesium Sulfate USP</td> <td>1g</td> </tr> <tr> <td>Glucose</td> <td>10g</td> <td>Sodium Chloride</td> <td>1g</td> </tr> <tr> <td>Casaminoacids</td> <td>0.1g</td> <td>Ammonium Sulfate</td> <td>2g</td> </tr> <tr> <td>Trace element solution</td> <td>2ml</td> <td>Calcium Carbonate</td> <td>2g</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract</td> <td>5g</td> <td>Ferrous Sulfate</td> <td>1mg</td> </tr> <tr> <td>TES buffer</td> <td>5.73g</td> <td>Manganous Chloride</td> <td>1mg</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Zinc Sulfate</td> <td>1mg</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>SGGP</b></td> <td colspan="2"><b>ISP2</b></td> </tr> <tr> <td>Bactopeptone</td> <td>4g</td> <td>Malt extract</td> <td>10g</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract</td> <td>4g</td> <td>Bacto-yeast extract</td> <td>4g</td> </tr> <tr> <td>Casamino acids</td> <td>4g</td> <td>Glucose</td> <td>4g</td> </tr> <tr> <td>Glycine</td> <td>2g</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</td> <td>0.5g</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Table 2&gt; Flavonoid 생산 배지의 조성</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>생산배지의 종류에 따른 생산성을 조사하기 위하여, ScCCL과 CHS 유전자의 발현 벡터가 형질전환된 <i>S. venezuelae</i> 돌연변이주 YJ178 (Fig. 11)을 이용하였음. 이는 하기와 같이 ScCCL-CHS-CHI (Fig. 4A) 혹은 PAL-ScCCL-CHS-CHI (Fig. 9) 유전자 세트를 발현한 경우보다 ScCCL-CHS 유전자 세트를 발현한 경우에 flavanone의 생산성이 월등히 높았기 때문임. 선행 연구에서도 CHI 혹은 PAL를 추가하여 발현하였을 경우, 생산성이 줄어든 보고가 있음 [Applied Microbiology Biotechnology, 2005, 68(4), 498-504]. 이에 이후의 실험조건에서는 ScCCL-CHS 유전자를 발현하고 (YJ178 사용), 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid를 첨가하는 시스템을 사용하기로 결정함.</li> <li>&lt;하기&gt; <ul style="list-style-type: none"> <li>PAL-ScCCL-CHS-CHI 발현 : 10 µg/L naringenin 및 20 µg/L pinocembrin 생산</li> <li>ScCCL-CHS-CHI 발현 : 80 µg/L naringenin 및 160 µg/L pinocembrin 생산</li> <li>ScCCL-CHS 발현 : 100 µg/L naringenin 및 200 µg/L pinocembrin 생산</li> </ul> </li> </ul>	<b>R2YE</b>		<b>ISP4</b>		Sucrose	103g	Soluble Starch	10g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25g	Dipotassium Phosphate	1g	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.12g	Magnesium Sulfate USP	1g	Glucose	10g	Sodium Chloride	1g	Casaminoacids	0.1g	Ammonium Sulfate	2g	Trace element solution	2ml	Calcium Carbonate	2g	Yeast extract	5g	Ferrous Sulfate	1mg	TES buffer	5.73g	Manganous Chloride	1mg			Zinc Sulfate	1mg	<b>SGGP</b>		<b>ISP2</b>		Bactopeptone	4g	Malt extract	10g	Yeast extract	4g	Bacto-yeast extract	4g	Casamino acids	4g	Glucose	4g	Glycine	2g			MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g		
<b>R2YE</b>		<b>ISP4</b>																																																																
Sucrose	103g	Soluble Starch	10g																																																															
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25g	Dipotassium Phosphate	1g																																																															
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.12g	Magnesium Sulfate USP	1g																																																															
Glucose	10g	Sodium Chloride	1g																																																															
Casaminoacids	0.1g	Ammonium Sulfate	2g																																																															
Trace element solution	2ml	Calcium Carbonate	2g																																																															
Yeast extract	5g	Ferrous Sulfate	1mg																																																															
TES buffer	5.73g	Manganous Chloride	1mg																																																															
		Zinc Sulfate	1mg																																																															
<b>SGGP</b>		<b>ISP2</b>																																																																
Bactopeptone	4g	Malt extract	10g																																																															
Yeast extract	4g	Bacto-yeast extract	4g																																																															
Casamino acids	4g	Glucose	4g																																																															
Glycine	2g																																																																	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g																																																																	



<Fig. 11> *S. venezuelae* 들연변이주 YJ178

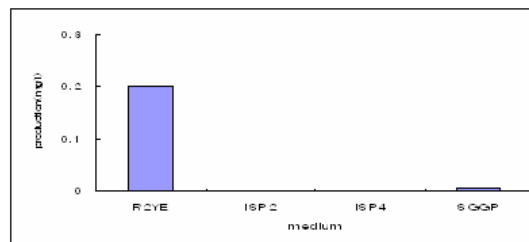
- *S. venezuelae* YJ178을 이용하여 1.2 mM 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid를 feeding한 결과, 기존에 사용하고 있던 R2YE 배지에서 flavanone의 생산성이 가장 높았음 (0.1 mg/L naringenin 및 0.2 mg/L pinocembrin 생산) 그 결과 최적의 flavanone 생산 배지로 R2YE를 지속적으로 사용하기로 결정함 (Fig. 12, 13).

Naringenin의 생산성



<Fig. 12> 생산 배지의 종류에 따른 naringenin의 생산성 비교

Pinocembrin의 생산성



<Fig. 13> 생산 배지의 종류에 따른 pinocembrin의 생산성 비교

- *S. venezuelae* YJ178 들연변이주를 이용해, R2YE 배지에서 배양 시기별 생산성을 조사한 결과, Fig. 14와 같이 방선균 이종숙주의 성장에 따른 flavanone 생산성 데이터를 확보할 수 있게 되었으며, 이는 flavanone 생산 시스템 구축을 위한 기초가 마련되었음.

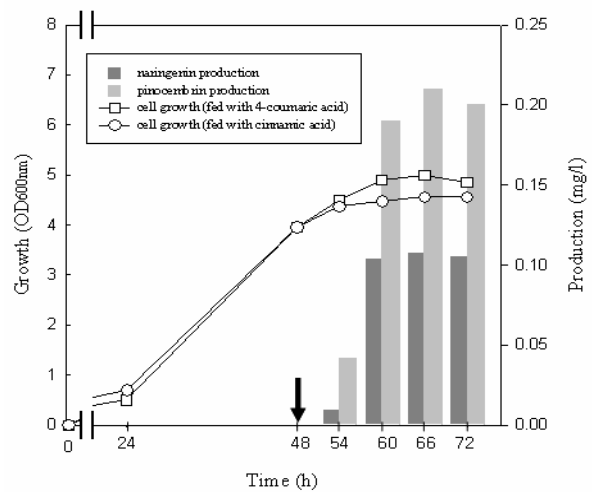
소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화

생산 배지의 조성, 배양시기, inoculum size, agitation 효과 등에 대한 조사를 바탕으로 소형 발효조에서의 발효 조건 최적화 및 생산성 증대

소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화

생산 배지의 조성, 배양시기, inoculum size, agitation 효과 등에 대한 조사를 바탕으로 소형 발효조에서의 발효 조건 최적화 및 생산성 증대

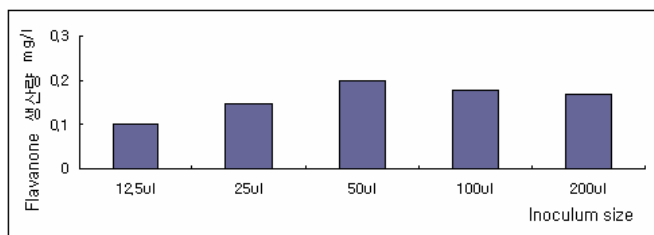
- *S. venezuelae* YJ178 돌연변이주를 이용해, R2YE 배지에서 배양 시기별 생산성을 조사한 결과, Fig. 14와 같이 방선균 이종숙주의 생장에 따른 flavanone 생산성 데이터를 확보할 수 있게 되었으며, 이는 flavanone 생산 시스템 구축을 위한 기초가 마련되었음. Flavonoid 생합성 유전자를 발현하는 방선균 돌연변이주는, 48시간 배양 후 4-coumaric acid와 cinnamic acid를 feeding하고 추가로 18시간을 더 배양하였을 때 가장 생산성이 좋았음. 결과적으로 **0.1 mg/L naringenin** 및 **0.2 mg/L pinocembrin** 생산



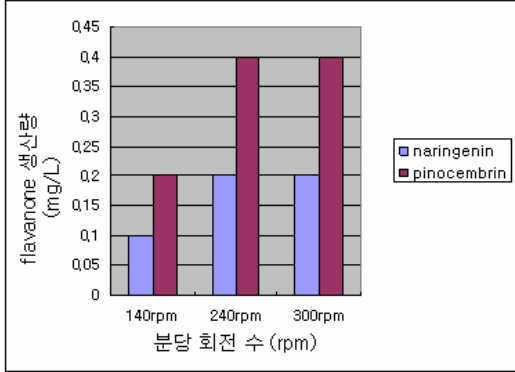
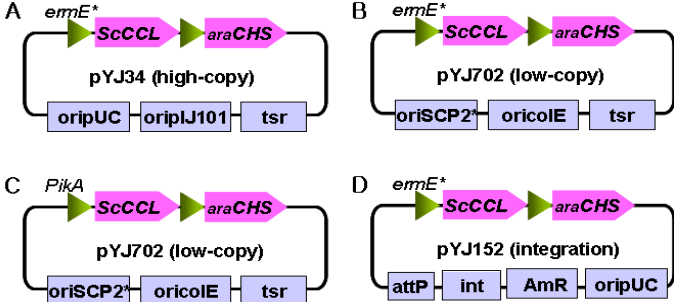
<Fig. 14> 방선균 이종숙주의 배양시기에 따른 flavanone의 생산성 비교

▪ Inoculum size, agitation 효과 등 조사

- 다음으로 *S. venezuelae* YJ178 돌연변이주를 이용하여 inoculum size에 따른 생산성을 조사하였음. 그 결과 방선균 포자를 R2YE 배지에서 24시간 사전배양하고 50  $\mu$ l의 사전 배양액 (pre-culture)을 5mL의 생산배지에 inoculation 하였을 때 (1;100), flavanone이 가장 많이 생산되었음 (Fig. 15). (**0.2 mg/L naringenin** 및 **0.4 mg/L pinocembrin** 생산)



