



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

점액세균 *Sorangium cellulosum*의
대사산물로부터 생리활성물질의
탐색과 분리 및 동정

Discovery, Isolation and Characterization of Bioactive
Compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)



지도교수 안종웅

2010년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

유 수 정

이학석사 학위논문

점액세균 *Sorangium cellulosum*의
대사산물로부터 생리활성물질의
탐색과 분리 및 동정

Discovery, Isolation and Characterization of Bioactive
Compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)



지도교수 안종웅

2010년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

유 수 정

목 차

	page
LIST OF TABLES	i
LIST OF FIGURES	iii
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	v
ABSTRACT	1
I. 서 론	4
II. 실험 재료 및 방법	8
1. 실험기기 및 시약	8
1.1. 실험기기	8
1.2. 용매	10
1.3. 시약 및 촉진제	11
1.4. TLC	13
1.5. 배지	15
1.6. 시험균	25
1.7. 떡이균의 선정과 배양	26
2. Cellulolytic myxobacteria의 분리 및 동정	27
2.1. 토양 시료의 채집 및 처리	27
2.2. Cellulolytic myxobacteria의 분리 및 순화	28
2.3. <i>Sorangium cellulosum</i> 균주의 동정	30
3. <i>Sorangium cellulosum</i> 균주의 배양과 대사산물의 추출	35

3.1. <i>S. celluloseum</i> 균주의 배양	35
3.2. 대사산물의 추출 및 분획	36
4. Strain KM1045가 생산하는 세포독성물질의 분리	38
5. Strain KM1033이 생산하는 항균물질의 분리	40
6. 생물활성 측정	42
6.1. 항균활성	42
6.2. 세포독성	43
Ⅲ.결과 및 고찰	45
1. Cellulolytic myxobacteria의 분리 및 동정	45
2. 분리된 <i>S. celluloseum</i> 의 특성	49
3. 대사산물의 항균활성 스크리닝	54
4. Strain KM1045의 특성	58
5. Chivosazole F의 구조동정 및 생물활성	60
5.1. Chivosazole F의 구조동정	60
5.2. Chivosazole F의 생물활성	70
6. Strain KM1033의 특성	72
7. Coriolide의 구조동정 및 생물활성	74
7.1. Coriolide의 구조동정	74

7.2. Coriolide의 생물활성 80

IV.결 론 81

V.참고 문헌 83

부 록

맺 음 말



List of Tables

	page
Table 1. Composition of ST21CX agar medium	15
Table 2. Composition of KAN4 agar medium	16
Table 3. Composition of Vy/2 agar medium	17
Table 4. Composition of CAS medium	18
Table 5. Composition of nitrate broth	18
Table 6. Composition of starch agar medium	19
Table 7. Composition of christensen urea agar medium ...	20
Table 8. Composition of nutrient agar medium	21
Table 9. Composition of <i>Micrococcus</i> agar medium.	22
Table 10. Composition of yeast extract agar medium	23
Table 11. Composition of SC liquid medium	24
Table 12. Test organisms	25
Table 13. Myxobacteria classification by Congo red staining.	32
Table 14. Morphological and physiological characteristics of <i>Sorangium cellulosum</i>	48
Table 15. Bioassay-based screening of <i>S. cellulosum</i> strains producing antimicrobial secondary metabolites	55
Table 16. Physico-chemical properties of compound 1.....	60
Table 17. The list of NOE data analyzed from the ROESY spectrum of compound 1	66

Table 18. The ^1H and ^{13}C NMR assignments for compound 1	68
Table 19. Cytotoxicities of chivosazole F(1) and doxorubicin(reference)	70
Table 20. Antimicrobial spectrum of chivosazole F(1)	71
Table 21. Physico-chemical properties of compound 2	74
Table 22. The ^1H and ^{13}C NMR assignments for compound 2	79
Table 23. Antimicrobial spectrum of compound 2	80



List of Figures

	page
Figure 1. Fruiting bodies of myxobacteria	5
Figure 2. Selected structures of secondary metabolites from myxobacteria	7
Figure 3. Sampling sites of soils studied	27
Figure 4. Key to the fruiting body types of myxobacteria .	30
Figure 5. Procedure of Gram stain	31
Figure 6. Work-up procedure of <i>Sorangium cellulosum</i> isolates	37
Figure 7. Isolation of a cytotoxic compound(1) from <i>S. cellulosum</i> KM1045	39
Figure 8. Isolation of an antimicrobial compound(2) from <i>S. cellulosum</i> KM1033	41
Figure 9. The swarm colony of cellulolytic myxobacteria on agar plates	46
Figure 10. The characteristics of <i>S. cellulosum</i> on a filter paper on top of a ST21CX agar plate	50
Figure 11. The characteristics of <i>S. cellulosum</i> on a KAN4 agar plate	51
Figure 12. The characteristics of <i>S. cellulosum</i> on a Vy/2 agar plate	52
Figure 13. Cultural characteristic of <i>S. cellulosum</i> in a shaker flask culture	53
Figure 14. The swarm colony of <i>S. cellulosum</i> KM1045	

on agar plates	59
Figure 15. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD	61
Figure 16. ^1H NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD	62
Figure 17. Partial structures(I) of compound 1	63
Figure 18. Partial structures(II) of compound 1	64
Figure 19. The structure of compound 1 with possible geometric configuration from the homonuclear 2D NMR experiments	65
Figure 20. The structure of chivosazole F(1)	67
Figure 21. The swarm colony of <i>S. cellulosum</i> KM1033 on agar plates	73
Figure 22. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD	75
Figure 23. ^1H NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD	76
Figure 24. Partial structures of compound 2	77
Figure 25 The structure of coriolide(2)	78

List of Abbreviations and Symbols

aq.	: aqueous
^{13}C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
concd.	: concentrated
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
EI	: electron impact
ESI	: electrospray ionization
EtOAc	: ethyl acetate
G	: gravity force
^1H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HREI	: high resolution electron impact
HRESI	: high resolution electrospray ionization
Hz	: hertz
J	: coupling constant (Hz)
kbp	: kilo base pair
M^+	: molecular ion
MeOH	: methyl alcohol
MS	: mass spectroscopy
m/z	: mass to charge
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
rpm	: rounds per minute
UV	: ultraviolet
δ	: chemical shift

**Discovery, Isolation and Characterization
of Bioactive Compounds
from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)**

Su-Jung Yoo

*Department of Marine Bioscience and Environment, Graduate
School, Korea Maritime University, Busan, Korea*

(Advisor : Professor Jong-Woong Ahn)



Myxobacteria are single cell bacteria that display remarkable cooperative multicellular behavior during their life cycle. Myxobacteria are gram-negative and move by gliding and form diffusive spreading colonies or so-called "swarms". Using exoenzymes, they analyse different biological macromolecules as well as whole microorganisms such as bacteria and yeast. These organisms form characteristic fruiting bodies which are not produced by other bacteria.

