



Stress Adaptation of *Escherichia coli* as Monitored via Metabolites by Using Two-Dimensional NMR Spectroscopy

Young Kee Chae* and Seol Hyun Kim

Department of Chemistry, Sejong University, 209 Neungdong-Ro, Gwangjin-Gu, Seoul 05006, Korea

Received Aug 10, 2017; Revised Sep 3, 2017; Accepted Sep 10, 2017

Abstract *Escherichia coli* responds to ever-changing external and internal stresses by rapidly adjusting its physiology for better survival. This adjustment occurs at all levels including metabolites as well as mRNAs and proteins. Although there has been many reports describing *E. coli*'s adaptation to various stresses regarding transcriptomics or proteomics, only a few investigations have been reported regarding this adaptation viewed from metabolites' perspective. We applied four different types of stresses at four different doses as imposed by NaCl, sorbitol, ethanol, and pH to investigate the similarities or differences among the stresses, and which stress causes the largest perturbation of the metabolite composition. We profiled the metabolites under such external stresses by using two-dimensional NMR spectroscopy and identified 39 metabolites including amino acids, sugars, organic acids, and nucleic acids. According to our statistical analysis, the osmotic stress caused by sorbitol differentiated itself from others, while NaCl showed the largest dose dependent metabolic perturbations. We hope this work will form a foundation on which an approach to a successful protein production is systematically provided by a favorable metabolic environment by imposing proper external stresses.

Keywords metabolite, profiling, stress, response, NMR

서문

특정 단백질의 생물리화학적 특성을 연구하기 위해서는 그 단백질을 충분한 양만큼 생산하는 것이 필수적이다.¹ 대장균은 단백질 생산의 도구로서 널리 사용되는 생물체인데, 생산 방법이 단순하면서 비용도 저렴한 시스템이다.² 하지만, 발현이 시도되는 유전자의 수에 비해 실제로 대장균에서 성공적으로 생산되는 단백질은 매우 적는데, 이는 생산에 시도되는 유전자들이 상당수 진행생물에서 유래하기 때문이기도 하다. 이러한 진행생물 단백질은 생산이 아예 되지 않거나, 되더라도 봉입체의 형태인 것이 대부분이다. 이를 극복하기 위해 여러 방법이 고안되었는데, 예를 들면, rare codon이 추가된 균주 개발,³ thioredoxin reductase나 glutathione reductase가 제거된 균주 개발,⁴ 다양한 fusion 표지,⁵⁻¹⁰ 저온 생산 방법,¹¹ 세포질 밖으로의 분비,¹² 그리고 chaperone과의 동시 발현¹³⁻¹⁶ 등이 있다. 하지만, 이러한 방법들은 단백질이 원하는 대로 생산되지 않을 경우 시도해 보는 시행착오에 기반한 대중요법이라 할 수 있으며, 성공적인 결과에는 행운이라는 것이 상당한 부분을 차지하게 된다.

대사물질은 유전자 발현의 최종 단계이며, 세포의 특정 상태를 정의하는 기준이라고 할 수 있다.¹⁷ 본 연구실에서는 단백질의 생산

* Correspondence to: Young Kee Chae, Department of Chemistry, Sejong University, Seoul 05006, South Korea, T el: 82-2-3408-3748; E-mail: ykchae@sejong.ac.kr

Table 1. Summary of extraction results.

| stress | strength | Final OD at 600 nm | dried cell mass (g) | Dried extract mass (mg) |
|----------|----------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| EtOH | 0.5 % | 2.239 | 0.220 | 15.4 |
| | 1.0 % | 2.518 | 0.252 | 19.6 |
| | 1.5 % | 2.682 | 0.266 | 20.0 |
| | 2.0 % | 2.137 | 0.210 | 15.0 |
| pH | 4.51 | 1.978 | 0.203 | 11.3 |
| | 5.72 | 2.367 | 0.272 | 19.3 |
| | 7.71 | 2.065 | 0.232 | 19.6 |
| | 8.78 | 1.990 | 0.212 | 17.9 |
| NaCl | 1 % | 2.599 | 0.252 | 16.7 |
| | 2 % | 2.025 | 0.198 | 13.4 |
| | 3 % | 1.514 | 0.141 | 5.5 |
| | 4 % | 1.096 | 0.115 | 7.6 |
| sorbitol | 0.2 M | 3.070 | 0.329 | 21.6 |
| | 0.4 M | 2.239 | 0.224 | 20.2 |
| | 0.6 M | 2.634 | 0.263 | 24.4 |
| | 0.8 M | 2.194 | 0.219 | 15.1 |