<Fig. 15> 방선균 이종숙주의 inoculum size에 따른 flavanone의 생산성 비교

<ul style="list-style-type: none"> <li>소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산 배지의 조성, 배양시기, inoculum size, agitation 효과 등에 대한 조사를 바탕으로 소형 발효조에서의 발효 조건 최적화 및 생산성 증대</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavanone의 생산성에 미치는 agitation 효과를 조사하기 위하여 다양한 분당 회전수 (rpm) 조건하에서 <i>S. venezuelae</i> YJ178 돌연변이주를 배양하였음. 그 결과 Fig. 16에서와 같이 240rpm 이상에서 가장 높은 flavanone의 생산성이 관찰되었음. 결과적으로 <b>0.2 mg/L naringenin</b> 및 <b>0.4 mg/L pinocembrin</b> 생산</li> </ul>  <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 16&gt; Agitation 효과에 따른 이종숙주의 flavanone 생산성 비교</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>발현 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Integration 벡터/replication 벡터 등 발현벡터의 조합, copy number 및 promoter등을 이용하여 flavanone 생합성 유전자 발현 시스템의 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavanone 생합성 유전자 발현 시스템의 최적화를 통한 생산성 향상</li> <li>선행 실시한 1L 소형 발효조를 통한 발효조건 최적화 시스템을 바탕으로 flavanone 생합성 유전자의 발현 시스템을 최적화하고자 하였음.</li> <li>Integration 벡터 (pYJ152)와 replication 벡터 (pYJ34, pYJ618, pYJ702)를 이용한 발현벡터의 조합, copy number (high-copy, low-copy) 및 promoter (<i>pikA</i> promoter, <i>ermE*</i> promoter)등의 조합을 통하여 Fig. 17에서와 같은 다양한 발현 벡터를 제작하였음.</li> <li>Flavanone의 생산성을 비교한 결과, <i>ermE*</i> promoter를 가지는 high copy, replication 방선균 발현벡터인 pYJ34 벡터를 사용하고, 각 유전자 앞에 <i>ermE*</i> promoter를 추가한 경우 (Fig. 17A)에 flavanone의 생산량 가장 좋았음 (Table 3).</li> </ul>  <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 17&gt; 다양한 발현 벡터 및 promoter의 조합</b></p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Integration 벡터/replication 벡터 등 발현벡터의 조합, copy number 및 promoter등을 이용하여 flavanone 생합성 유전자 발현 시스템의 최적화</li> </ul>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>발현벡터의 종류</th> <th>Naringenin (mg/L)</th> <th>Pinocembrin (mg/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>pYJ34 (high-copy, <i>ermE*</i> promoter)</td> <td>1.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>pYJ702 (low-copy, <i>ermE*</i> promoter)</td> <td>0.24</td> <td>0.48</td> </tr> <tr> <td>pYJ618 (low-copy, <i>pikA</i> promoter)</td> <td>0.2</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>pYJ152 (integration, <i>ermE*</i> promoter)</td> <td>0.25</td> <td>0.5</td> </tr> </tbody> </table>	발현벡터의 종류	Naringenin (mg/L)	Pinocembrin (mg/L)	pYJ34 (high-copy, <i>ermE*</i> promoter)	1.0	2.0	pYJ702 (low-copy, <i>ermE*</i> promoter)	0.24	0.48	pYJ618 (low-copy, <i>pikA</i> promoter)	0.2	0.4	pYJ152 (integration, <i>ermE*</i> promoter)	0.25	0.5
발현벡터의 종류	Naringenin (mg/L)	Pinocembrin (mg/L)															
pYJ34 (high-copy, <i>ermE*</i> promoter)	1.0	2.0															
pYJ702 (low-copy, <i>ermE*</i> promoter)	0.24	0.48															
pYJ618 (low-copy, <i>pikA</i> promoter)	0.2	0.4															
pYJ152 (integration, <i>ermE*</i> promoter)	0.25	0.5															
<ul style="list-style-type: none"> <li>발현 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>대사공학적 방법을 통하여 세포내 malonyl-CoA의 농도를 증가시킴으로써, 이종숙주의 flavanone 생산성을 증대시킴</li> </ul>	<p>&lt;Table 3&gt; 발현 벡터의 종류에 따른 flavanone 생산성 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>결과적으로 1.0 mg/L naringenin 및 2.0 mg/L pinocembrin 생산하였음.</li> <li>대사공학적 방법을 통하여 이종숙주에서 flavanone 생산성 향상</li> <li>Flavonoid 생합성 단계 중, naringenin chalcone (혹은 pinocembrin chalcone)은 4-coumaroyl-CoA (혹은 cinnamoyl-CoA)와 3개의 malonyl-CoA가 CHS의 축합반응에 의하여 생합성됨. 이러한 malonyl-CoA는 자연 상태의 세포내 농도에 의존해야 하므로, 이의 농도를 높일 수 있는 대사공학 전략이 필요함. 이에 본 연구팀은 malonyl-CoA의 세포 내 농도 증가를 위해, acetyl-CoA carboxylase (ACC) 및 pantothenate kinase (PanK) 유전자의 과발현을 위한 벡터를 제작하고 (Fig. 18) flavonoid 생합성 유전자와 함께 발현하였음. 그 결과, 1.5 mg/L naringenin 및 3.0 mg/L pinocembrin 생산하였음.</li> </ul> <p>&lt;Fig. 18&gt; Flavanone 및 malonyl-CoA 생합성 유전자 발현 벡터의 예</p>															

Amino Acids	Codon Usage	Amino Acids	Codon Usage	Amino Acids	Codon Usage	Amino Acids	Codon Usage
Phe	TTC	Leu	CTC	Ser	TCC	Tyr	TAC
Cys	TGC	Trp	TGG	Pro	CCG	His	CAC
Gln	CAG	Arg	CGC	Ile	ATC	Met	ATG
Ala	GCC	Asp	GAC	Glu	GAG	Gly	GGc
Thr	ACC	Asn	AAC	Lys	AAG	Val	GTC

<Table 4> *S. venezuelae*의 codon preference를 고려한 염기서열

- 본 연구팀은 이종숙주로 사용하는 *S. venezuelae*의 genome sequence를 98% 확보하고 있으며, 이를 합성 유전자의 염기서열 설계에 활용하였음.

- 식물유래 유전자의 codon-optimization을 실시하고, (Table 4) 추가적으로 flavanone 생산 배지인 R2YE (Table 2)의 성분 중 sucrose의 양을 조절하여 modified R2YE (25% sucrose 함유) 생산배지를 제작하였음. 그 결과 최종적으로 4.0 mg/L naringenin 및 6.0 mg/L pinocembrin의 생산에 성공하였음.

식물유래 유전자의 codon-optimization을 통하여, 이종숙주에서 합성 유전자의 발현 효율을 증가시킴으로써 flavanone 생산을 증가시킴

발현 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상

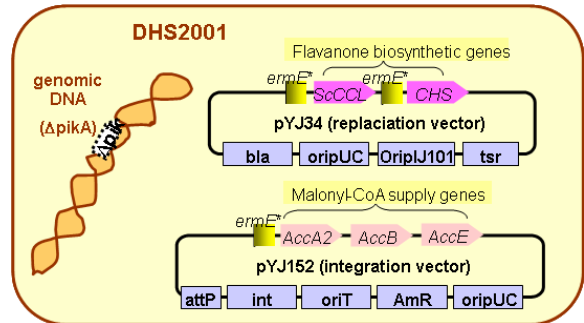
\* 방선균 이종숙주에서 생산된 flavanone의 양은 하기 및 Fig.19의 방법을 통해 최종적으로 4.0 mg/L naringenin 및 6.0 mg/L pinocembrin을 생산하였음.

<하기>

- pYJ34 (*ermE*\* promoter) : *S. coelicolor* 유래의 ScCCL 유전자와 이종숙주의 codon preference를 고려하여 재설계한 *A. thaliana* CHS 유전자를 발현함.

pYJ152 (integration vector) : Malonyl-CoA 생합성 유전자를 과발현함 (Fig. 19).

- 이종숙주 : *S. venezuelae* DHS2001  
- 1L 소형 발효조에서 최적화된 발효 조건



<Fig. 19> 이종숙주에서 flavanone 및 malonyl CoA 생합성 유전자 과발현 전략

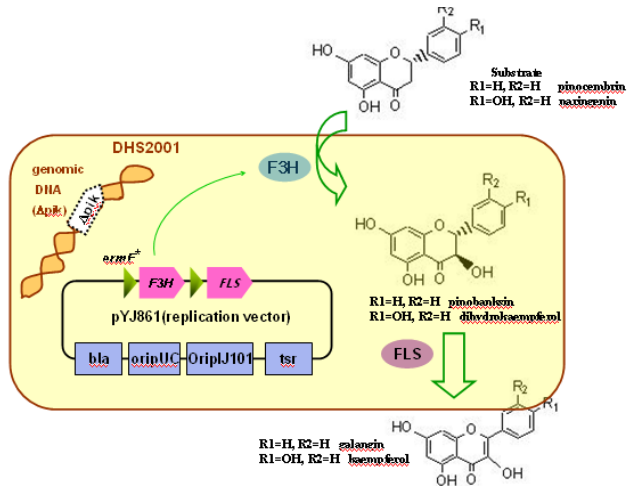
생산 배지	modified R2YE : 1L 기준
	Sucrose 250g
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.25g
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 10.12g
	Glucose 10g
	Casaminoacids 0.1g
	Trace element solution 2ml
	Yeast extract 10g
	TES buffer 5.73g
Inoculum size	1:100의 비율로 사전 배양액 첨가 (1L 소형발효조 기준)
Agitation	240 rpm (분당회전수)

1차년도 연구 요약 및 정리

## 제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과

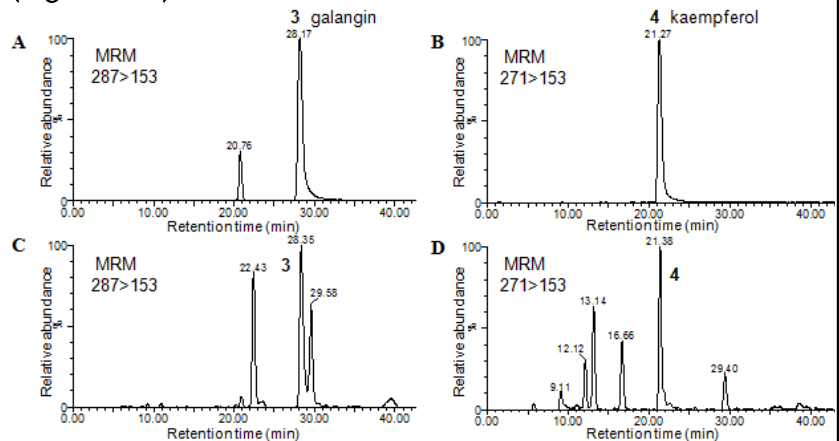
연구 내용	연구결과	연구수행방법
<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavonol 화합물의 이중숙주 생산시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavanone 3<math>\beta</math>-hydroxylase(F3H), flavonol synthase(FLS) 유전자의 발현 벡터 제작 및 형질 전환</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Flavanone 3<math>\beta</math>-hydroxylase (F3H), flavonol synthase (FLS) 유전자의 합성 및 발현 벡터 제작</b> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Citrus plant</i> 유래의 flavanone 3<math>\beta</math>-hydroxylase (F3H, GenBank accession no. AB011795) 및 flavonol synthase (FLS, GenBank accession no. AB011795) 유전자를 이중숙주인 <i>Streptomyces venezuelae</i>의 codon-preference (Table 4)를 고려하여 합성함.</li> <li>강력한 promoter인 <i>ermE*</i> promoter를 가지며, high-copy <i>E. coli-Streptomyces</i> shuttle vector인 pYJ34에 클로닝하여 Fig. 20과 같은 발현 벡터 (pYJ861)를 제작함. 벡터 pYJ34는 1차년도에 flavanone의 생산을 위해 사용된 발현 벡터임.</li> </ul> </li> </ul> <div data-bbox="810 869 1236 1077" style="text-align: center;"> </div> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 20&gt; Flavonol 생합성 유전자 발현 벡터</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>완성된 발현 벡터를 이중숙주로 개발한 <i>S. venezuelae</i> DHS2001 (Fig. 5)에 형질 전환하였음. 또한 <i>S. venezuelae</i> chromosome상에서 desosamine 생합성 유전자 집단 (<i>des</i>)과 pikromycin PKS 유전자 집단 (<i>pikA</i>)을 모두 제거한 이중숙주 YJ028을 추가로 제작하여 또 하나의 이중숙주로 활용할 수 있는 가능성을 확대하였음 (Fig. 21).</li> </ul> <div data-bbox="598 1547 1430 1966" style="text-align: center;"> </div> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 21&gt; <i>S. venezuelae</i> YJ028 이중숙주</b></p>

- **Flavanone (Naringenin 또는 Pinocembrin)의 feeding을 통하여, 방선균 이종숙주에서 flavonol 생산**
- 형질전환된 *S. venezuelae* 돌연변이주 (DHS2001/pYJ861)에 Fig. 22에서와 같이 naringenin 또는 pinocembrin을 feeding하면, F3H에 의해 dihydrokaempferol과 pinobanksin로 활성화됨. 이어서 FLS에 의해 dihydrokaempferol과 pinobanksin이 flavonol인 kaempferol과 galangin을 형성함.