The search for novel compounds strongly depends upon the availability of novel strains. Especially, myxobacterium

Sorangium strains have proved to be extremely versatile producers of biologically active secondary metabolites. However, they are not obtained by routine method for culturing bacteria and thus require a special technique for their isolation and culture.

By using filter paper method and different purification methods, a number of *Sorangium* strains have been isolated as pure cultures from soil at different regions of Korea. Our collection increased last year by 96 strains. In the course of our screening for bioactive compounds from our culture collection, two *Sorangium* strains were chosen for isolation of their secondary metabolites on the basis of bioassay-guided fractionation.

An ethyl acetate extract of the culture of *Sorangium cellulosum* KM1045 showed cytotoxic activity when tested *in vitro* against human cancer cells. Systematic fractionation of the extract led to isolation and characterization of chivosazole F(1) as a cytotoxic principle. Chivosazole F demonstrated potent cytotoxicity against human cancer cells, having ED₅₀ values ranging from 0.1 to 13.7ng/mL. Against human cancer cells such as SK-OV-3, the activity of chivosazole F was more than 90 times stronger than that of doxorubicin in terms of ED₅₀. It also showed moderate antifungal activity against *Candida albicans*.

An antifungal activity was detected in the culture broth of

S. cellulorum KM1033. Guided by the results of antifungal test, the organic extracts from the culture broth were separated by silica and RP-18 column chromatographies followed by silica HPLC to yield an active compound, as a colorless oil. The ¹H NMR spectrum of this compound in comparison with that of coriolide(2) isolated from *Monnina emarginata* seed oil reported by Phillips, B. E. et al(1970) indicated similar chemical shift, leading to the conclusion that both compounds were identical. As much as 1000µg/mL this compound was found to be active against *C. albicans*, causing a 26.4mm inhibition zone.



Keywords : Myxobacteria, *Sorangium cellulorum*, Chivosazole F, Coriolide, Cytotoxicity, Antifungal

I. 서론

생리활성 물질을 발견하기 위해서 자연계에 대한 탐구는 오랜 시간 동안 지속되어 왔다. 천연물의 탐색과 이용에 관한 연구는 유기체의 생합성 능력을 탐색하고 이용하는 것으로서, 그 source는 주로 식물과 미생물이 주종을 이루어 왔다. 특히 미생물은 종의 다양성과 함께 독특하고 흥미로운 생리활성 물질을 생산하는 예가 많고 세대기간이 짧으며 대량생산이 용이하고 산업적 이용 가능성이 높아서 대단히 매력 있는 생리활성 물질의 탐색 source가 되어 왔다. 그러나 지금까지 알려진 10,000여종의 미생물 기원의 생리활성 물질은 약 70%가 방선균에서 분리되었고 20%가 진균류에서, 나머지 10% 정도가 *Bacillus* 및 *Pseudomonas* 등의 세균류에서 분리되었음을 볼 때 생리활성 물질의 source가 된 미생물은 대단히 극소수의 group에 한정되어 있다는 것을 알 수 있다^{7,36,39}). 그런 까닭에, 이들을 대상으로 한 신물질 탐색연구는 점차 기지물질의 재분리단계에서 끝나는 경우가 많고 연구에 소요되는 비용과 시간이 증가하게 되어 효과적인 신물질 탐색을 위해서 새로운 source의 필요성이 대두되고 있다³⁸).

Myxobacteria는 길이가 대략 3-15 μm 이고 두께는 0.6-1.2 μm 인 간균 형태의 전형적인 gram 음성세균이다³²). Myxobacteria는 우리주변에 흔하게 존재하는 절대호기성 토양 세균으로 Proteobacteria δ group에 속하며, 지금까지 16속 47종이 알려져 있다. Myxobacteria는 유기물이 많은 토양, 나무껍질의 표면, 썩은 식물체 등에서 주로 서식하며, cellulose와 같은 유기물질을 분해, 이용해서 자라는 cellulolytic myxobacteria와 주변의 다른 미생물을 분해, 이용함으로써 영양분을 얻는 bacteriolytic myxobacteria로 구별할 수 있다³). 이들은 활주운동에 의해 느리게 이동하며, 단세포 세균임에도 불구하고 다른 세균에서는 찾아볼

수 없는 군집생활을 영위하면서 주변의 영양분이 고갈되면 수십만 마리의 세균이 협력하여 자실체를 형성하는 특이한 생활사를 보인다 (4,9,15,22,26-28,35,39) (그림 1). 이들은 육안으로도 관찰되는 흔한 미생물이지만 자연계로부터 분리가 어렵고 배양이 까다롭게 때문에 근래까지 크게 주목받지 못하였을 뿐만 아니라 일반 토양미생물로도 인정받지 못했다.