패턴 (생산이 되지 않거나, 봉입체로 생산되거나, 아니면 수용성 활성체로 생산)을 예측하고, 적절한 외부 스트레스를 가하여 대장균 내부의 대사물질 조성을 바꿈으로써 원하는 형태의 단백질을 생산할 수 있는 방법을 연구하고 있다. 그러기 위해서는 우선 외부 스트레스에 의해 대장균의 대사물질 조성이 어떻게 그리고 얼마나 변화하는지에 관한 기초 데이터를 축적해야 하는데, 이 보고서에서 그 내용을 다루고 있다.

실험방법

대장균 배양— 카나마이신과 클로람페니콜이 각각 50 µg/mL과 50 µg/mL 들어있는 LB 배지 1 mL에 pET28a/ubis/piscidin¹⁸이 들어있는 Rosetta2(DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI, USA)를 37 °C에서 밤새도록 배양하였다. 배양액의 10 µL를 동일한 항생제를 포함하는 LB 배지 200 mL와

혼합하고 24 시간 배양한 후, 원심분리로 수집하고 PBS 완충용액으로 3번 세척하여 -80 °C에서 동결하고 보관하였다.

대사물질 추출과 NMR 샘플 준비— 끓는물 추출법을 사용하여 대사물질을 추출하였다.¹⁹⁻²⁰ 세포를 동결 건조한 후, 50 mL 일회용 튜브에 넣고 고운 가루 상태로 뺀고, 끓는물 15 mL를 부었다. 이 혼합물을 멸균기에 넣고 121 °C에서 20 분 동안 가열하고 얼음에서 냉각시킨 후, 4000 RPM으로 4 °C에서 20 분 동안 원심분리기에서 회전시켰다. 상층액을 MWCO가 5000 Da인 VIVASPIN 20 (Sartorius Stedim, Bohemia, NY, USA)로 옮기고 4000 RPM으로 4 °C에서 미세여과로 고분자 물질을 제거하였다. VIVASPIN 20의 여과막에 붙어있는 글리세롤은 미세여과를 수행하기 전에 물로 세척하여 제거하였다. 여과된 용액을 동결건조한 후, 건조된 추출물의 질량을 측정하였다 (표 1). 최종 추출물은 NMR buffer (5 mM HEPES, 0.2 mM DSS, 0.5 mM NaN₃가 들어있는 D₂O

용액) 300 μL 에 녹인 후, DCl이나 NaOD를 사용하여 pH를 7.38 ± 0.02 로 맞추었다.

NMR 데이터 수집 및 처리- 모든 실험은 Bruker Avance II 500 MHz을 사용하여 298K에서 수행되었다. Sensitivity enhanced ^1H - ^{13}C HSQC 실험을 echo-antiecho 모드에서 수행하였으며, 각각의 transient를 수집할 때 256번 스캔하였다. 초기 데이터는 t_2 와 t_1 축으로 1024개와 48개의 complex points로 수집하였다. 스펙트럼의 크기는 수소 축으로 20 ppm, 탄소 축으로 110 ppm이었다. 수소와 탄소의 중심 위치는 4.7 ppm과 55 ppm이었다.

DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) 신호를 수소와 탄소축의 기준점으로 사용하였다. 초기 데이터는 리눅스 시스템에서 NMRPipe²¹를 사용하여 가공하였다. 최종 스펙트럼에는 수소와 탄소축으로 2048개와 256개의 real point가 있다. 가공된 스펙트럼은 rNMR²²로 분석하였다. 피크 목록은

MMCD (<http://mmcd.nmr.fam.wisc.edu>), HMDB (<http://www.hmdb.ca>), 또는 PRIME (<http://prime.psc.riken.jp>)에 업로드하여 후보 물질의 목록을 구했다. 시료에 존재한다고 확인된 물질들의 피크 세기 데이터를 실험실에서 개발한 스크립트¹⁹를 사용하여 내부 표준 물질인 HEPES에 대해 표준화하고, 시료의 질량 차이를 보정한 후, 다변량 분석에 적합한 포맷으로 출력하였다. 다변량 분석은 R statistics software package (<http://www.r-project.org>)로 수행하였는데, Ian Lewis 교수 (University of Calgary, Canada)로부터 받은 스크립트를 수정하여 사용하였다.²⁰