<Fig. 22> Pinocembrin 또는 naringenin의 feeding을 통한 flavonol 생합성 과정

- 본 연구에서는 0.5 mM naringenin 및 pinocembrin을 feeding하여 flavonol 화합물인 **kaempferol 0.2 mg/L**과 **galangin 1.0 mg/L** 생산되는 것을 LC/ESI-MS/MS로 확인하였음. (Fig. 23, 24)

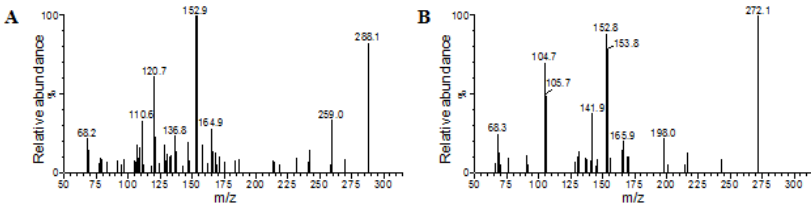
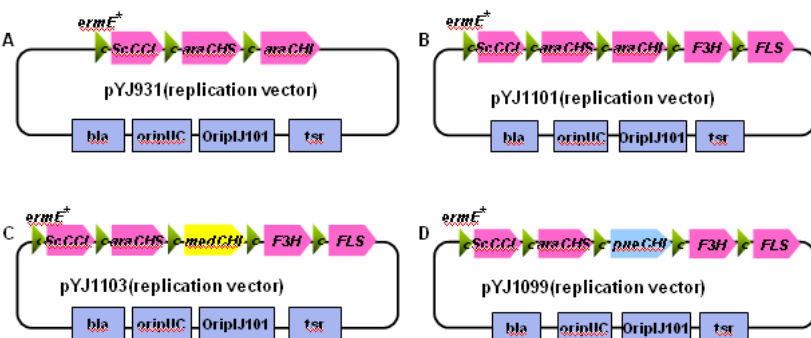


<Fig. 23> 방선균 이종숙주에서 flavonol 생산 확인  
 A and B: HPLC-ESI-MS/MS chromatogram of standard galangin and kaempferol  
 C and D: HPLC-ESI-MS/MS chromatogram of galangin and kaempferol obtained from DHS2001/pYJ861

- 식물유래 flavonol 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

- Naringenin 또는 pinocembrin의 feeding을 통해, flavonol 화합물인 kaempferol 및 galangin의 생산 성공



	<ul style="list-style-type: none"> <li>Naringenin 또는 pinocembrin의 feeding을 통해, flavonol 화합물인 kaempferol 및 galangin의 생산 성공</li> </ul>	 <p><b>&lt;Fig. 24&gt; A and B: MS/MS spectrum of galangin and kaempferol obtained from DHS2001/pYJ861</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavonol 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phenylpropanoic acid의 feeding을 통해, flavonol 화합물인 kaempferol 및 galangin의 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Phenylpropanoic acid (4-coumaric acid 또는 cinnamic acid)의 feeding을 통하여, 방선균 이종숙주에서 flavonol 생산</b></li> <li>- 이상의 결과를 통해 F3H와 FLS 유전자가 이종숙주에서 발현되는 것을 확인하였음. 1차년도에 확보한 flavanone 생합성 유전자인 <i>S. coelicolor</i> A3(2) 유래의 4-coumarate:CoA ligase (ScCCL), <i>Arabidopsis thaliana</i> 유래의 chalcone synthase (CHS), <i>A. thaliana</i> 유래의 chalcone isomerase (CHI) 유전자가 클로닝된 발현 벡터 (Fig. 25A)에 F3H와 FLS 유전자를 추가한 후 (Fig. 25B), phenylpropanoic acid (4-coumaric acid, cinnamic acid)로부터 flavonol 화합물이 생산되는지를 확인하였음.</li> <li>- 또한 <i>A. thaliana</i> CHI 이외에 추가로 합성한 2종의 <i>Medicago sativa</i>와 <i>Pueraria lobata</i> 유래의 CHI 유전자가 클로닝된 발현 벡터에도 F3H와 FLS 유전자를 추가하여 Fig. 25C 와 Fig. 25D와 같은 발현벡터를 완성하였음.</li> </ul>  <p><b>&lt;Fig. 25&gt; Phenylpropanoic acid feeding을 통한 flavonol 생산용 발현 벡터</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 완성된 발현벡터를 <i>S. venezuelae</i> DHS2001 (Fig. 5)에 형질전환하였음.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavonol 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>phenylpropanoic acid의 feeding을 통해, flavonol 화합물인 kaempferol 및 galangin의 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환된 <i>S. venezuelae</i> 들연변이주에 Fig. 26에서와 같이 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid를 feeding하면, ScCCL, CHS, CHI의 순차적인 작용에 의해 flavanone인 naringenin과 pinocembrin이 생합성되고, 이어 F3H와 FLS에 의해 flavonol인 kaempferol과 galangin이 형성될 수 있음 (Fig. 26)</li> <li>0.5 mM phenylpropanoic acid (coumaric acid 또는 cinnamic acid)를 feeding한 결과 0.2 mg/L의 kaempferol과 0.8 mg/L의 galangin이 생산됨을 확인할 수 있었음.</li> <li>다양한 종류의 CHI를 사용한 결과 생산성에 차이가 없는 관계로 이에 발효조건을 최적화를 위한 시스템으로 Fig. 25B의 발현벡터를 사용하였음.</li> <li>F3'H 유전자의 발현을 통한 quercetin 생산의 경우, F3'H 유전자의 염기서열이 밝혀지지 않은 관계로 실시되지 못하였음.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 26&gt; phenylpropanoic acid feeding을 통한 방선균 이종숙주에서 flavonol 생산 과정</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>중대형 발효조건을 이용한 발효조건 scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1L 소형발효조건에서 최적의 flavonol 생산 시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>방선균 이종 숙주에서 최적의 Flavonol (Kaempferol 또는 Galangin) 생산 시스템 구축 (1L 소형 발효조 기준)</li> <li>Flavonol의 생산 시스템을 구축하기 위하여, 1차년도에 확립한 flavanone (naringenin; pinocembrin) 생산 공정이 flavonol 1 생산에도 적합한가에 대해서 조사하였음. 1차년도에 도출된 flavanone (naringenin; pinocembrin) 생산용 발효조건은 Table 5와 같이 정리할 수 있음.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 중대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1L 소형발효조에서 최적의 flavonol 생산 시스템 구축</li> </ul>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>내용</th> <th colspan="2">비고</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>배양규모</td> <td>1 L</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>생산균주</td> <td><i>S. venezuelae</i> DHS2001</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td rowspan="8">배지</td> <td rowspan="8">Modified R2YE 배지</td> <td>Sucrose</td> <td>250g/L</td> </tr> <tr> <td>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></td> <td>0.25g/L</td> </tr> <tr> <td>MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</td> <td>10.12g/L</td> </tr> <tr> <td>Glucose</td> <td>10g/L</td> </tr> <tr> <td>Casamino acids</td> <td>0.1g/L</td> </tr> <tr> <td>Trace element solution</td> <td>2ml/L</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract</td> <td>10g/L</td> </tr> <tr> <td>TES buffer</td> <td>5.73g/L</td> </tr> <tr> <td>Inoculum size</td> <td>방선균 포자를 R2YE 배지에서 24시간 사전배양하고 이를 1%의 비로 접종</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Agitation</td> <td>240 rpm</td> <td colspan="2"></td> </tr> </tbody> </table>	항목	내용	비고		배양규모	1 L			생산균주	<i>S. venezuelae</i> DHS2001			배지	Modified R2YE 배지	Sucrose	250g/L	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25g/L	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.12g/L	Glucose	10g/L	Casamino acids	0.1g/L	Trace element solution	2ml/L	Yeast extract	10g/L	TES buffer	5.73g/L	Inoculum size	방선균 포자를 R2YE 배지에서 24시간 사전배양하고 이를 1%의 비로 접종			Agitation	240 rpm		
		항목	내용	비고																																				
배양규모	1 L																																							
생산균주	<i>S. venezuelae</i> DHS2001																																							
배지	Modified R2YE 배지	Sucrose	250g/L																																					
		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25g/L																																					
		MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.12g/L																																					
		Glucose	10g/L																																					
		Casamino acids	0.1g/L																																					
		Trace element solution	2ml/L																																					
		Yeast extract	10g/L																																					
		TES buffer	5.73g/L																																					
Inoculum size	방선균 포자를 R2YE 배지에서 24시간 사전배양하고 이를 1%의 비로 접종																																							
Agitation	240 rpm																																							
<ul style="list-style-type: none"> <li>중·대형 발효조에서의 flavanone 및 flavonol의 최적발효조건 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>50L 발효조 기준 Flavonol 생산 시스템 구축</li> </ul>	<p>&lt;Table 5&gt; 방선균 이종숙주에서 flavanone 생산의 최적화 조건</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>상기 조건에서, flavonol 화합물인 <b>kaempferol</b>이 0.2 mg/L, <b>galangin</b>이 1.0 mg/L 생산되었음. 공정 parameter인 agitation, inoculum size 등을 조정하여 추가의 최적 조건을 탐색하였으나 유의적 수준의 개선은 없었음. 이로부터 1차년도에 구축된 공정이 flavanone 뿐만 아니라 flavonol 생산 공정으로도 유효함을 확인할 수 있었음.</li> </ul>																																						
		<ul style="list-style-type: none"> <li>1차년도에 구축된 1L 소형 발효조 조건에서의 flavanone 생산량은 Table 6과 같음.</li> </ul> <table border="1"> <thead> <tr> <th>산물</th> <th>최종 생산량 (mg/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Naringenin</td> <td>4.0</td> </tr> <tr> <td>Pinocembrin</td> <td>6.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>48 시간 배양 후 4-coumaric acid와 cinnamic acid를 feeding하고 추가로 18시간을 더 배양하였을 때 flavanone의 생산성이 가장 좋았음</p> <p>&lt;Table 6&gt; 소형 발효조 최적화 조건에서 flavanone의 생산량</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>이를 바탕으로 flavanone의 대량생산 공정을 구축하였음. 대량생산공정은 50L 발효조에서 30L working volume으로 fermentation을 실시하였음.</li> </ul>	산물	최종 생산량 (mg/L)	Naringenin	4.0	Pinocembrin	6.0																																
산물	최종 생산량 (mg/L)																																							
Naringenin	4.0																																							
Pinocembrin	6.0																																							

<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 중대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>중·대형 발효조에서의 flavanone 및 flavonol의 최적발효조건 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주요 parameter로는 inoculum size, agitation, aeration, 온도, pH 측면에서 조사하였음. 결과는 Table 7과 같음. <table border="1" data-bbox="703 302 1323 526"> <thead> <tr> <th>Parameter</th> <th>최적치</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inoculum size</td> <td>2%</td> </tr> <tr> <td>Agitation</td> <td>200 rpm</td> </tr> <tr> <td>Aeration</td> <td>0.5 vvm</td> </tr> <tr> <td>온도</td> <td>30°C</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>7.2</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="751 546 1278 627"><b>&lt;Table 7&gt; 50L 발효조에서 flavanone 생산의 최적화 조건</b></p> </li> <li>- 이때 확보된 flavanone의 최종 생산량은 Table 8과 같았으며 이는 소규모 공정에서의 생산량에 비교하여 동등 이상임. <table border="1" data-bbox="671 739 1289 891"> <thead> <tr> <th>산물</th> <th>최종 생산량 (mg/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Naringenin</td> <td>4.3</td> </tr> <tr> <td>Pinocembrin</td> <td>6.5</td> </tr> <tr> <td colspan="2">총 66시간 발효</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="719 911 1235 992"><b>&lt;Table 8&gt; 최적화된 50L 발효조에서 flavanone의 생산량</b></p> </li> <li>- Scale-up된 공정을 flavonol 대량생산 공정으로도 적합한지 조사하였으며, 이를 통하여 Table 9와 같은 flavonol 생산성을 확보할 수 있었음. 이로부터 개발된 대량생산 공정이 flavanone 및 flavonol의 대량생산 공정으로 활용될 수 있음을 확인하였음. <table border="1" data-bbox="671 1243 1289 1395"> <thead> <tr> <th>산물</th> <th>최종 생산량 (mg/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Kaempferol</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Galangin</td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td colspan="2">총 66시간 발효</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="719 1415 1235 1496"><b>&lt;Table 9&gt; 최적화된 50L 발효조에서 flavonol의 생산량</b></p> </li> </ul>	Parameter	최적치	Inoculum size	2%	Agitation	200 rpm	Aeration	0.5 vvm	온도	30°C	pH	7.2	산물	최종 생산량 (mg/L)	Naringenin	4.3	Pinocembrin	6.5	총 66시간 발효		산물	최종 생산량 (mg/L)	Kaempferol	0.5	Galangin	1.4	총 66시간 발효	
Parameter	최적치																													
Inoculum size	2%																													
Agitation	200 rpm																													
Aeration	0.5 vvm																													
온도	30°C																													
pH	7.2																													
산물	최종 생산량 (mg/L)																													
Naringenin	4.3																													
Pinocembrin	6.5																													
총 66시간 발효																														
산물	최종 생산량 (mg/L)																													
Kaempferol	0.5																													
Galangin	1.4																													
총 66시간 발효																														
	<ul style="list-style-type: none"> <li>1L 발효조에서 저가의 배지 조성을 선별</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 다양한 탄소원과 질소원을 바탕으로 Flavonoid 생산을 위한 저가 배지 탐색</li> <li>- 이어서 산업적 생산에 적합한 저비용 산업용 배지를 선별하고자 하였음. 이 때 기본배지로는 1차년도에 개발된 modified R2YE 배지 (Table 4)를 사용하였음.</li> <li>저가 배지 탐색은 탄소원과 질소원에 대하여 실시되었으며, screening 실험은 1L-규모에서 먼저 수행하였음. 탄소원으로는 molasses, rice bran, wheat bran, saw dust, corn cobs가 기본 배지의 sucrose 및 glucose를 대신하여 조사되었음.</li> <li>- 또한, 질소원으로는 corn steep liquor, soybean meal, brewery yeast, fish meal extract가 조사되었음.</li> </ul>																												