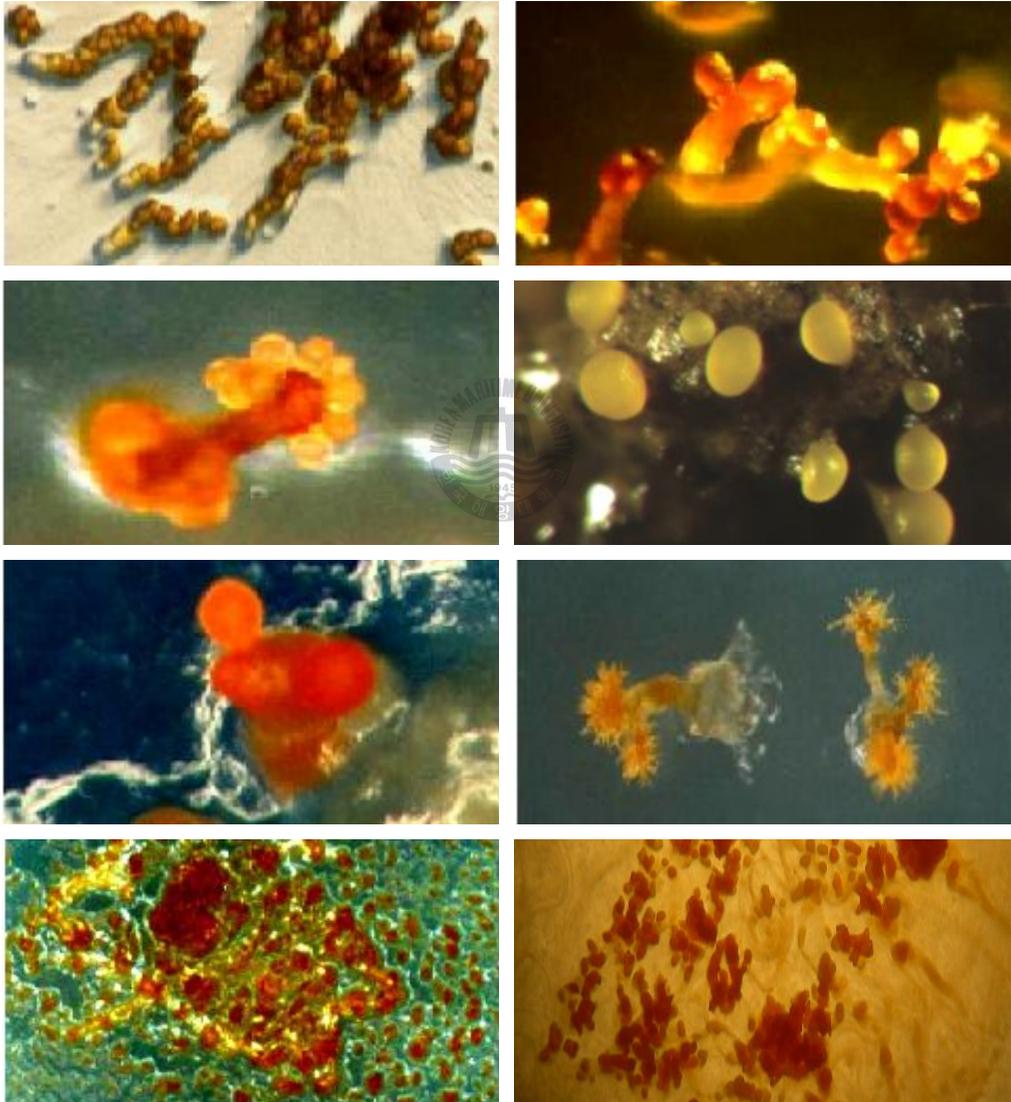
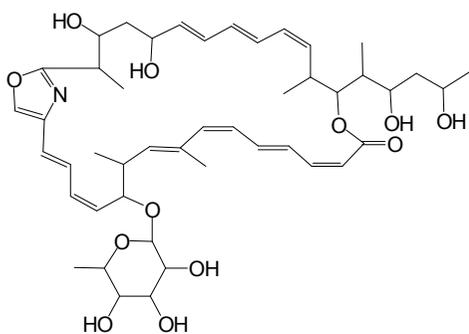


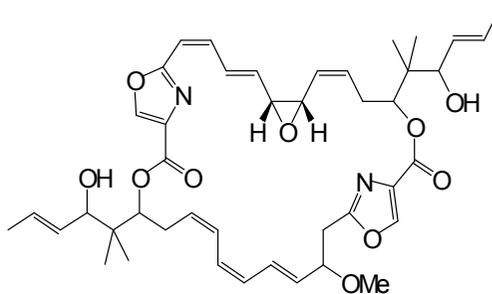
Figure 1. Fruiting bodies of myxobacteria.

그러나 바로 그러한 이유 때문에 신물질분야의 새로운 source로 주목 받았으며, 선진국 연구자들에 의해 이들의 분리법과 배양기술이 개발되면서 많은 연구결과 방선균에 필적하는 다양한 물질의 생합성 능력이 밝혀져 이들은 현재 신물질 탐색의 새로운 source로 떠오르고 있다^{6,12,16,19,24,30}). 현재까지 밝혀진 myxobacteria의 이차대사산물은 약 100개의 신규화합물과 500여개의 동족체 화합물이 있으며³¹), 이들은 대부분 타 미생물로부터 생산된 적이 없는 myxobacteria 특유의 물질로서 aromatic, heterocycles, quinones, macrolides, polyethers, polyenic compounds, peptides 등 다양한 구조를 나타내었다³⁸). 이들 중에는 독특한 기작을 갖고 있는 것들이 많으며, 그 중에서 Myxalamide, Phenalamide, Myxothiazole 등과 같은 electron transport 저해활성을 가진 화합물^{26,28,35}), Sorangicin, Disorazole 등과 같은 nucleic acid polymerase 저해활성을 가진 화합물^{10,11}), Epothilone, Apicularen A 등과 같은 cytoskeleton에 작용하는 화합물¹⁴), Soraphen의 진균의 acetyl-CoA carboxylase 저해활성을 나타내는 화합물 등이 보고되었다^{21,24}). 특히, myxobacteria의 일종인 *Sorangium cellulosum*의 대사산물에서 Taxol의 효과를 증가하면서 taxol-resistant cancer cell에 효과적인 항암제로 기대되는 Epothilones가 발견됨으로서 myxobacteria는 그야말로 생리활성 물질의 새로운 source로 급부상하고 있다²) (그림 2).

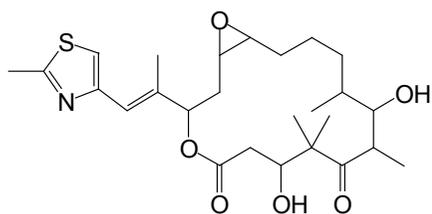
따라서 본 실험에서는 현재 생리활성 물질의 새로운 자원으로 부각되고 있는 *S. cellulosum*을 대상으로 그들의 분리법과 배양법을 확립하였고 분리된 균주들을 화학적·생물학적 스크리닝을 통해 높은 활성을 지닌 균주를 선정하여 이들의 대사산물로부터 활성물질을 찾아 그 구조와 활성에 대하여 연구하였다.



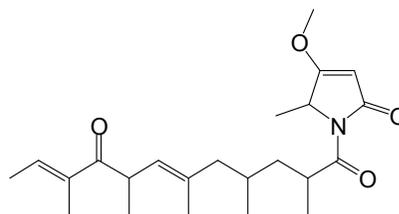
Chivosazole E



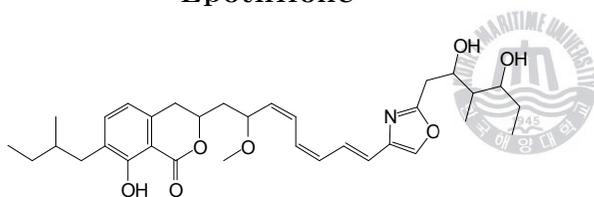
Disolazole



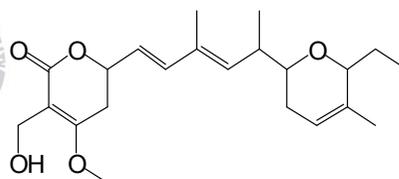
Epothilone



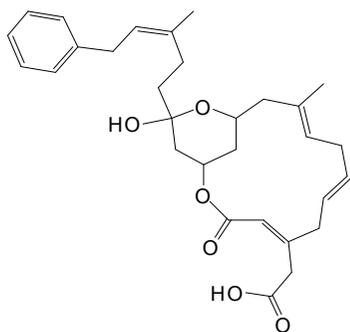
Eliamide



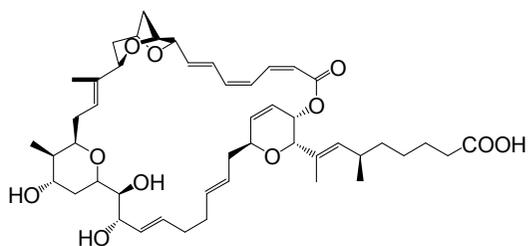
Icumazole A



Jerangolide A



Ripostatins A



Sorangicin

Figure 2. Selected structures of secondary metabolites from myxobacteria.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험기기 및 시약