실험결과 및 고찰

시료 준비- 주어진 4 가지 스트레스 조건 이외의 변수를 최소화하기 위해 배양된 세포들은 모두 정류상태에 들어선 이후 수확되었다. 뜨거운 물로 신속하게 세포를 처리하기 위해, 동결건조된 세포 덩어리를 고온 가루 형태로 분쇄하는 작업이 필요했는데, 천천히 물로 부풀려질 경우 정지되었던 대사

활동이 다시 시작되는 것을 방지하기 위함이었다. 뜨거운 물로 부풀려진 세포들은 멸균기에서 다시 고온 처리되었는데, 이 과정에서 작은 분자들만이 세포막의 틈으로 새어 나왔다. 새어 나온 물질의 대부분은 뜨거운 온도에도 분해되지 않는 작은 수용성 분자들이며, 세포막이나 세포벽의 구멍이 필터의 역할을 한 것으로 생각된다. 고온 처리 후에 원심분리를 하였는데, 느린 속도에서도 세포들이 가라앉는 것이 관찰되었으며, 이로부터 세포벽이 거의 온전한 형태로 남아있음을 확인할 수 있었다. 따라서, 작은 수용성 분자들이 삼투압에 의해 세포 안에서 밖으로 새어 나왔다고 할 수 있다.²³ 동결건조된 추출물의 질량은 16 ± 5 mg 이었으며, 강한 스트레스에서 배양된 경우 잘 자라지 못했기 때문에 추출물의 양도 적었다. NaCl 3%와 4%, 그리고 pH 4.51이 여기에 해당한다. (표 1)

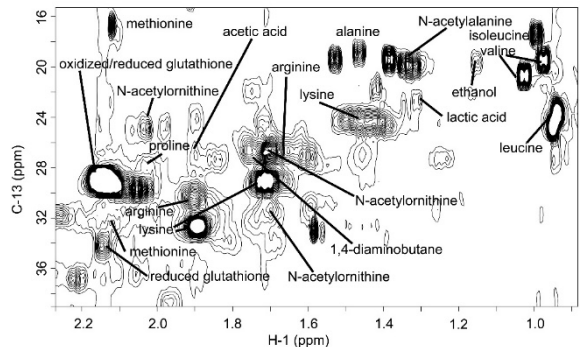


Figure 1. The high field region of a ^1H - ^{13}C HSQC spectrum. Resonances are labeled with their corresponding metabolites.

NMR 데이터 수집 및 가공- 각 스펙트럼을 수집하는 데 약 12시간이 소요되었는데, 이는 자연상태로 존재하는 탄소-13을 사용하였기 때문이다. 본 연구에서는 Shigemi 튜브에 필요한 300 μL 로 설정하였지만 3mm 혹은 1.7mm 프로브를 사용하면, 시료의 부피를 각각 160 μL , 45 μL 로 줄일 수 있어서, 농도를 2배 혹은 그 이상으로 증가시킬 수 있기 때문에 더 짧은 시간 내에 데이터를 수집할 수 있을 것이다. 자동시료교환기가 장착된 경우엔 다수 시료의 데이터를 수집하는데 매우 도움이

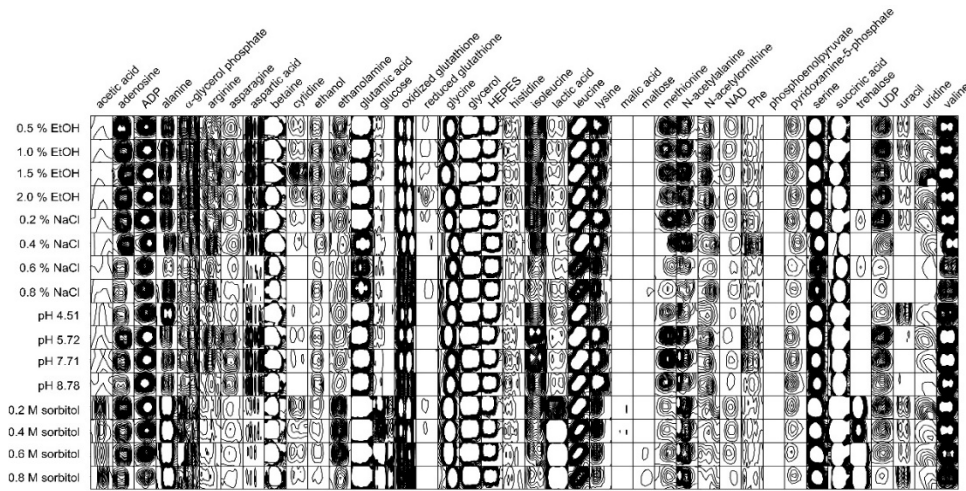


Figure 2. ROI (region-of-interest) diagram showing a collection of representative resonances of identified metabolites.