<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 중대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1L 발효조에서 저가의 배지 조성을 선별</li> </ul>	<p>- 이에 대하여 corn meal extract, yellow corn meal extract, oat meal extract, peanut meal extract, fish meal extract가 저가 탄소/질소원으로 조사되었음. 조사 결과는 Table 10과 같음.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">탄소원</th> <th colspan="2">최종 생산량 (mg/L)</th> </tr> <tr> <th>Naringenin</th> <th>Pinocembrin</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>기본배지</td> <td>4</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>2% Molasses</td> <td>4.2</td> <td>6.3</td> </tr> <tr> <td>2% Rice bran</td> <td>2.1</td> <td>3.2</td> </tr> <tr> <td>2% Wheat bran</td> <td>2.7</td> <td>4.1</td> </tr> <tr> <td>2% Saw dust</td> <td>1.9</td> <td>2.9</td> </tr> <tr> <td>2% Corn cobs</td> <td>2.5</td> <td>3.7</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">질소원</th> <th colspan="2">최종 생산량 (mg/L)</th> </tr> <tr> <th>Naringenin</th> <th>Pinocembrin</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>기본배지</td> <td>4</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>2% Corn-steep liquor</td> <td>4.4</td> <td>6.6</td> </tr> <tr> <td>2% Soybean meal</td> <td>3.2</td> <td>4.8</td> </tr> <tr> <td>2% Brewery yeast</td> <td>4.1</td> <td>6.1</td> </tr> <tr> <td>2% Fish meal extract</td> <td>4.4</td> <td>6.6</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">탄소/질소원</th> <th colspan="2">최종 생산량 (mg/L)</th> </tr> <tr> <th>Naringenin</th> <th>Pinocembrin</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>기본배지</td> <td>4</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>2% Corn meal extract</td> <td>4.3</td> <td>6.4</td> </tr> <tr> <td>2% Oat meal extract</td> <td>3.7</td> <td>5.6</td> </tr> <tr> <td>2% Peanut meal extract</td> <td>4.3</td> <td>6.4</td> </tr> <tr> <td>2% Fish meal extract</td> <td>4.4</td> <td>6.6</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Table 10&gt; 탄소원과 질소원에 따른 1L 발효조에서 Flavanone의 생산성</b></p> <p>- 이상의 결과로 최적 저가 탄소원으로는 molasses이었고, 최적 질소원으로는 corn-steep liquor와 fish meal extract였음. 또한 탄소/질소의 공동원으로는 corn meal extract도 적합하였으며 fish meal extract가 최적이었음.</p>	탄소원	최종 생산량 (mg/L)		Naringenin	Pinocembrin	기본배지	4	6	2% Molasses	4.2	6.3	2% Rice bran	2.1	3.2	2% Wheat bran	2.7	4.1	2% Saw dust	1.9	2.9	2% Corn cobs	2.5	3.7	질소원	최종 생산량 (mg/L)		Naringenin	Pinocembrin	기본배지	4	6	2% Corn-steep liquor	4.4	6.6	2% Soybean meal	3.2	4.8	2% Brewery yeast	4.1	6.1	2% Fish meal extract	4.4	6.6	탄소/질소원	최종 생산량 (mg/L)		Naringenin	Pinocembrin	기본배지	4	6	2% Corn meal extract	4.3	6.4	2% Oat meal extract	3.7	5.6	2% Peanut meal extract	4.3	6.4	2% Fish meal extract	4.4	6.6
	탄소원	최종 생산량 (mg/L)																																																															
Naringenin		Pinocembrin																																																															
기본배지	4	6																																																															
2% Molasses	4.2	6.3																																																															
2% Rice bran	2.1	3.2																																																															
2% Wheat bran	2.7	4.1																																																															
2% Saw dust	1.9	2.9																																																															
2% Corn cobs	2.5	3.7																																																															
질소원	최종 생산량 (mg/L)																																																																
	Naringenin	Pinocembrin																																																															
기본배지	4	6																																																															
2% Corn-steep liquor	4.4	6.6																																																															
2% Soybean meal	3.2	4.8																																																															
2% Brewery yeast	4.1	6.1																																																															
2% Fish meal extract	4.4	6.6																																																															
탄소/질소원	최종 생산량 (mg/L)																																																																
	Naringenin	Pinocembrin																																																															
기본배지	4	6																																																															
2% Corn meal extract	4.3	6.4																																																															
2% Oat meal extract	3.7	5.6																																																															
2% Peanut meal extract	4.3	6.4																																																															
2% Fish meal extract	4.4	6.6																																																															
<ul style="list-style-type: none"> <li>저가의 배지 조성을 선별하여 50L 발효조에 적용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>최종 저가 배지 조성으로 molasses와 fish meal extract가 포함된 배지를 선정</li> <li>- 이상의 결과를 바탕으로, molasses와 Fish meal extract를 최종 탄소원 및 질소원으로 각각 선정하고 이것들의 최적 첨가량을 조사하였으며 그 결과는 Table 11과 같음.</li> </ul>																																																																

합량(%)		최종 생산량 (mg/L)	
Molasses	Fish meal extract	Naringenin	Pinocembrin
기본배지		4	6
1	1	4.2	6.5
2	1	4.3	6.6
3	1	4.2	6.5
1	1.5	4.3	6.4
2	1.5	4.4	6.6
3	1.5	4.4	6.5
1	2	4.3	6.5
2	2	4.4	6.6
3	2	4.4	6.5

<Table 11> 최종 저가 배지 조성에서 최적의 첨가량 조사

- 상기 결과에서 확인할 수 있듯이, 유의적 수준의 차이가 없어 최종 탄소원으로는 2% molasses, 질소원으로는 1% fish meal extract로 결정하였음. 이에 따른 최종 배지 조성은 Table 12와 같음. 미량 원소의 추가 및 생략도 시도 가능하겠으나 원료 (raw materials)의 질적 변동이 있을 수 있어 이에 대한 시도는 수행하지 않았음.

성분	합량
TES buffer	5.73 g/L
Trace element solution	2 ml/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g/L
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.12 g/L
Casamino acids	0.1 g/L
Molasses	2%
Fish meal extract	1%

<Table 12> 최종 선정된 저가 배지의 조성

- 이와 같이 1L 발효에서 결정된 저가 산업용 배지를 앞에서 구축한 대량생산 공정에 적용해 보았으며, 1L 발효에서와 유사한 결과를 얻을 수 있었음. 결론적으로 상기 산업용 배지를 이용한 50L 배양기에서 30L working volume으로 fermentation을 실시하였을 시에 총 66시간 발효를 통하여 flavanone의 경우 4.4 mg/L naringenin과 6.6 mg/L pinocembrin이 생산되었으며, flavonol의 경우 0.6 mg/L kaempferol과 2.0 mg/L galangin 생산성을 확보할 수 있었음.

식물유래 중대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up

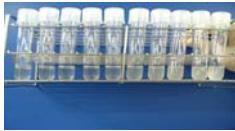
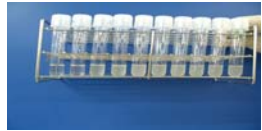

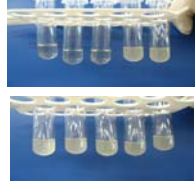


저가의 배지 조성을 선별하여 50L 발효조에 적용

<p>▪ 확보된 flavanone 화합물의 <i>in vitro</i> 항균 활성 검증</p>	<p>▪ 수산 양식 어류의 질병과 관련이 높은 model strain 선별 및 항균 활성 측정</p>	<p>▪ 수산 양식과 관련이 높은 model strain 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 군산대학교 수산생명의학과 박관하 교수 (약리독성학)의 자문을 바탕으로, 수산 양식과 관련이 높은 균으로 <i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC 700183), <i>Edwardsiella tarda</i>와 <i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC 49156)을 model strain으로 선발하였음.</li> <li>- <i>Aeromonas hydrophila</i>는 극성 편모를 가진 gram-negative bacteria로서, 따뜻한 기후 지역에서 주로 발견됨. 이 세균은 주로 담수어, 파충류, 양서류 등에서 에로모나스병을 일으키는 균으로 오랫동안 인식되어 왔으나, 인체를 감염시켜 급성 위장염, 패혈증 등의 질병을 일으키기도 함. 치어나 성체를 포함한 어류의 집단 폐사 발생 시 원인이 되는 균이며, 진피 궤양, 복수, 여러 장기에 피사를 일으키는 등 어류에 상당히 치명적이므로 수산 양식에 있어서 본 균의 통제가 필수적으로 여겨짐.</li> <li>- <i>Edwardsiella tarda</i> 역시 gram-negative bacteria로, 어류의 복부가 팽만하여 탈장을 특징으로 하는 세균성 질병인 에드워드 병의 원인균임. 어류의 연령과 관계없이 연중 발생하나 주로 수온이 상승한 여름철에 현저함.</li> <li>- <i>Lactococcus garvieae</i>는 연쇄 구균증 (사육수나 생사료를 통해 전염되어 주로 여름부터 가을에 걸쳐 다발하는 질병)의 원인 균으로서, 많은 종류의 해산 어류를 감염시켜 안구가 돌출되거나 아가미 뚜껑이 붉게 변하는 특징을 나타내는 gram-positive bacteria임.</li> <li>- 본 연구에 사용한 균주들은 표준 균주로서 독성이나 감염성이 없는 균주이며, 군산대학교 수산생명의학과 박관하 교수로부터 제공받았음.</li> </ul> <p>▪ 선별된 model strain에 대한 flavanone 화합물의 항균 활성 측정 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 위와 같이 선별된 bacteria strain들에 대한 확보된 flavanone 화합물 (naringenin, pinocembrin)의 항균활성을 MIC (minimum inhibitory concentration; 최소저해농도) 측정을 통하여 조사하였음.</li> <li>- MIC를 측정하는 방법으로는 몇 가지가 통용되고 있으나, 가장 일반적이라 할 수 있는 "시험관 희석법"을 실시하였음. 시험관 희석법은 항균제 stock을 serial dilution해서 높은 농도부터 낮은 농도까지 포함되도록 액체배지를 준비한 후, 각 시험관에서 충분한 성장 저해가 일어나도록 유도함.</li> </ul>
--	--	---

확보된 flavanone 화합물의 *in vitro* 항균 활성 검증

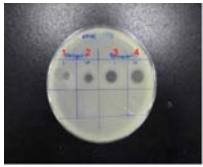


수산 양식 어류의 질병과 관련이 높은 model strain 선별 및 항균 활성 측정

- 성장저해가 발생하여 투명한 상태로 남아있는 시험관 중 가장 낮은 농도의 항균제를 포함한 시험관에서의 항균제 농도를 MIC 값으로 선정하였음 [Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48, Suppl. S1: 5-16]. 그 결과는 Fig. 27과 같음.

Strain		MICs (µg/mL)		Comment
		Flavanone		
		Pinocembrin	Naringenin	
Gram positive	<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC49156)	< 32 <sup>ⓐ</sup>	< 128 <sup>ⓐ</sup>	연쇄구균종의 원인균
Gram negative	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC700183)	< 128 <sup>ⓐ</sup>	< 128 <sup>ⓐ</sup>	에르모나스병의 원인균
	<i>Edwardsiella tarda</i>	< 128 <sup>ⓐ</sup>	< 96 <sup>ⓐ</sup>	에드워드병의 원인균
관련결과 ㉑			관련결과 ㉒	
관련결과 ㉓			관련결과 ㉔	
관련결과 ㉕			관련결과 ㉖	

<Fig. 27> MIC assay를 통한 flavanone 화합물의 *in vitro* 항균 활성

- 항균활성을 추가로 확인하기 위해 agar plate에서의 spot assay도 함께 실시하였음. 그 결과는 다음과 같음 (Fig. 28).

Strain	Spot assay result	비고
<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC 49156)		각 균주를 agar plate에 도말하여 배양한 후 1 및 2에는 naringenin을, 3 및 4에는 pinicembrin을 spotting하여 clear zone 형성 유무를 관찰함.
<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC 700183)		
<i>Edwardsiella tarda</i>		

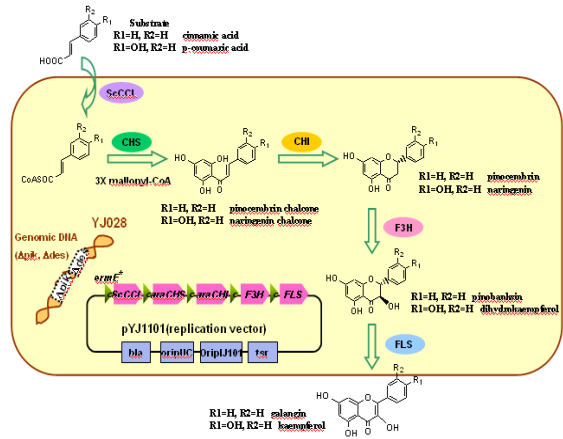
<Fig. 28> Spot assay를 통한 flavanone 화합물의 *in vitro* 항균 활성



▪ **Flavonol 화합물의 이중숙주 생산 시스템 확립**

- Flavanone 생합성 유전자 (ScCCCL, C HS, CHI)에 flavonol 생합성 유전자 (F3H, FLS)를 추가한 발현벡터 제작 및 이중숙주인 *S. venezuelae*에 형질전환.