1.1. 실험기기

실험에 사용된 기기는 다음과 같다.

- Autoclave (SJ-220A45, SEJONG)
- B.O.D incubator (SJ-250B, SEJONG)
- Centrifuge (SUPRA22K, HANIL)
- Clean bench (SJ-701S2, SEJONG)
- Deep freezer (NF-300SF, NIHON FREEZER)
- Electronic balance (BL220H, SHIMADZU)
- FT/IR-4100 (JASCO)
- High Performance Liquid Chromatography (LC-6AD, SHIMADZU)
Diode array detector (SPD-M10Avp, SHIMADZU)
Degasser (DGV-14A, SHIMADZU)
- High Resolution Mass Spectrometer (JMS-700 Mstation, JEOL Ltd)
- Micropipette (GILSON, FRANCE)
- Microscope (SZ11, OLYMPUS)
- Medium Pressure Liquid Chromatography (YFLC-5404, Yamazen)

- pH meter (Orion 420A, ORION)
- Rotary evaporator (R-200, BÜCHI)
- Shaking incubator (SJ-808M2, SEJONG)
- Shaking water bath
(CIRCULATOR, MONO-TECH ENG CO MSB-1511D)
- Sonicator (KUM SUNG ULTRASONIC)
- Stirrer (HMS 100, HANA instrument)
- UV/Visible spectrophotometer
(CM-10 SPECTOLINE, MODEL ENF-240C)
- Vacuum pump (ULVAC G-50SA)
- Vernier caliper (MITUTOYO COPORATION)
- Vortex mixer (BARNSTEAD/THERMOLYNE, USA)
- 500 MHz FT-NMR Spectrometer (UI500, Varian)



1.2. 용매

추출 및 분획 용매로 쓰인 acetone, ethyl acetate, *n*-heptane, methanol, methylen chloride는 시약급을 사용하였고 TLC 및 column용 용매는 이들을 재증류하여 사용하였다.

- Acetone, EP (DUKSAN)
- Buthyl alcohol, EP (DUKSAN)
- Ethyl acetate, EP (DUKSAN)
- *n*-Heptane, EP (DUKSAN)
- *n*-Hexane, EP (DUKSAN)
- Isopropyl alcohol, EP (DUKSAN)
- Methyl alcohol, EP (DUKSAN)
- Methylene chloride, EP (DUKSAN)
- Tetrahydrofuran, EP (DUKSAN)
- CD₃OD (Cambridge Isotope Laboratoies, Inc.)

1.3. 시약 및 충전제

실험에 사용된 시약은 다음과 같다.

- Agar, EP (JUNSEI)
- Baker's Yeast, CP (BRUGGEMAN)
- Beef Extract, EP (DIFCO)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, GR (JUNSEI)
- Casitone, EP (DIFCO)
- Ciprofloxacin (한국화학연구원으로부터 분양)
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, GR (SHINYO)
- Congo-red, EP (SIGMA)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, EP (YAKUI)
- Cyanocobalamin, EP (SIGMA)
- Cycloheximide, EP (ACROS)
- Dimethyl sulfoxide, GR (JUNSEI)
- EDTA Na- Fe^{3+} Salt, GR (JUNSEI)
- Glucose, GR (JUNSEI)
- H_3BO_3 , EP (YAKURI)
- HEPES, EP (J.T.BAKER)
- KBr, EP (YAKURI)
- KI, EP (JUNSEI)
- LiCl, EP (YAKURI)
- Malt Extract, EP (DIFCO)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, GR (JUNSEI)
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (SHINYO)

- NaCl, EP (JUNSEI)
- Na₂MoO₄ · 2H₂O, EP (YAKURI)
- NaOH, EP (ORIENTAL)
- Peptone, EP (MERCK)
- SnCl₂ · 2H₂O, EP (YAKURI)
- Soluble starch, EP (DIFCO)
- Soybean flour (SIGMA)
- Tryptone, EP (DIFCO)
- Vanillin (Fluka)
- Yeast Extract, EP (DIFCO)
- ZnCl₂, EP(YAKURI)
- XAD-16 (mesh 20.00-60.00, Rohm & Haas)
- TLC plate
 - Silica gel F254 (20×20cm, 0.25mm, MERCK)
 - RP-18 gel F254 (20×20cm, 0.25mm, MERCK)
- Silica gel (LiChroprep, 43-63μm, MERCK)
- RP-18 gel (LiChroprep, 40-63μm, MERCK)
- HPLC column
 - CAPCELL PAK C18
 - (UG120, 5μm; 4.6mmI.D.×250mm, SHISEIDO)
 - (UG120 Å, 5μm; 10mmI.D.×250mm, SHISEIDO)
 - YMC-Pack SIL
 - (5μm; 4.6mmI.D.×250mm, YMC)
 - (5μm; 10mmI.D.×250mm YMC)

1.4. TLC

TLC는 Silica gel plate와 RP-18 plate를 적당한 크기로 절단하여 이용하였고, 전개용매로는 재증류한 유기용매를 두 개 이상 조합하여 사용하였다. TLC 발색시약으로는 주로 Vanillin-sulphuric acid reagent를 많이 사용하였으며 Dragendorff reagent, Ninhydrin reagent, Iron (III) chloride reagent, Anisaldehyde-sulphuric acid reagent도 함께 사용하였다.

1.4.1. Vanillin-sulfuric acid

Ethanol 300mL에 황산 3mL, vanillin 9g을 첨가하여 시약을 제조하였으며, 전개시킨 TLC plate에 분무한 후 120°C로 가열하였다.