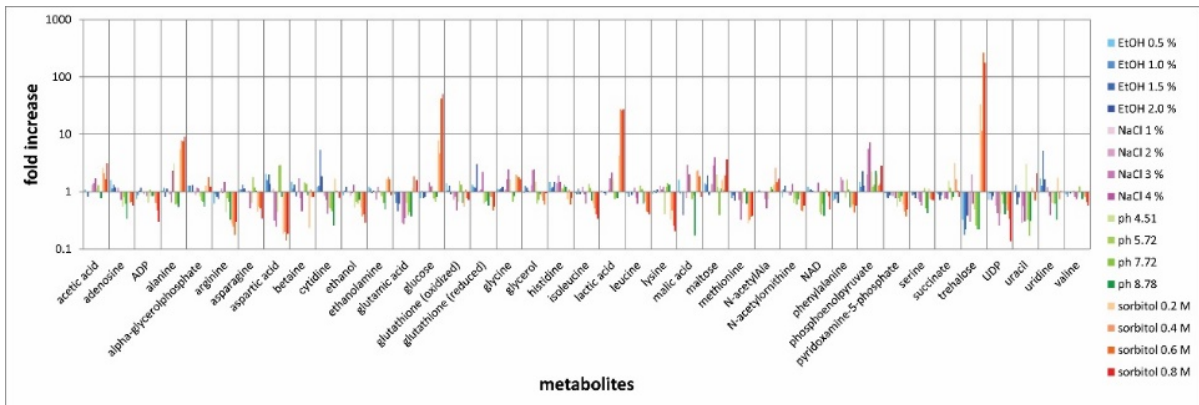


Figure 3. A barchart comparing metabolites of each sample after signal calibration.

될 것이다. 본 연구의 모든 시료에는 내부 표준물질인 HEPES가 5mM로 들어있었기 때문에, 이를 이용하여 NMR 시료를 준비할 때 발생할 수 있는 오차들을 보정할 수 있었다. 특히 pH를 7.4로 맞추어 보정할 때 첨가된 NaOD와 DCI의 양이 시료에 따라 차이가 있었기 때문에, 이는 시료 부피의 증가뿐 아니라, 시료 중의 NaCl 농도에도 영향을 미쳤다. 따라서 NMR 데이터의 신호 세기가 달라지게 되는데, HEPES의 원래 농도는 일정했으므로, 이를 사용하여 모든 시료의 HEPES 신호세기를 일정하게 보정하였고, 이를 통해 NMR 시료준비 및 실험에서의 오차를 최대한 제거할 수 있었다.

NMR 데이터 분석— 그림 1은 기준 시료라고 볼 수 있는 정상적인 LB 배지로부터 얻은 시료의 NMR 스펙트럼의 일부이다. rNMR에서

수집한 신호 목록을 MMCD에 전송하여 후보물질 목록을 전달받아 분석하여, 대사물질 39 개를 확인할 수 있었다. 그림 2는 rNMR을 사용하여 작성한 그림인데, 이는 모든 시료의 스펙트럼에서 확인된 대사물질의 대표 신호들만 모아놓은 그림이다. 하지만, 그림 2의 신호들의 세기는 보정이 되지 않은 상태이기 때문에 직접 비교하는 것은 정확하지 않지만, 이 그림은 전체 시료들의 유사점과 차이점을 한눈에 보여준다. 예를 들면, sorbitol에 의한 삼투압 스트레스의 경우, acetate, lactate, trehalose, glucose, ethanolamine이 다른 스트레스에 비해 상당히 많이 축적되어 있음을 쉽게 관찰할 수 있다. NaCl에 의한 염 스트레스의 경우, adenosine, aspartate, glutamate, methionine, serine, UDP가 다른 스트레스에 비해 상당히 소진되었음을 알 수