- 0.5mM phenylpropanoic acid인 4-co umaric acid와 cinnamic acid를 첨가한 결과, 이중숙주로부터 0.2 mg/L의 kaempferol과 0.8 mg/L의 galangin 생산



▪ **50L 발효조에서 최적화된 발효 조건**

성분	함량
TES buffer	5.73 g/L
Trace element solution	2 ml/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g/L
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.12 g/L
Casamino acids	0.1 g/L
Molasses	2%
Fish meal extract	1%

▪ 2차년도 연구 요약

▪ **최적화된 50L 발효 조건에서 생산된 flavonoid 계열 화합물의 생산량**

산물	최종 생산량 (mg/L)
Naringenin	4.4
Pinocembrin	6.6
Kaempferol	0.6
Galangin	2.0
총 66시간 발효	

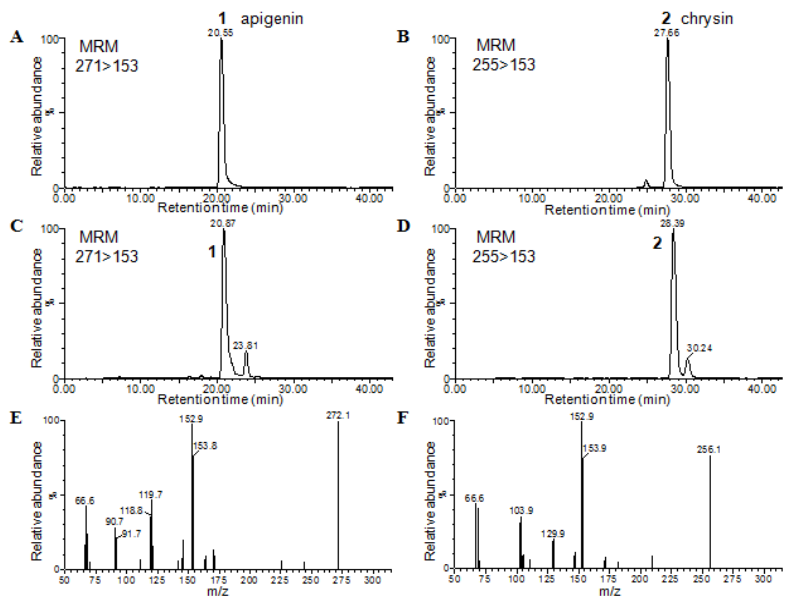
▪ **Flavanone 화합물의 in vitro 항균 활성 결과**

Strain		MICs (µg/mL)		Comment
		Flavanone		
		Pinocembrin	Naringenin	
Gram positive	<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC49156)	< 32 <sup>Ⓢ</sup>	< 128 <sup>Ⓢ</sup>	연쇄구균종의 원인균
Gram negative	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC700183)	< 128 <sup>Ⓢ</sup>	< 128 <sup>Ⓢ</sup>	에로모나스병의 원인균
	<i>Edwardsiella tarda</i>	< 128 <sup>Ⓢ</sup>	< 96 <sup>Ⓢ</sup>	에드워드병의 원인균

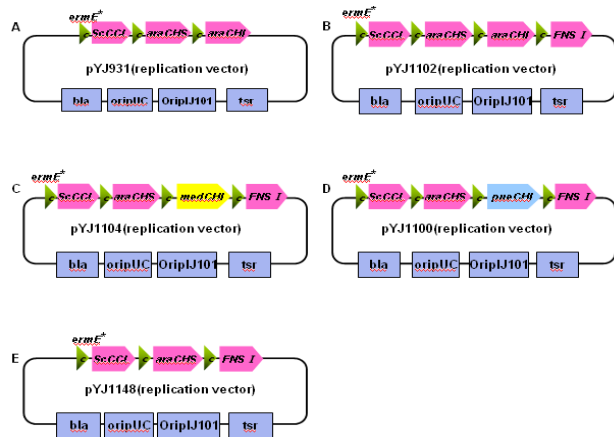
\* 이중숙주에서 생산된 pinocembrin은 연쇄구균증을 일으키는 *L. garvieae*에 대해 높은 활성을 보이며, naringenin은 에드워드병의 원인균인 *Edwardsiella tarda*에 대해 비교적 높은 활성을 보였음. 결과적으로 flavanone 화합물이 산업적 활용에 충분한 정도의 항균활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었음.

### 제 3 절 3차년도 연구개발수행 내용 및 결과

연구 내용	연구결과	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)
<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavone synthase I (FNS I) 유전자의 발현 벡터 제작 및 형질 전환</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Flavone synthase I (FNS I) 유전자의 합성 및 발현 벡터 제작</b></li> <li>- <i>Petroselinum plant</i> 유래의 Flavone synthase I (FNS I, GenBank accession no. AY230247) 유전자를 이종숙주인 <i>Streptomyces venezuelae</i>의 codon-preference (Table 4)를 고려하여 합성함.</li> <li>- High-copy이며, 강력한 promoter인 <i>ermE*</i> promoter를 가지는 <i>E. coli-Streptomyces</i> shuttle vector인 pYJ34에 클로닝하여 Fig. 29와 같은 발현 벡터 (pYJ858)를 제작함. 벡터 pYJ34는 1차년도에 flavanone의 생산을 위해 사용된 발현 벡터임.</li> <li>- 완성된 발현 벡터를 1차 년도에 이종숙주로 개발한 <i>S. venezuelae</i> DHS2001 (Fig. 5)에 형질 전환하였음.</li> </ul> <div data-bbox="1045 689 1404 846" style="text-align: center;"> </div> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 29&gt; Flavone 생합성 유전자 발현 벡터</b></p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Naringenin 또는 pinocembrin의 feeding을 통해, flavone 화합물인 apigenin 및 chrysin의 생산 성공</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Flavanone (Naringenin 또는 Pinocembrin)의 feeding을 통하여, 방선균 이종숙주에서 flavone 생산</b></li> <li>- 형질전환된 <i>S. venezuelae</i> 돌연변이주 (DHS2001/pYJ858)에 Fig. 30에서와 같이 naringenin 또는 pinocembrin을 feeding하면, FNS I에 의해 flavone인 apigenin과 chrysin을 형성함.</li> </ul> <div data-bbox="678 1411 1388 1915" style="text-align: center;"> </div> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 30&gt; Pinocembrin 또는 naringenin의 feeding을 통한 flavone 생합성 과정</b></p>

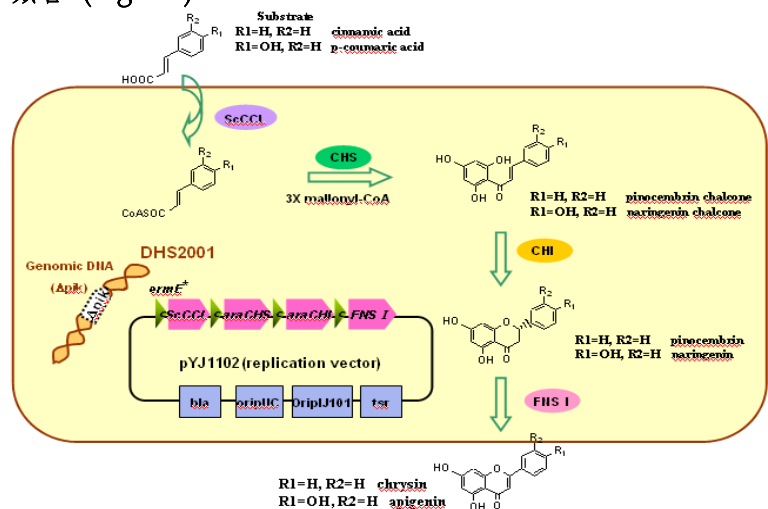
<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Naringenin 또는 pinocembrin의 feeding을 통해, flavone 화합물인 apigenin 및 chrysin의 생산 성공</li> </ul>	<p>- 본 연구에서는 0.5 mM naringenin 및 pinocembrin을 feeding하여, FNS I의 작용을 통해 flavone 화합물인 5.2 mg/L apigenin 및 4.7mg/L chrysin이 생산되는 것을 LC/ESI-MS/MS로 확인하였음. (Fig. 31)</p>  <p><b>&lt;Fig. 31&gt; 방선균 이종숙주에서 flavone 생산 확인</b>  <b>A and B: HPLC-ESI-MS/MS chromatogram of standard apigenin and chrysin</b>  <b>C and D: HPLC-ESI-MS/MS chromatogram of apigenin and chrysin obtained from <i>S. venezuelae</i> DHS2001/pYJ858</b>  <b>E and F: MS/MS spectrum of apigenin and chrysin obtained from <i>S. venezuelae</i> DHS2001/pYJ858</b></p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phenylpropanoic acid의 feeding을 통해, flavone 화합물인 apigenin 및 chrysin의 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phenylpropanoic acid (4-coumaric acid 또는 cinnamic acid)의 feeding을 통하여, 방선균 이종숙주에서 flavone 생산</li> </ul> <p>-이상의 결과를 통해 FNS I 유전자가 이종숙주에서 문제없이 발현되는 것을 확인할 수 있었음. 이에 1차년도에 확보한 flavanone 생합성 유전자인 <i>S. coelicolor</i> A3(2) 유래의 4-coumarate:CoA ligase (ScCCL), <i>Arabidopsis thaliana</i> 유래의 chalcone synthase (CHS), <i>A. thaliana</i> 유래의 chalcone isomerase (CHI) 유전자가 클로닝된 발현 벡터 (Fig. 32A)에 FNS I 유전자를 추가한 후 (Fig. 32B), phenylpropanoic acid (4-coumaric acid, cinnamic acid)로부터 flavone 화합물이 생산되는지를 확인하였음.</p>

- *A. thaliana* CHI 이외에 추가로 합성한 2종의 *Medicago sativa*와 *Pueraria lobata* 유래의 CHI 유전자가 클로닝된 발현 벡터에도 FNS I 유전자를 추가하여 Fig. 32C 와 Fig. 32D 와 같은 발현벡터를 완성하였음. 또한 1, 2차년도 연구 결과에 따르면 CHI를 추가하였을 경우, flavanone의 생산성의 감소하는 경향이 있는 바, 이에 CHI가 제거된 발현 벡터도 추가로 제작하였음. (Fig. 32E)



**<Fig. 32> phenylpropanoic acid feeding을 통한 flavone 생산 발현 벡터**

- 완성된 발현벡터를 *S. venezuelae* DHS2001 (Fig. 5)에 형질전환하였음. 형질전환된 *S. venezuelae* 돌연변이주에 Fig. 33에서와 같이 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid를 feeding하면, ScCCL, CHS, CHI의 순차적인 작용에 의해 flavanone인 naringenin과 pinocembrin이 생합성되고, 이어 FNS I에 의해 flavone인 apigenin과 chrysin이 형성될 수 있음 (Fig. 33)

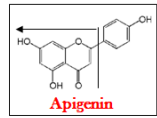


**<Fig. 33> phenylpropanoic acid feeding을 통한 방선균 이종숙주에서 flavone 생산 과정**

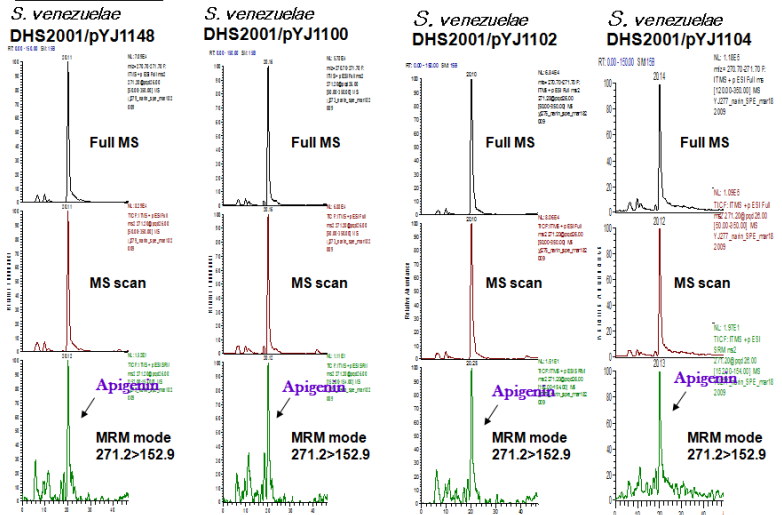
식물유래 flavone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