1.4.2. Dragendorff

10mL의 빙초산이 함유된 40mL의 증류수에 0.85g의 basic bismuth nitrate를 녹인 후 8g의 KI가 함유된 20mL 증류수를 첨가하여 시약을 제조하였으며, 전개시킨 TLC plate에 분무하여 사용하였다.

1.4.3. Ninhydrin

n-Buthanol 100mL에 ninhydrin 0.3g을 녹인 다음 초산 3mL을 첨가하여 제조하였다. 전개시킨 TLC plate에 분무 후 100°C로 가열하였다.

1.4.4. Iron(III) chloride

증류수 100mL에 FeCl₃을 10g첨가하여 제조한 10% aq. solution을 분무하여 사용하였다.

1.4.5. Anisaldehyde-sulphuric acid

0.5mL의 anisaldehyde를 10mL 빙초산에 첨가한 후, 85mL의 MeOH과 5mL의 진한 황산 용액을 함께 TLC plate에 분무하였고, 100°C로 가열하였다.

1.5. 배지

1.5.1. ST21CX agar 배지

ST21CX agar 배지의 구성 성분은 다음과 같다(표 1). 증류수를 7:3의 비로 나누어 solution A와 solution B를 만들었다. 각각을 균일하게 혼합한 다음 121°C 에서 15분간 멸균하였다. 멸균한 solution A와 solution B가 약 60°C 정도로 식으면 stirrer와 magnetic bar를 이용하여 solution A와 B를 혼합하고, 무균상에서 cycloheximide와 TES를 syringe filter하여 첨가하였다. 균일하게 혼합한 ST21CX agar 배지를 petri dish에 적정량 분주하고 30분간 건조 시킨 후 배지가 마르면, 날짜와 이름을 표기하여 서늘하고 습하지 않는 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 1. Composition of ST21CX agar medium.

Solution A	- K_2HPO_4 1% - Yest extract 0.02% - Agar 1.5%
Solution B	- KNO_3 1% - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%
	- Cycloheximide 50mg/L - TES* 1mL/L

*TES(Trace Element Solution) ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1%, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.002%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001%, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.001%, $ZnCl_2$ 0.002%, $LiCl$ 0.0005%, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0005%, H_3BO_3 0.001%, KBr 0.002%, KI 0.002%, $EDTA$ $Na-Fe^{3+}$ salt 0.8%

1.5.2. KAN4 agar 배지

증류수에 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 혼합한 다음, 20% NaOH을 사용하여 pH 7.2로 조절하였다. 조절된 배지는 agar를 넣어 stirrer와 magnetic bar를 사용하여 균일하게 혼합하고, 121°C 에서 15분간 멸균하였다. 멸균한 배지가 약 60°C 정도로 식으면 syringe filter한 cycloheximide와 kanamycin을 무균적으로 첨가하고 혼합하였다. 혼합된 KAN4 agar 배지는 petri dish에 적정량 분주하여 30분간 건조시킨 뒤, 제조날짜와 이름을 표기하여 서늘하고 습하지 않은 곳에 보관하여 사용하였다.

Table 2. Composition of KAN4 agar medium.

-
-
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1%
 - Cycloheximide 0.005%
 - Kanamycin 0.025%
 - Agar 1.5%
-
-



1.5.3. Vy/2 agar 배지

Vy/2 agar 배지의 구성 성분은 표 3과 같다. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가된 증류수를 20% NaOH을 사용하여 pH 7.2로 조절하였다. 이를 7:3의 비로 나누고 전자레인지로 사용하여 가열하였다. 이때 적은 비의 배지는 가열하기 전에 Baker's yeast를 넣어 완전히 녹을 때까지 흔들어 주었으며, Baker's yeast가 첨가되지 않은 배지는 가열 후 agar를 혼합하여 주었다. 각각의 배지가 충분히 혼합되면 stirrer와 magnetic bar를 사용하여 두 배지를 균일하게 혼합하고, 121°C 에서 15분간 멸균 하였다. 멸균한 배지가 약 60°C 정도로 식으면 무균상에서 cyanocobalamin을 syringe filter하여 첨가하였다. Cyanocobalamin이 첨가된 배지는 거품이 생기지 않도록 서서히 혼합하였다. Vy/2 agar 배지가 균일하게 혼합되면 분주하여 보관하였다.



Table 3. Composition of Vy/2 agar medium.

-
-
- Baker's yeast 0.5%
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1%
 - Agar 1.5%
 - Cyanocobalamin 0.5%
-
-

1.5.4. CAS 배지

증류수에 CAS 배지의 구성 성분을 넣고(표 4), stirrer와 magnetic bar를 사용하여 균일하게 혼합하였다. Nunc tube에 1mL 씩 분주한 후 121°C 에서 15분간 멸균하고 배지가 충분히 식은 다음 사용하였다.

Table 4. Composition of CAS medium.

-
-
- Casitone 1%
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%
 - DMSO 0.005%
-
-

1.5.5. Nitrate broth 배지



증류수에 peptone과 sodium nitrate를 넣고 균일하게 혼합하였다. 혼합된 배지는 20% NaOH을 사용하여 pH 7.2로 조절한 뒤, 121°C 에서 15분간 멸균하여 충분히 식힌 다음 사용하였다.

Table 5. Composition of nitrate broth.

-
-
- Peptone 1%
 - Sodium nitrate 0.1%
-
-

1.5.6. Starch agar 배지

Starch agar 배지의 구성성분은 표 6과 같다. 증류수에 peptone과 yeast extract, soluble starch를 넣고 혼합하였다. 균일하게 혼합된 배지는 20% NaOH를 사용하여 pH 7.2로 조절하였고, agar를 첨가하여 다시 혼합하였다. 121℃ 에서 15분간 멸균하였으며, 멸균한 배지가 약 60℃ 정도로 충분히 식으면 무균상에서 petri dish에 분주하여 30분간 건조시켰다. 적당히 굳은 배지는 만든 날짜와 이름을 표기한 뒤, 서늘하고 습하지 않은 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 6. Composition of starch agar medium.

-
-
- Peptone 0.5%
 - Yeast extract 0.3%
 - Soluble starch 0.2%
 - Agar 1.5%
-
-



1.5.7. Christensen urea agar 배지

Urease hydrolysis test에 사용되는 christensen urea agar 배지의 구성성분은 다음과 같다(표 7). Stirrer와 magnetic bar를 사용하여 증류수에 agar와 urea를 제외한 모든 구성성분을 넣어 혼합하였다. 20% NaOH를 사용하여 균일하게 혼합된 배지를 pH 6.8로 조절한 뒤, agar를 첨가하여 다시 혼합하였다. 균일하게 혼합된 배지는 121°C autoclave를 사용하여 15분간 멸균하였고, 멸균한 배지가 약 60°C 정도로 식으면 urea를 syringe filter하여 첨가 하였다. Urea가 첨가된 배지는 거품이 생기지 않도록 서서히 혼합하여 균일하게 섞어주었고, petri dish에 무균적으로 분주하여 30분간 건조시켰다. 충분히 건조된 배지는 날짜와 이름을 표기하여 서늘하고 습하지 않은 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 7. Composition of christensen urea agar medium.