있다. 이처럼 대표 신호만을 모아놓은 ROI (region-of-interest)는 한눈에 여러 시료를 비교하는데 유용하다. 하지만, 보정이 되지 않은 상태의 데이터이기 때문에 주의가 필요하다. 원래의 데이터를 HEPES로 보정한 결과는 그림 3에 막대그래프로 나타내었다. 이 그래프에서 가장 눈에 띄는 스트레스는 단연 sorbitol에 의한 삼투압이다. 그림 2에서 관찰된 것처럼 acetate, lactate, trehalose, glucose, ethanolamine의 축적 이외에도 alanine의 축적, arginine, asparagine, aspartate, ethanol, isoleucine, lysine, malate, methionine, UDP 등의 소진이 한눈에 들어온다. 소진된 물질들 중 아미노산이 많이 관찰된다. 이 결과는 삼투압 스트레스를 극복하기 위해서는 상당량의 단백질 생산이 필요하다는 것을 의미할 수도 있다. glucose의 축적도 특이한데, 이는 스트레스로 가해진 sorbitol이 sorbitol dehydrogenase와 aldose reductase를 통해 glucose로 전환되는 것으로 보인다. trehalose도 glucose 두 개가 결합되어 있는 형태이므로, 충분한 양의 glucose가 축적되면서 같이 생산되는 것으로 보인다. trehalose는 삼투압 스트레스를 극복하기 위해 glycerol이나 proline과 더불어 세포가 생산하는 대표적인 물질이기도 하다. 하지만, NaCl 스트레스 역시 삼투압 스트레스이기도 한데, trehalose는 축적되지 않고, glycerol은 축적되는 양상을 보이는데, 이는 sorbitol에 의한 삼투압 스트레스와는 거의 정반대의 적응 방향이다. 따라서, sorbitol과 NaCl이 삼투압 스트레스를 가하는 것은 동일하지만, 세포가 반응하는 과정은 완전히 다르다는 것을 알 수 있다. glutamate의 경우도 특이한데, sorbitol에 의해서는 축적되는데, 다른 스트레스에서는 소진되는 정반대의 효과를 내고 있다. glutamate는 아미노산 대사에서 정중앙에 위치하는데, 이 아미노산의 축적과 소진이 스트레스에 따라 다르다는 것은 세포의 적응

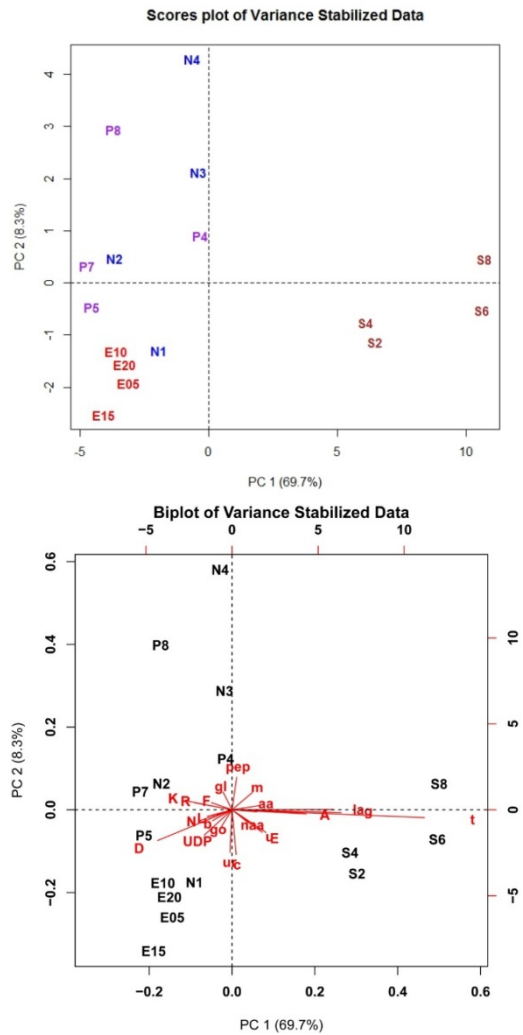


Figure 4. PCA scores plot (top) and biplot (bottom)