Phenylpropanoic acid의 feeding을 통해, flavone 화합물인 apigenin 및 chrysin의 생산

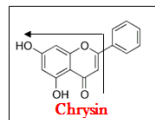
- 그 결과, 그림 Fig. 34 및 35에서와 같이, CHI의 종류에 상관없이 비슷한 양의 flavone이 생산됨을 확인하였음.(5.1 mg/L apigenin 및 4.5 mg/L chrysin 생산)



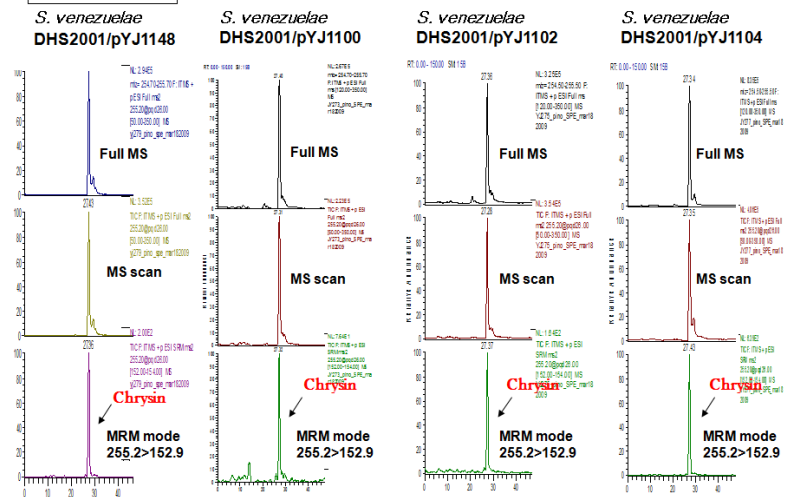
**0.5 mM coumaric acid feeding**



**<Fig. 34> 방선균 이종숙주 DHS2001/pYJ1100, DHS2001/pYJ1102, DHS2001/pYJ1104, DHS2001/pYJ1148에서 apigenin 생산 확인**



**0.5 mM cinnamic acid feeding**



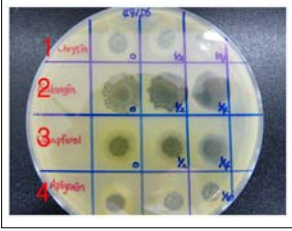
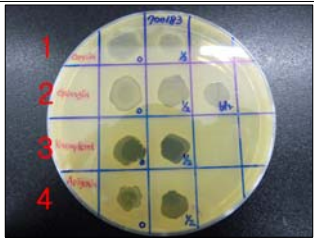
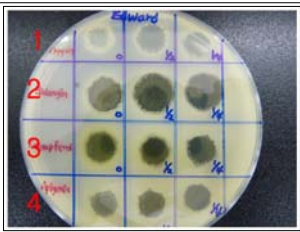
**<Fig. 35> 방선균 이종숙주 DHS2001/pYJ1100, DHS2001/pYJ1102, DHS2001/pYJ1104, DHS2001/pYJ1148에서 chrysin 생산 확인**

■ 식물유래 flavone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축

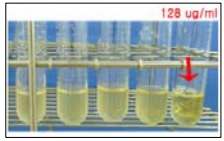
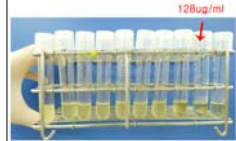
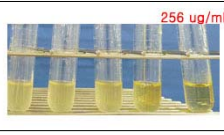

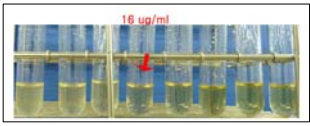
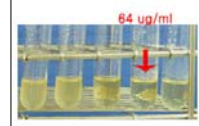
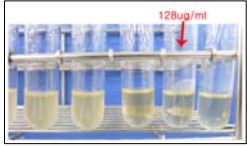
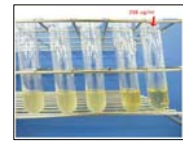
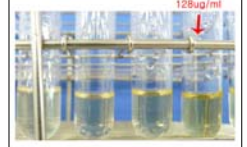
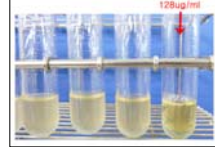
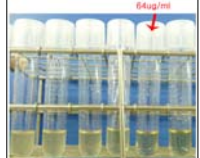
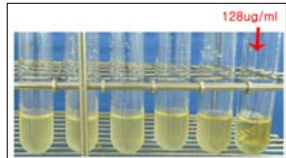
■ Phenylpropanoic acid의 feeding을 통해, flavone 화합물인 apigenin 및 chrysin의 생산

<ul style="list-style-type: none"> <li>식물유래 flavone 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phenylpropanoic acid의 feeding을 통해, flavone 화합물인 apigenin 및 chrysin의 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>또한 최종 생산량에 있어서 FNS I 유전자만 발현하고 flavanone을 feeding한 사례 (5.2 mg/L apigenin 및 4.7 mg/L chrysin 생산)와 비교하였을 때, 생산성이 크게 감소되지 않았음. 이를 통해 추가된 유전자들이 방선균 이종숙주에서 잘 발현되고 있음을 예측할 수 있음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavonoid 화합물의 분리공정 최적화 및 scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavonoid의 분리 정제 공정 구축 및 scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Flavonoid 화합물의 분리 및 정제</b></li> <li>이종 숙주에서 생산된 flavonoid 화합물의 순수분리를 위하여, 용매 추출 및 chromatography에 기반한 분리 정제 공정을 구축하였음.</li> <li>개별 flavonoid에 따라 세부 사항에서는 적은 차이가 있지만 기본적으로 Fig. 36과 같이 3 단계로 구성됨.</li> </ul> <div data-bbox="734 851 1308 1489" style="text-align: center;"> <pre> graph TD     subgraph Stage1 [단계 1]         A[Ethanol extraction (70-90%; 60-80°C; 3-6 hr)] --&gt; B[Filtration]         B --&gt; C[Ethanol Evaporation]     end     subgraph Stage2 [단계 2]         D[Chromatography (AB-8 resin; 90% ethanol elution)] --&gt; E[Concentration]     end     subgraph Stage3 [단계 3]         F[Reverse Phase Chromatography (C18)] --&gt; G[Concentration (Evaporation)]     end     C --&gt; D     E --&gt; F   </pre> </div> <p style="text-align: center;"><b>&lt;Fig. 36&gt; Flavonoid 분리 정제 공정</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>상기 정제 공정을 통하여 최종적으로 90% 이상의 순도 (HPLC 분석)를 갖는 순수 flavonoid를 얻을 수 있었음. 그 결과는 Fig. 37과 같음.</li> <li>참고로, 2단계 분리 정제에서 가장 많이 제거되는 성분은 탄수화물성분이었음.</li> <li>상기 분리 정제 공정은, 추출 공정은 그대로 유지하고 chromatography용 column을 크게 제작하여 적용하는 단순한 방식으로 50L 규모의 배양액까지도 적용 가능하였음. 이러한 scale-up에서 특별한 성능 저하는 발견되지 않았음.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavonoid 화합물의 분리공정 최적화 및 scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavonoid의 분리 정제 공정 구축 및 scale-up</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>항균력 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vitro</i> 항균력 시험</li> </ul>	<p><b>&lt;Fig. 37&gt; HPLC chromatogram of purified flavonoids</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>본 연구에서 확보한 flavonoid 화합물의 <i>in vitro</i> 항균활성 확인</li> <li>2차년도에 개발된 flavonols (galangin과 kaempferol) 및 3차년도에 추가로 개발된 flavones (apigenin과 chrysin)에 대하여, CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)와 항생제 내성균주은행 (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)의 protocol (National Committee for Clinical Laboratory Standard, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically-5th edition, 2000)을 참조하여 변형한 agar spot assay (agar overlay method; overaly spot method)을 통하여 항균력 시험을 수행하였음. 그 결과는 Fig. 38과 같음.</li> </ul>

		Strain	Spot assay result
		<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC49156)	
		<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC700183)	
		<i>Edwardsiella tarda</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>항균력 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vitro</i> 항균력 시험</li> </ul>	<p>각 균주를 agar plate에 도말하여 배양한 후 1열에는 chrysin을, 2열에는 galangin을 3열에는 kaempferol을, 4열에는 apigenin을 spotting하여 clear zone 형성 유무를 관찰함</p>	
<p><b>&lt;Fig. 38&gt; Agar spot assay of flavonoids</b></p>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기 결과는 CLSI와 항생제내성균주은행의 protocol을 참조하여 이를 변형한 turbidity reduction assay (liquid culture method)을 통하여서도 재확인되었음 (Fig. 39). 상기와 같이 liquid culture method에서도 growth inhibition을 확인할 수 있었음. 따라서, 2차년도에 개발된 galangin과 kaempferol 및 3차년도에 추가 개발된 apigenin과 chrysin도 <i>Lactococcus garvieae</i>, <i>Aeromonas hydrophila</i>, <i>Edwardsiella tarda</i>에 대하여 항균활성을 가짐을 확인할 수 있었음.</li> <li>- 그 다음으로, MIC 조사가 이루어지지 않았던 flavonol과 flavone에 대하여 "Determination of minimum inhibitory concentrations (Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001; 48, Suppl. S1: 5-16)"을 참조하여 MIC (minimum inhibitory concentration, 최소저해농도)를 조사했음. 그 결과는 Table 13과 같음.</li> </ul>			



Strain		MICs (µg/mL)				Comment
		Flavonol		Flavone		
		Kaempferol	Galangin	Apigenin	Chrysin	
Gram positive	<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC49156)	< 128 <sup>a</sup>	< 128 <sup>b</sup>	< 128 <sup>c</sup>	< 256 <sup>d</sup>	연쇄구균종의 원인균
Gram negative	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC700183)	< 256 <sup>e</sup>	< 128 <sup>d</sup>	< 128 <sup>e</sup>	< 128 <sup>f</sup>	에로모나스병의 원인균
	<i>Edwardsiella tarda</i>	< 16 <sup>e</sup>	< 64 <sup>f</sup>	< 64 <sup>g</sup>	< 128 <sup>f</sup>	에드워드병의 원인균
관련결과 a		관련결과 b				
관련결과 c		관련결과 d				
관련결과 e		관련결과 f				
관련결과 g		관련결과 h				
관련결과 i		관련결과 j				
관련결과 k		관련결과 l				

<Fig. 39> Turbidity reduction assay of flavonoids

<ul style="list-style-type: none"> <li>항균력 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vitro</i> 항균력 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>향후의 실제 제품화를 고려하여 최종 정제 산물을 포함하여 각 단계별의 분리 정제 산물에 대해서도 MIC 조사를 실시하였음. 본 실험에서는 지금까지 개발된 모든 flavonoid에 대하여 실시하였음.</li> </ul>
--	--	--

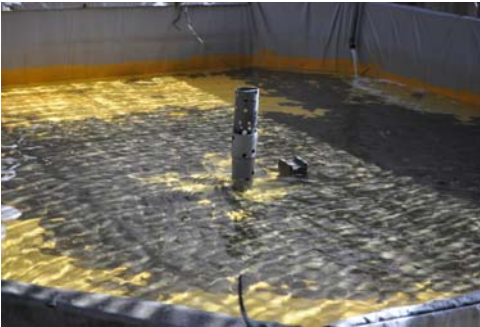
시험 물질	Strain	MICs (µg/mL)					
		Flavanone		Flavonol		Flavone	
		Naringenin	Pinocembrin	Kaempferol	Galangin	Apigenin	Chrysin
1단계 정제 산물	<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC49156)	< 128	< 32	< 256	< 128	< 256	< 256
	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC700183)	< 128	< 128	< 256	< 256	< 256	< 256
	<i>Edwardsiella tarda</i>	< 96	< 128	< 64	< 128	< 128	< 256
2단계 정제 산물	<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC49156)	< 64	< 32	< 128	< 128	< 128	< 256
	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC700183)	< 64	< 64	< 256	< 128	< 128	< 128
	<i>Edwardsiella tarda</i>	< 64	< 64	< 16	< 64	< 64	< 128
3단계 정제 산물	<i>Lactococcus garvieae</i> (ATCC49156)	< 64	< 32	< 128	< 128	< 128	< 256
	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC700183)	< 64	< 64	< 256	< 128	< 128	< 128
	<i>Edwardsiella tarda</i>	< 64	< 64	< 16	< 64	< 64	< 128