-
-
- Peptone 0.1%
 - Yeast extract 0.01%
 - Glucose 0.1%
 - Sodium chloride 0.5%
 - Monopotassium phosphate 0.2%
 - Phenol red 0.0012%
 - Agar 2%
 - Urea 2%
-
-

1.5.8. Nutrient agar 배지

증류수에 agar를 제외한 배지의 구성 성분 모두를 넣고(표 8) 균일하게 혼합하였다. 혼합된 배지는 20% NaOH을 사용하여 pH 7.2로 조절한 뒤, 121℃ 에서 15분간 멸균하였다. 멸균된 nutrient agar 배지가 약 60℃ 정도로 충분히 식으면 petri dish에 무균적으로 분주하여 30분간 건조시켰다. 배지가 건조되면 만든 날짜와 이름을 표기하여 서늘하고 습하지 않은 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 8. Composition of nutrient agar medium.

-
-
- Tryptone 1%
 - Yeast extract 0.5%
 - NaCl 1%
 - Glucose 0.1%
 - Agar 1.5%
-
-



1.5.9. *Micrococcus* agar 배지

Micrococcus agar 배지의 구성 성분은 표 9에 나타내었다. Agar를 제외한 배지의 구성 성분을 증류수와 혼합하였다. 균일하게 혼합된 배지는 20% NaOH을 사용하여 pH 7.4로 조절한 뒤, agar를 첨가하고 다시 혼합하였다. 혼합된 배지는 121℃ 에서 15분간 멸균하였다. 멸균된 *Micrococcus* agar 배지가 약 60℃ 정도로 식으면 무균상에서 적정량 분주하고 날짜와 이름을 표기한 후 서늘하고 습하지 않은 곳에 보관하여 사용하였다.

Table 9. Composition of *Micrococcus* agar medium.

-
-
- Peptone 0.5%
 - Yeast extract 0.3%
 - Beef extract 0.15%
 - Glucose 0.1%
 - Agar 1.5%
-
-



1.5.10. Yeast extract agar 배지

증류수에 배지성분 모두를 넣고(표 10), stirrer와 magnetic bar를 이용하여 균일하게 혼합하였다. 혼합된 배지를 121℃ 에서 멸균 하였다. 멸균한 배지가 적당히 식으면 petri dish에 무균적으로 분주하여 30분간 건조시켰다. Yeast extract agar 배지가 마르면 제조날짜와 이름을 표기한 뒤, 서늘하고 습하지 않은 곳에 보관하여 사용하였다.

Table 10. Composition of yeast extract agar medium.

-
-
- Yeast extract 0.3%
 - Malt extract 0.3%
 - Peptone 0.5%
 - Glucose 1%
 - Agar 1.5%
-
-



1.5.11. SC liquid 배지

SC 배지의 구성 성분은 다음과 같다(표 11). HEPES가 첨가된 증류수를 20% NaOH를 사용하여 pH 7.4로 조절하였다. pH가 조절된 배지는 potato starch와 soyameal을 첨가하여 혼합한 후 121°C 에서 1차적으로 5분간 멸균하였다. 1차 멸균된 배지에 yeast extract, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, EDTA Na- Fe^{3+} salt를 첨가하여 121°C 에서 15분간 2차 멸균 하였다. 두 차례의 멸균 후, 배지가 약 60°C 정도로 식으면 무균 상태에서 멸균한 glucose를 첨가하여 사용하였다.

Table 11. Composition of SC liquid medium.

-
-
- | |
|---|
| - HEPES 50mM |
| - Potato starch 0.8% |
| - Soyameal 0.2% |
| - Glucose 0.2% |
| - Yeast extract 0.2% |
| - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01% |
| - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% |
| - EDTA Na- Fe^{3+} salt 0.08% |
-
-



1.6. 시험균

항균활성 측정에 사용된 세균과 진균류는 표 12에 나타내었으며, 이들은 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다.

Table 12. Test organisms.

Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	KCTC 12006
	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1916
Fungi	<i>Candida albicans</i>	KCTC 7965
	<i>Rhodotorula rubra</i>	KCTC 1209
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCTC 7246

동결 건조된 분말의 상태로 ample에 담겨져 분양된 각 균주를 활성화시키기 위해 줄칼을 이용하여 ample의 중간부분에 금을 긋고 70% ethanol을 적신 거즈로 잘 닦은 후, 가볍게 화염 멸균하였다. 이를 clean bench 안에서 절단하고 멸균된 증류수를 첨가한 후, 그 현탁액을 적정 평판배지위에 소량 옮겨 도말하고 B.O.D incubator에서 배양하였다. 순수한 colony를 떼어 평판배양 후, 냉장 보관하였고 실험 시에는 streak culture를 시행하여 활성화 된 균주를 본 실험의 재료로 사용하였다.

1.7. 떡이균의 선정과 배양

떡이균으로는 *E. coli*(KCTC 12006)를 선정하여 사용하였다. 사용된 *E. coli*는 냉장 보관되어 있는 상태의 것을 nutrient agar 배지에 streak culture한 후, 30°C 배양기에서 24시간 활성화시켰다. 미리 nutrition broth 배지를 10mL 넣어 멸균해 둔 'L'자 시험관에 활성화시킨 *E. coli*를 접종하였다. 30°C의 shaking water bath에서 120rpm으로 16시간 동안 진탕배양 하였다. 1L의 nutrition broth 배지를 함유하고 있는 2L 삼각플라스크에 미리 seed culture 해 둔 *E. coli* 배양액 10mL를 무균적으로 접종하였다. 접종 후 30°C shaking incubator에서 160rpm으로 16시간 배양하였다. 배양된 *E. coli*는 4°C, 10,000G로 20분 동안 원심분리하여 상등액과 균체를 분리한 다음, 균체를 다시 모아 0.2% NaCl로 세척한 후 물기를 제거한 후 냉장보관 하였다.



2. Cellulolytic myxobacteria의 분리 및 동정

2.1 토양 시료의 채집 및 처리

대전, 경기도 안산, 용인 그리고 경상북도 김천 소재의 직지사, 직지천 부근, 덕천리의 나대지 지역에 위치한 배밭, 포도밭, 고추밭, 배추밭 및 과수원 토양의 흙을 채집하였다. 시료 채집 시 지표면의 흙을 걷어낸 상태에서 5cm 깊이까지의 흙을 일정한 간격으로 이동하면서 지역별로 채취하였으며, 채취한 시료는 곰팡이의 증식을 억제하기 위해 서늘한 곳에서 건조시켜 보관하여 실험에 사용하였다.