방식이 완전히 다르다는 것을 의미한다. 특히, sorbitol의 경우 glucose로 전환될 수 있기 때문에, 이러한 효과가 있을 것으로 생각된다. **다변량 분석**— 다변량 분석법은 개개의 대사물질의 변동을 전체적인 프로파일을 통해 관찰할 수 있게 해준다. 그림 4는 NMR 신호세기 데이터를 통계처리하여 스트레스 사이에 어떤 유사점이나 차이점이 있는지를 보게 해준다. 그림 4의 PCA scores plot에서 보듯이 sorbitol에 의한 스트레스 (S2, S4, S6, S8)는 다른 스트레스와는 분리되어 있다. 이는

sorbitol에 의한 스트레스 자체의 특이성을 나타낼 수도 있고, 과량으로 주어진 sorbitol의 대사에 따른 효과일 수도 있다. 에탄올 처리된 시료들 (E05, E10, E15, E20)은 다른 스트레스 군에 비해 집중된 형태인 것을 볼 수 있는데, 이는 본 실험에서 선택된 에탄올 농도 수준에서는 그다지 세포 내 대사물질이 크게 변하지 않는다는 것과, 충분한 세기의 스트레스로 작용하지는 않았다는 것을 의미한다. 세기에 따라 가장 심한 변화를 보인 스트레스는 NaCl인데 (N1, N2, N3, N4), NaCl 4%는 보통의 LB 배지 (NaCl 1%)에 비해 상당히 강한 스트레스였음을 보여준다. 이 결과를 사용하면 PC1 축과 PC2 축의 해석이 가능한데, PC1 축은 스트레스의 유형을 의미하고, PC2 축은 스트레스의 세기를 의미한다고 할 수 있다. 이를 pH 스트레스에 적용할 수 있는데, pH 4와 pH 8는 pH 5, pH7 시료보다 위쪽에 분포함을 볼 수 있고, 이들은 pH 4와 pH 8이 더 심한 스트레스였다고 해석할 수 있다 (P4, P5, P7, P8). 산성 (pH 4)와 염기성 (pH 8) 스트레스가 NaCl 스트레스와 같은 방향으로 분포한다는 것은 이 두 스트레스의 대장균에 대해 유사한 스트레스로 여겨진다는 점이 특이하다. 그림 4의 biplot은 PCA scores plot에 있는 시료들의 분포에 어떤 대사물질이 얼마나 기여하는지를 보여준다. trehalose (t)는 오른쪽 끝부분에 있는데, 이는 sorbitol의 이 부분에 존재하는데 크게 기여를 한다는 것이고, sorbitol 시료에 trehalose가 다른 시료들에 비해 훨씬 많이 존재함을 의미한다. sorbitol 시료의 분포에 기여하는 대사물질에는 alanine (A), lactate (la), glucose (g)를 쉽게 알아볼 수 있는데, 이는 막대그래프에서 관찰한 결과와 같다. 또한 aspartate (D)는 왼쪽을 향하고 있는데, 이는 sorbitol 시료에서 상대적으로 많이 소진되었음을 의미한다. NaCl 스트레스 (N3, N4) 쪽을 향한 대사물질은 glycerol (gl)과 phosphoenolpyruvate

(pep)이므로, 이들 물질이 축적된 것을 의미하고, 반대쪽은 아래를 향한 uridine (ur)과 cytidine (c)는 소진되었다는 것을 의미하는데, 이 두 핵산이 pyrimidine이라는 것이 특이하다. 에탄올 쪽, 7시 방향에 있는 대사물질은 UDP와 oxidized glutathione (go)인데, 원점에서 멀리 떨어져 있지 않기 때문에 큰 영향을 미치지 못하는 대사물질이기는 하지만, 연구된 에탄올 스트레스가 강하지 않았다는 것의 결과이기도 하다. 산화된 glutathione이 조금이나마 축적되었다는 것은 세포 내 환원 반응이 다른 스트레스보다는 더 많았다는 것을 의미할 수도 있다.

결론

2 차원 NMR 실험을 사용하여 4 가지 스트레스 조건에서 축적되거나 소진되는 대사물질을 분석하였다. ROI 와 막대그래프를 통해 스트레스와 대사물질의 관계를 관찰할 수도 있지만, 대사물질의 통계적인 조합을 통해 보다 전체적인 분석을 할 수 있었는데, 이는 다변량 분석법을 통해 가능했다. 이 분석에 의하면, sorbitol 스트레스가 가장 독특했으며, 에탄올 스트레스는 보통의 LB 배지에 비해 차이점이 별로 없었다. NaCl 스트레스는 그 세기에 따른 차이가 가장 컸으며, 산성이나 염기성 pH 스트레스가 NaCl 스트레스와 유사하다는 관찰이 매우 특이했다고 판단한다. trehalose 는 sorbitol 스트레스에 특이적인 대사물질이었으며, glycerol 은 NaCl 과 pH, 그리고 산화된 glutathione 은 에탄올 스트레스에 특이적인 대사물질임이 확인되었다. 본 연구는, 2 차원 NMR 과 다변량 분석법을 활용하면, 특정 조건에서 축적되거나 소진되는 대사물질을 전체적으로 파악할 수 있다는 좋은 예를 보여준다.