<Table 13> MIC assay of flavonoids

<ul style="list-style-type: none"> <li>항균력 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vitro</i> 항균력 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대체로 2단계 정제를 거친 정제 산물의 경우, 천연 항생 대체물질로서는 양호한 MIC를 가짐을 확인할 수 있었음.</li> <li>- 참고사항으로, 본 과제에서 개발된 flavonoid를 수산 양식에서 일반적으로 상용되는 항생제들과 비교하면 Table 14와 같음. 천연 항생제 대체물질임을 고려할 때 양호한 수준의 MIC 값을 가짐을 확인할 수 있음.</li> </ul>
--	--	---

Strain	MICs (µg/mL)					
	Flavonoid					
	Flavanone		Flavonol		Flavone	
<i>Edwardsiella tarda</i>	Naringenin	Pinocembrin	Kaempferol	Galangin	Apigenin	Chrysin
	< 64	< 64	< 16	< 64	< 64	< 128
	Antibiotics					
	Ciprofloxacin		Sulfamethoxazole		Polymyxin B	
	< 0.1		< 64		< 256	

<Table 14> 상용항생제와 flavonoid의 MIC value 비교

<p>▪ 공격접종 시험</p>	<p>▪ 공격접종시험</p>	<p>▪ <b>본 연구에서 확보한 flavonoid 화합물의 공격접종 시험</b></p> <p>- 지금까지의 확보된 flavonoid의 특성 (solubility, <i>in vitro</i> 항균력, 생산능, 분리정제능)을 고려하여 naringenin과 kaempferol을 최종 대상 flavonoid로 선정하였으며 이를 시험물질로 하여 넙치 (치어) 대상 공격접종시험 및 하기 현장적용시험을 실시하였음. 시험 시 naringenin과 kaempferol은 동량 동시 적용하였음. 시험의 대상 세균은 <i>Edwardsiella tarda</i>로 선정하였음 (10<sup>3</sup> cfu/ml이 되게 균 농축액을 수조에 투여하는 방식으로 공격접종을 실시했으며 1일 1회로 총 3회 실시). 시험에서는 배양액 자체의 단순 추출물 및 2단계 분리정제 산물을 이용하여 이를 사료에 미리 혼합한 후 급이하는 방식으로 공격접종시험을 실시하였음. 순치 2주 후부터 차이를 둔 사료급이를 시작하였으며 공격접종은 사료 급이 3일째에 실시하였음. 그 후 10일 동안 폐사 정도를 조사하였음. 폐사된 개체는 발견 시에 즉시 꺼내 주었음. 시험 결과는 Table 15와 같음 (실제 시험군은 다양한 배합비를 적용했으며 그 중 대표성을 갖는 시험군 결과만 제시함).</p> <table border="1" data-bbox="632 1003 1401 1261"> <thead> <tr> <th>시험군</th> <th>폐사 개체수/시험 개체수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>대조군 (Only 사료)</td> <td>38/50</td> </tr> <tr> <td>시험군 1 (배양액 +사료 혼합)</td> <td>23/50</td> </tr> <tr> <td>시험군 2 (2 단계 정제산물 +사료 혼합)</td> <td>4/50</td> </tr> </tbody> </table> <p>&lt;Table 15&gt; 공격접종 시험 결과</p> <p>- 상기 결과로부터 naringenin과 kaempferol은 사료첨가용 천연항생제 대체물질로 유용하다 할 수 있음.</p>	시험군	폐사 개체수/시험 개체수	대조군 (Only 사료)	38/50	시험군 1 (배양액 +사료 혼합)	23/50	시험군 2 (2 단계 정제산물 +사료 혼합)	4/50
시험군	폐사 개체수/시험 개체수									
대조군 (Only 사료)	38/50									
시험군 1 (배양액 +사료 혼합)	23/50									
시험군 2 (2 단계 정제산물 +사료 혼합)	4/50									
<p>▪ 현장적용 시험</p>	<p>▪ 현장적용시험</p>	<p>▪ <b>본 연구에서 확보한 flavonoid 화합물의 현장적용 시험</b></p> <p>- 넙치를 대상으로 배양액 자체의 단순 추출물 및 2차 분리정제 산물을 이용하여 공격접종시험에서와 유사한 사료 급이 방식으로 제주도 A 양식장 (Fig. 40)에서 현장적용시험을 실시하였음. 단, 균의 공격 접종은 적용하지 않음.</p>  <p>&lt;Figure 40&gt; 제주도 A 양식장</p>								

- 실험에 사용된 넙치는 치어였으며, 실험어는 실험개시 전, 평균 전장 8.95±1.14 cm, 체중 8.4±2.74 g이었음. 실험어는 각 300 마리씩이었으며 7일간 순치시킨 다음 사용하였음. 실험용 사료는 시판의 넙치용 배합사료에 추출물 또는 분리정제 산물을 대략 5% 첨가하여 혼합 제조하여 사용하였음. 일간 사료 투여량은 어체중의 1.0%를 3회/일 공급하면서 16주 간 투여하였음. 추출물 또는 분리정제 산물을 첨가하지 않은 사료를 같은 방법으로 투여한 군을 대조군으로 하였음. 매 4주 간격으로 체중 및 전장을 측정. 사양시험 성적은 Table 16과 같음.

■ 현장적용 시험

■ 현장적용시험

구분	평균 전장 (cm)		성장률 (%)	상대 성장률 (%)
	시작 시점	종료 시점		
대조군	8.99±1.11	15.92±1.74	177	100.0
시험군 1 (배양액 + 사료 혼합)	8.93±1.12	15.93±1.61	178	100.6
시험군 2 (2 단계 정제산물 + 사료 혼합)	8.91±1.22	16.64±1.65	186	105.0

구분	평균 체중 (g)		성장률 (%)	상대 성장률 (%)
	시작 시점	종료 시점		
대조군	8.70±2.57	50.45±13.7	579	100.0
시험군 1 (배양액 + 사료 혼합)	8.45±2.84	49.37±14.47	584	100.8
시험군 2 (2 단계 정제산물 + 사료 혼합)	8.33±2.53	58.47±15.67	701	121.0

구분	폐사율 (%)
대조군	14
시험군 1 (배양액 + 사료 혼합)	10
시험군 2 (2 단계 정제산물 + 사료 혼합)	2

<Table 16> 현장적용시험 결과

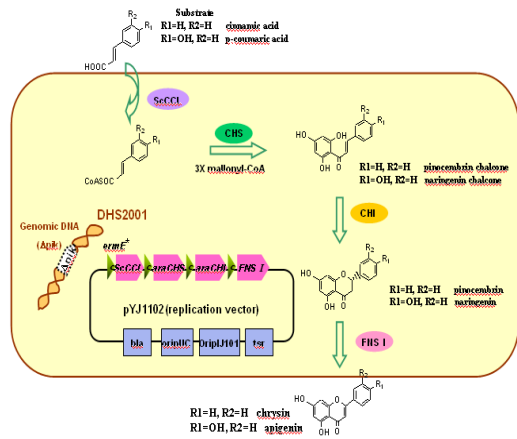
- 이로부터 naringenin과 kaempferol의 사료첨가제로 개발 가능성을 확인할 수 있었음.

▪ **Flavone 화합물의 이종숙주 생산 시스템 확립**

- Flavanone 생합성 유전자 (ScCCL, CHS, CHI)에 flavone 생합성 유전자 (FNS I)를 추가한 발현벡터 제작 및 이종숙주인

*S. venezuelae*에 형질전환.

- 0.5mM phenylpropanoic acid인 4-coumaric acid와 cinnamic acid를 첨가한 결과, 이종숙주로부터 5.1 mg/L apigenin 및 4.5mg/L chrysin 생산



▪ **Flavonoid 화합물의 분리공정 최적화 및 scale-up**

- 각 flavonoid를 3단계 정제법으로 최종 90% 이상의 순도로 분리 정제할 수 있는 공정을 성공적으로 구축하였으며, 50L 배양에까지 적용 가능하게 scale-up

▪ **3차년도 연구 요약**

▪ **항균력시험**

- 수산 분야 주요 병원성 세균에 대한 antibacterial activity를 *in vitro* 항균력 시험들을 통하여 확인하였으며, 천연 항생제 대체 물질로 개발이 가능한 수준의 MIC를 가짐도 확인

▪ **공격접종시험**

- 선별된 naringenin과 kaempferol이 공격접종시험에서 대조군에 비하여 상대적으로 낮은 폐사율을 제공할 수 있음을 확인

▪ **현장적용시험**

- 넙치 치어를 대상으로 한 16주간의 사양 시험을 통하여 증체율에서의 증가 효과와 폐사율 감소 효과를 확인

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구 목표

#### 1. 연구 최종 목표

- 수산용 항생제 대체를 위한 천연항생물질의 개발을 위하여, 녹차 (*Camellia sinensis* L.)에 의해 생산되는 항균 flavonoid 화합물중 대표적인 naringenin, pinocembrin, apigenin, galangin, kaempferol 및 chrysin을 target으로 하여 ① 식물 특이적 flavonoid 계열 화합물의 방선균 이종숙주 생산 시스템의 개발과 ② 발현 시스템의 최적화 및 이종숙주의 대사공학을 통한 생산성 향상 및 산업화 추진

#### 2. 연도별 세부 목표

구분	연구개발목표	연구개발내용
1차년도	식물유래 Flavonoid 화합물의 미생물 이종숙주 생산 시스템 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 식물유래 flavanone 화합물인 naringenin 및 pinocembrin의 미생물 이종숙주 생산 시스템 확립</li> <li>▪ 발현 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상</li> <li>▪ 소형 발효조를 이용한 발효조건 최적화</li> </ul>
2차년도	미생물 이종숙주 생산 식물유래 Flavonoid 화합물의 다양성 확보 및 대량생산 공정개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 식물유래 flavonol 화합물 (kaempferol 및 galangin)의 이종숙주 생산시스템 구축</li> <li>▪ 중·대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up</li> </ul>
3차년도	Flavonoid 화합물의 다양성 확대, 활성평가 및 대량생산에 의한 산업화 추진	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 식물유래 flavone 화합물 (apigenin 및 chrysin)의 이종숙주 생산시스템 구축</li> <li>▪ 확보된 flavonoid 화합물의 <i>in vitro</i> 항균 활성 검증</li> <li>▪ 분리공정 최적화 및 scale-up</li> <li>▪ 공격접종시험에서의 항균 효과 확인</li> <li>▪ 사양시험에서의 증체율 증가 및 폐사율 감소 효과 확인</li> </ul>

## 제 2 절 연구개발 목표의 달성도

### 1. 1차년도 연구개발 달성도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도	자체평가	달성도
○ 식물유래 Flavanone 화합물의 미생물 이종숙주 생산 시스템 확립	40 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavonoid 생합성 유전자의 이종숙주 발현을 통하여 flavanone 생산 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>S. coelicolor</i> ScCCL, <i>A. thaliana</i> CHS, <i>A. thaliana</i> CHI 유전자를 방선균 이종숙주에서 발현하고, 4-coumaric acid 및 cinnamic acid를 feeding하여 80 µg/L naringenin 및 160 µg/L pinocembrin이 생산되었음.</li> <li><i>A. thaliana</i> CHI뿐만 아니라 추가로 2종의 CHI를 발현함으로써 보다 다양한 flavanone 이종숙주 생산 시스템을 확보하였음.</li> </ul>	100%
	40 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>Amino acid로부터 flavanone 생산 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ScCCL, CHS, CHI 유전자 외 PAL 유전자를 동시 발현하고 tyrosine 또는 phenylalanine을 feeding하여, 방선균 이종숙주에서 10 µg/L naringenin 및 20 µg/L pinocembrin이 생산되었음.</li> </ul>	100%
○ 소형 발효조를 이용한 발효 조건 최적화	10 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효조건의 최적화 여부 (초기 생산성 대비 2배 이상)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>배지조성 (R2YE), 배양시기 (48시간 배양 후 4-coumaric acid 또는 cinnamic acid feeding, 18시간 추가 배양), inoculum size (1:100), agitation (240rpm) 효과를 조사하여 배양 및 발효 조건을 최적화하였음.</li> <li>0.2 mg/L naringenin 및 0.4 mg/L pinocembrin 생산을 생산함으로써 초기 생산성 대비 2 배 이상 생산성이 증대되었음.</li> </ul>	100%
○ 발현 최적화 및 대사공학에 의한 생산성 향상	10 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>발현 시스템의 최적화 및 대사공학에 의한 flavanone의 생산성 증대 여부 (초기 생산성 대비 2배 이상)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>ermE*</i> promoter를 가지는 high copy, replication 벡터 시스템을 구축하였음.</li> <li>세포 내 malonyl-CoA 농도 증가를 위해 ACC 또는 PanK 유전자를 과발현 함으로써 추가로 약 1.5배의 flavanone 생산성을 증대하였음. (1.5 mg/L naringenin 및 3.0 mg/L pinocembrin 생산)</li> <li>이종숙주의 codon preference를 고려한 유전자 염기서열 재설계 및 추가적인 생산 배지 최적화함으로써 초기 생산성 대비 약 40배 이상의 생산성 증대에 성공하였음 (4.0 mg/L naringenin 및 6.0 mg/L pinocembrin 생산).</li> </ul>	100%