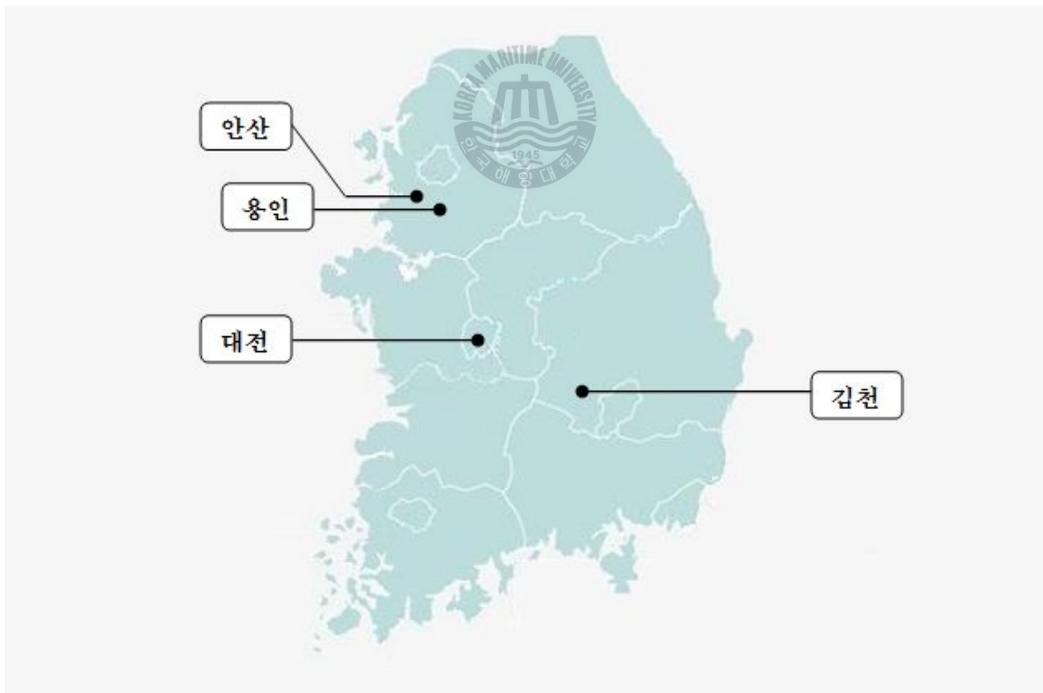


Figure 3. Sampling sites of soils studied.

2.2. Cellulolytic myxobacteria의 분리 및 순화

처리된 토양시료는 멸균한 여과지가 일정한 크기로 잘라서 올려진 ST21CX agar 배지에 loading 하였다. 토양 시료에 2~3방울의 멸균 증류수를 가하여 알갱이가 분산되지 않도록 하였다. 멸균 처리된 시약 스푼을 이용하여 직경 0.3~0.5cm 크기로 시료를 뭉쳐 멸균한 여과지 중앙에 한 점씩 올려놓았다. 이렇게 처리된 배지를 30°C B.O.D incubator에서 배양을 하였다.

시료 처리 후 30일 동안 실체쌍안현미경으로 균의 출현 및 성장 유무를 관찰하였다. 시료 주위에 여과지가 용해된 부분이나 자실체가 관찰되면 그들을 포함한 부분을 떼어 새로운 ST21CX agar 배지로 옮겼다. 이때 배지에는 약간 더 작은 크기(3cm×1cm)의 여과지를 사용하였으며, 잡균의 오염과 성장을 막기 위해 cycloheximide를 첨가하였다. 이러한 방법으로 ST21CX agar 배지를 이용한 동일한 조작을 여러 번 반복하여 토양시료로부터 cellulolytic myxobacteria를 분리하였다.

어느 정도의 분리가 이루어지면 더 나아간 순화를 위해 KAN4 agar 배지를 사용하였다. KAN4 agar 배지에는 멸균 여과지 대신, *E. coli*를 성장에 필요한 먹이균으로 사용하였다. 멸균한 *E. coli*를 micropipet을 사용하여 KAN4 agar 배지위에 100 μ L씩 loading하여 직경 1.2~1.5cm의 circular patch를 만들고, 그 가장자리에 일차 분리한 cellulolytic myxobacteria 집락을 떼어 접종하였다. Swarm과 자실체의 형태 및 오염여부를 관찰하면서 동일한 순화조작을 여러 번 반복하였다. 완전히 순화되었다고 판단되면 swarm이나 자실체를 무균적으로 Vy/2 agar 배지로 옮겼다.

Vy/2 agar 배지에 옮겨진 순화된 균주 중 성장속도가 우수하고 자실체

가 뚜렷한 것을 백금으로 긁어내어, CAS 배지를 함유하고 있는 nunc tube에 넣어 액체질소 또는 -80°C deep freezer에 보관하였다.



2.3. *Sorangium cellulosum* 균주의 동정

순수하게 분리된 cellulolytic myxobacteria 균주의 동정은 현미경을 통한 고체 배지에서의 swarm과 자실체의 형태를 일반적으로 myxobacteria의 분리에 사용되고 있는 다음 도식을 참고로 하여 비교하였다²³⁾. 그러나 cellulose를 용해하여 이용하는 myxobacteria는 유일하게 cellulolytic myxobacteria 1 속만이 존재하며, cellulolytic myxobacteria는 *Sorangium cellulosum* 1 종만이 존재하기 때문에 *sorangium cellulosum*의 동정은 분리과정에서 쉽게 할 수 있었다.