감사의 글

이 연구를 도와준 김효선, 김동민, 엄윤진 연구원에게 감사한다. 이 연구는 한국연구재단의 연구교류지원사업 (NRF-2016K2A9A1A01947329)과 세종대학교 2017년 연구역량강화사업 (2017-0235)에서 지원되었다.

References

1. J. C. Oh, S. H. Choi, J. H. Yun, Y. J. Ko, K. Y. Choi, and W. T. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **21**, 72 (2017)
2. Y. K. Chae, S. H. Kim, and J. L. Markley, *PLoS one* **12**, e0177233 (2017)
3. H. Tegel, J. Steen, A. Konrad, H. Nikdin, K. Pettersson, M. Stenvall, S. Tourle, U. Wrethagen, L. Xu, L. Yderland, M. Uhlen, S. Hober, and J. Ottosson, *Biotechnol. J.* **4**, 51 (2009)
4. W. A. Prinz, F. Aslund, A. Holmgren, and J. Beckwith, *J. Biol. Chem.* **272**, 15661 (1997)
5. M. R. Dyson, S. P. Shadbolt, K. J. Vincent, R. L. Perera, and J. McCafferty, *BMC Biotechnol.* **4**, 32 (2004)
6. L. Niiranen, S. Espelid, C. R. Karlsen, M. Mustonen, S. M. Paulsen, P. Heikinheimo, and N. P. Willassen, *Protein Expr. Purif.* **52**, 210 (2007)
7. B. L. Brown, M. Hadley, and R. Page, *Protein Expr. Purif.* **62**, 9 (2008)
8. V. De Marco, G. Stier, S. Blandin, and A. de Marco, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 766 (2004)
9. Y. B. Zhang, J. Howitt, S. McCorkle, P. Lawrence, K. Springer, and P. Freimuth, *Protein Expr. Purif.* **36**, 207 (2004)
10. M. P. Malakhov, M. R. Mattern, O. A. Malakhova, M. Drinker, S. D. Weeks, and T. R. Butt, *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 75 (2004)
11. F. Volonte, F. Marinelli, L. Gastaldo, S. Sacchi, M. S. Pilone, L. Pollegioni, and G. Molla, *Protein Expr. Purif.* **61**, 131 (2008)
12. P. H. Bessette, F. Aslund, J. Beckwith, and G. Georgiou, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13703 (1999)
13. B. L. Brown, S. Grigoriu, Y. Kim, J. M. Arruda, A. Davenport, T. K. Wood, W. Peti, and R. Page, *PLoS Pathog.* **5**, e1000706 (2009)
14. Y. H. Wang, M. K. Ayrappetov, X. Lin, and G. Sun, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 606 (2006)
15. Y. Chen, J. Song, S. F. Sui, and D. N. Wang, *Protein Expr. Purif.* **32**, 221 (2003)
16. S. K. Sahu, A. Rajasekharan, and S. N. Gummadi, *Biotechnol Lett.* **31**, 1745 (2009)
17. W. S. Choi, Y. W. In, H. H. Kim, J. S. Hyun, and S. J. Park, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **21**, 44 (2017)
18. Y. K. Chae, W. J. Moon, D. K. Hwang, E. J. Park, and Y. M. Kim, *Protein Expr. Purif.* **51**, 141 (2007)
19. Y. K. Chae, and S. H. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **36**, 66 (2015)
20. Y. K. Chae, S. H. Kim, and J. S. Hyun, *Chem. Biodivers.* **12**, 925 (2015)
21. F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax, *J. Biomo. NMR* **6**, 277 (1995)
22. I. A. Lewis, S. C. Schommer, and J. L. Markley, *Magn. Reson. Chem.* **47** Suppl 1, S123 (2009)
23. Y. K. Chae, S. H. Kim, and Y. K. Nam, *Chem. Biodivers.* **10**, 1816 (2013)