## 2. 2차년도 연구개발 달성도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도	자체평가	달성도
○ 식물유래 flavonol 화합물의 이종숙주 생산시스템 구축	50 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavonol 생합성 유전자 (F3H, FLS 유전자)의 이종숙주 발현을 통한 kaempferol 및 galangin 생산 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Citrus plant</i> 유래의 flavanone 3<math>\beta</math>-hydroxylase (F3H)와 flavonol synthase (FLS) 유전자를 추가로 방선균 이종숙주에서 발현하고, 0.5mM의 4-coumaric acid 및 cinnamic acid를 feeding하여 <b>0.2 mg/L kaempferol</b> 및 <b>0.8 mg/L galangin</b> 이 생산되었음.</li> </ul>	100%
○ 중·대형 발효조를 이용한 발효조건 scale-up	30 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavanone 화합물 생산의 발효조건 최적화 여부</li> <li>Flavonol 화합물 생산의 발효조건 최적화 여부</li> <li>저가 배지성분 선발 및 중·대형 발효조를 이용한 생산 시스템 최적화 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>50L 발효조를 기준으로 flavanone 및 flavonol의 발효조건 최적화 확립을 위하여 inoculum size (2%), agitation (200rpm), pH (7.2) 효과 등을 조사하여 배양 및 발효 조건을 최적화하였음.</li> <li>Flavanone 및 flavonol의 산업적 생산을 위한 저가 배지 성분으로 molasses와 fish meal extract를 최종 탄소원 및 질소 원으로 각각 선별하였음.</li> <li>최종적으로 flavanone의 경우 <b>4.4 mg/L naringenin</b>과 <b>6.6 mg/L pinocembrin</b>이 생산, flavonol의 경우 <b>0.6 mg/L kaempferol</b> 및 <b>2.0 mg/L galangin</b>이 생산되었음. 이는 초기 생산성 대비 약 2배 이상 생산성이 증가된 결과임.</li> </ul>	100%
○ 확보된 flavanone 화합물의 <i>in vitro</i> 항균활성 검증	20 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>MIC 도출 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>수산 양식과 관련이 높은 균으로 <i>Aeromonas hydrophila</i>, <i>Edwardsiella tarda</i>와 <i>Lactococcus garvieae</i>를 model strain으로 선발하였음.</li> <li>이종숙주에서 생산된 flavanone 화합물 (naringenin, pinocembrin)이 산업적 활용에 충분한 정도의 항균활성을 가지고 있음을 검증하였음.</li> </ul>	100%



### 3. 3차년도 연구개발 달성도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도	자체평가	달성도
○ 식물유래 flavone 화합물의 이중숙주 생산시스템 구축	50 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavone 생합성 유전자 (FNS I 유전자)를 추가하여 이중숙주 발현을 통한 apigenin 및 chrysin의 생산 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flavanone 생합성 유전자를 발현하는 방선균 이중숙주에 <i>Petroselinum</i> plant 유래의 flavone synthase (FNS) 유전자를 추가로 발현하고, 0.5mM의 4-coumaric acid 및 cinnamic acid를 feeding하여 4.5 mg/L chrysin 및 5.1 mg/L apigenin이 생산되었음.</li> </ul>	100%
○ Flavonoid 화합물의 분리공정 최적화 및 scale-up	10 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>분리정제 공정 구축 여부 및 scale-up 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>각 flavonoid를 3단계 정제법으로 최종 90% 이상의 순도로 분리 정제할 수 있는 공정을 성공적으로 구축하였으며, 50 L 배양에까지 적용 가능하게 scale-up 하였음.</li> </ul>	100%
○ 확보된 flavonoid 화합물의 항균시험 및 현장 적용 시험	40 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>항균력 시험 실시 여부, 공격접종시험 실시 여부, 사양시험 실시 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>수산 분야 주요 병원성 세균에 대한 antibacterial activity를 <i>in vitro</i> 항균력 시험들을 통하여 확인하였으며, 천연 항생제 대체 물질로 개발이 가능한 수준의 MIC를 가짐을 확인하였음.</li> <li>선별된 naringenin과 kaempferol이 공격접종시험에서 대조군에 비하여 상대적으로 낮은 폐사율을 제공할 수 있음을 확인하였음.</li> <li>넙치 치어를 대상으로 한 16주간의 사양시험을 통하여 증체율에서의 증가 효과와 폐사율 감소 효과를 확인할 수 있었음.</li> </ul>	100%

### 제 3 절 관련분야 기술발전예의 기여도

- ㉓ 수산용 항생제 대체가 가능한 천연 항균물질의 개발 및 대량생산을 통한 공급이 가능함.
- ㉔ Flavonoid와 같이 유용한 생리활성을 보이는 식물유래 이차대산산물의 생합성 경로 재설계를 통한 효율적인 이중 숙주 및 발현 시스템의 개발은, 역시 다양한 유래의 생리활성물질의 상업화에 필수적이며 응용성이 높은 핵심적인 분자생물화학공정의 개발이라 할 수 있음. Flavonoid 이외에 현재 알려져 있는 다양한 생리활성의 식물유래 이차대산산물을 대상으로 조합생합성에 의하여 활성을 증진시킨 개량신약개발에 파급효과가 예상된다.
- ㉕ Flavonoid 이외에 현재 알려져 있는 다양한 생리활성의 식물유래 이차대산산물의 생산성 향상에 기여할 수 있는 기반기술의 개발이 될 것임.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 논문 게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	Engineering of plant-specific phenylpropenoids biosynthesis in <i>Streptomyces venezuelae</i>	박성렬, 윤진아	윤여준	백지혜, 박제원, 정원석, 반연희, 김은지, 유영지, 한아름	Journal of Biotechnology	141(3-4)	국외	SCI
2010	Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress.	박성렬	윤여준	반연희, 김은지, 유영지, 한아름	Journal of Antibiotics	63(8)	국외	SCI

### 제 2 절 특허 및 지적재산권 확보 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2008	방선균에서의 페닐프로파노이드 화합물의 생산 방법	윤여준 박성렬 윤진아 백지혜 박제원	대한 민국	10-2008-0112502					

### 제 3 절 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

- ㉓ 본 과제에 참여기업인 인트론 바이오테크놀로지는 연구개발 초기부터 발효공정 및 분리공정의 최적화와 scale-up을 통한 대량생산공정 연구에 참여하였으며, 또한 슈퍼박테리아인 VRSA (Vancomycin-resistant *staphylococcus aureus*)에 대한 특이 항생제 개발에 성공하여 항생제내성균주 은행을 통하여 그 효능을 확인한 상태이며 식중독 원인균인 Salmonella 특이 항생제도 개발하여 축산분야에의 적용을 추진 중에 있는 등, 기존 항생제 대체제 개발 및 실용화, 산업화에 많은 투자를 하고 있음. 본 연구 결과를 바탕으로 향후 수산용 항생제를 대체 가능한 flavonoid 계열 화합물의 대량생산을 통한 산업화에 계속적으로 역량을 집중할 계획임.
- ㉔ 본 과제 수행을 통하여 수산용 사료첨가제로의 산업화 가능성을 확인하였다 생각하며, 현재 다소 개선이 필요하다 생각되는 solubility 제고와 경제성 추가 확보를 위한 후속 연구 투자를 한 후 사업화를 추진할 계획임.

### 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

- ㉓ 단일 성분으로서 항균 활성이 이미 검증된 대표적인 화합물에 속하는 flavanone (naringenin 및 pinocembrin) 뿐만 아니라 flavonol (kaempferol 및 galangin), flavone (apigenin 및 chrysin)을 미생물 이중숙주에서 생산 성공함으로써 유용 생리활성을 가지는 보다 다양한 flavonoid 계열 화합물의 이중숙주 생산 연구에 활용할 계획임.
- ㉔ 나아가 flavonoid 뿐만 아니라, 다양한 생리활성을 가지는 천연물의 이중숙주 생산 시스템 개발에 활용할 수 있음.
- ㉕ 또한 본 과제에서 실시한 현장 적용 시험 결과를 바탕으로 제품화 연구를 추진할 계획임. 특히 저가이면서도 효과적인 제형 (formulation)의 개발을 통하여 제품화할 것이므로 이에 대한 후속 연구를 계획 중에 있음. 그리고 solubility 제고를 위한 추가 연구 수행을 계획하고 있음.
- ㉖ 뿐만 아니라 본 과제의 결과물에 의한 항균 효과가 부족한 세균들에 대한 또 다른 유효 약물을 추가로 확보하여, 중국적으로 여러 성분이 포함된 카테일 제품 (즉, 여러 성분의 병용)을 개발하여 실질적인 “무항생제 양식을 가능하게 할 수 있는 total solution”을 제공하고자 함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 일본 동경대의 Horinouchi 그룹

- ㉔ 일본 동경대의 Horinouchi 그룹은 *E. coli*를 이종숙주로 사용하여 yeast인 *Rhodotorula rubra*의 PAL이 tyrosine을 기질로 사용하여 coumaric acid를 생산할 수 있다는 사실을 이용하여, 이를 방선균인 *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 4-coumarate:CoA ligase (ScCCL), licorice plant인 *Glycyrrhiza echinata*의 CHS의 유전자들과 조합 발현하여 flavonoid 화합물 중 가장 간단한 구조의 flavanone인 naringenin을 소량 생산하는데 성공하였음 [Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69(5), 2699-2706].
- ㉕ 이들을 CHS의 기질인 malonyl-CoA의 이종숙주 내 농도를 증가시키는 간단한 대사 공학을 통하여 생산성을 크게 향상 시켰으며, 추가적인 유전자의 발현을 통하여 flavone 계열의 apigenin과 flavanol 계열의 kaempferol 및 galangin의 생산에 성공하였음 [Applied Microbiology Biotechnology, 2005, 68(4), 498-504; Applied Microbiology Biotechnology, 2006, 71(1), 53-58].

### 2. 미국 미네소타 대학의 Schmidt-Dannert 그룹

- ㉔ 미국 미네소타 대학의 Schmidt-Dannert 그룹은 유사한 방법을 사용하였으나, PAL을 *Rhodobacter shpaeroides*의 tyrosine ammonia lyase (TAL)로, 나머지 유전자들은 *Arabidopsis thaliana* 유래의 유전자들로 대체함으로써 생산성을 향상시킬 수 있었다고 보고하였음 [ChemBioChem, 2004, 5(4), 500-507].

### 3. 미국 버팔로 대학의 Koffas 그룹

- ㉔ 미국 버팔로 대학의 Koffas 그룹은 이종숙주로 *E. coli* 대신 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하여 flavanone을 생산하였음 [Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71, 5610-5613].
- ㉕ 또한 flavonoid과 함께 식물 유래 생리활성 이차대사산물의 대표적인 화합물인 안토시아닌 (anthocyanin) 생합성 유전자 (flavone 3-hydroxylase, dihydroflavonol reductase, flavonol synthase, anthocyanidin synthase, anthocyanin 3-O-glucosyltransferase)를 *E. coli*에서 발현하여 생산에 성공하였음 [Biotechnology & Bioengineering 2008, 100(1), 126-140].

## 제 7 장 참고문헌

1. RA Dixon, CL Steele, Trends in Plant Science, 1999, 4(10), 394-400
2. TP Cushnie, AJ Lamb, International journal of Antimicrobial agents, 2005, 225(26), 343-356
3. B Winkel-Shirley, Plant Physiology, 2001, 126, 485-493
4. RA Dixon, D Ferreira, Phytochemistry, 2002, 60(3), 205-211
5. EI Hwang, M Kaneko, Y Ohnishi, S Horinouchi, Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(5), 2699-2706
6. KT Watts, PC Lee, C Schmidt-Dannert, Chembiochem, 2004, 5(4), 500-507
7. WS Jung, SK Lee, JSJ Hong, SR Park, SJ Jeong, AR Han, JK Sohng, BG Kim, CY Choi, DH Sherman, YJ Yoon, Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72, 763-769
8. I Miyahisa, M Kaneko, N Funa, H Kawasaki, S Horinouchi, Applied Microbiology Biotechnology, 2005, 68, 498-504
9. JM Andrews, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48, Suppl. S1, 5-16
10. Yajun Yan, Abhijeet kohli, Mattheos A.G. Koffas, Applied Environmental Microbiology 2005, 71(1), 5610-5613
11. Yajun Yan, Zhen Li, Mattheos A.G. Koffas, Biotechnol. Bioeng. 2008, 100(1), 126-140
12. National Committe for Clinical Laboratory Standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically-5th edition: Approved standard M7-A5. NCCLS, 2000, Wayne, PA, USA