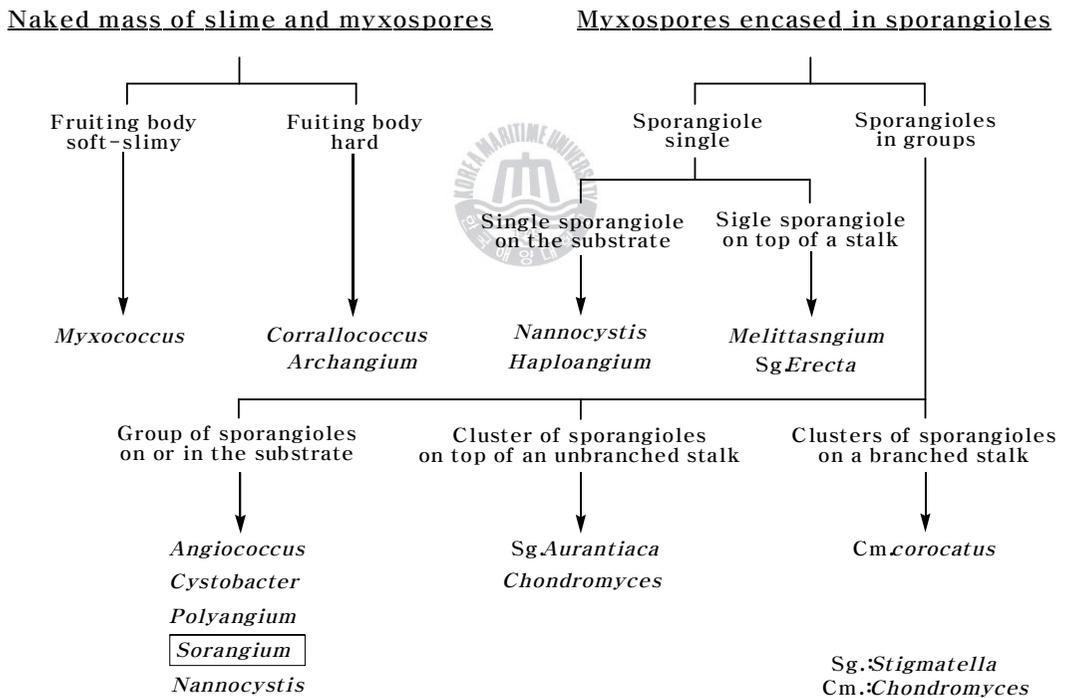


Figure 4. Key to the fruiting body types of myxobacteria²³⁾.

2.3.1. Gram 염색

순수하게 분리된 균주를 증류수를 1~2방울 떨어뜨린 슬라이드 글라스에 올려놓고 골고루 분산시켜 화염 고정시켰다. 고정시킨 균체에 crystal violet과 phenol이 함유된 염색제 용매를 1~2방울 떨어뜨려 1분간 염색하였다. 여기에 PVP-IOD+KI인 매염제 용액을 1~2방울 떨어뜨려 1분간 고정시킨 후 증류수로 5초간 간접세척 하였다. 세척된 균주는 다시 ethanol과 propanol을 함유한 시약으로 탈색시킨 후 증류수로 5초간 간접 세척하였다. 마지막으로 safranin 염색제로 1분간 염색한 후 증류수를 사용해 5초간 간접세척하여, 물기를 제거하고 현미경으로 세포의 형태와 염색 상태를 관찰하였으며 세포가 푸른색으로 염색되면 양성, 붉은색으로 염색되면 음성으로 판단하였다.

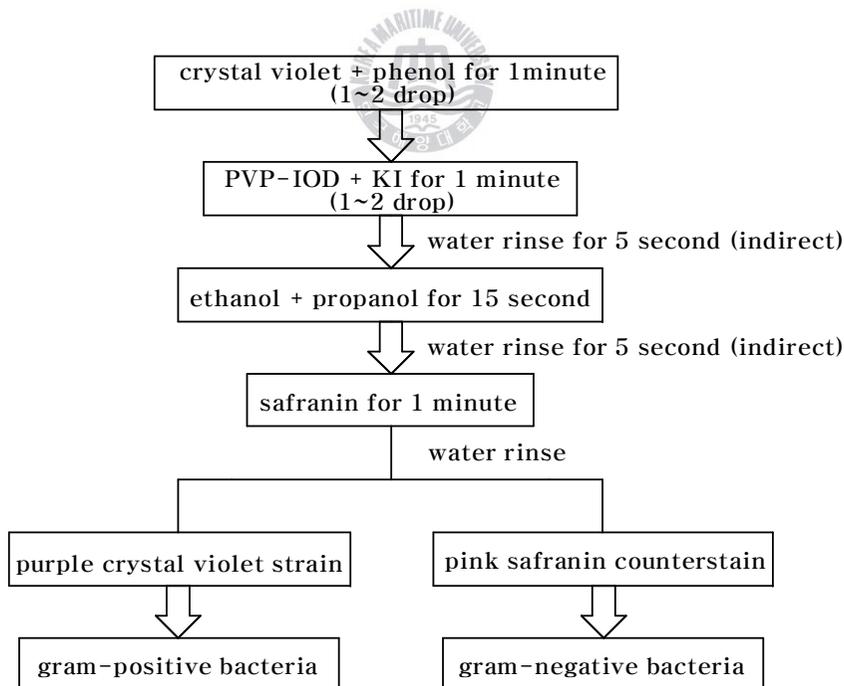


Figure 5. Procedure of Gram stain.

2.3.2. Congo red 염색

균체가 성장하고 있는 agar plate에 Congo red 시약을 균체가 잠길 정도로 부은 다음 10분 경과 후 염색시약을 제거했을 때 균체의 염색여부를 관찰하였다. 배지에 뿔은 swarm이 붉은 색으로 염색된 것이 관찰되면 양성, 염색되지 않으면 음성으로 판단하였으며, 이때 사용한 Congo red 시약은 증류수에 녹여 0.01% solution을 만들어 사용하였다.

Table 13. Myxobacteria classification by Congo red staining²³⁾.

	Positive		Negative	
Suborder	Cystobacterinaea		Sorangineae	
Family	Myxococcacea	Cystobacteaceae	Poliangiaceae	Nannocystaceae
Genus	<i>Myxococcus</i>	<i>Archangium</i>	<i>Polyangium</i>	<i>Nannocystis</i>
	<i>Corallococcus</i>	<i>Cystobacter</i>	<i>Haploangium</i>	
	<i>Angiococcus</i>	<i>Melittangium</i>	<i>Chondromyces</i>	
		<i>Stigmatella</i>	<i>Sorangium</i>	

2.3.3. Oxidase test

순수하게 분리된 균주를 nutrient agar 배지(표 8)에 접종하여 30°C B.O.D incubator에서 3~5일간 배양하였다. 배지에서 균체의 colony가 관찰되면 90% ethanol에 1%로 녹인 α -naphthol과 1% dimethyl-p-phenylenediamine oxalate solution을 1:1로 혼합한 혼합액을 몇 방울 떨어뜨린 후 10~30초 이내에 colony의 색깔변화를 관찰하였다. 이때 혼합액에 의해 colony가 짙은 청색으로 나타나면 양성으로, 색의 변화가 없으면 음성으로 간주하였다.

2.3.4. Urease test

Christensen urea agar 배지(표 7)에 분리한 균을 접종하여 37°C B.O.D incubator에서 3~12시간 배양한 후 배지의 색을 관찰하였다. 이때 노란색의 christensen urea agar 배지가 분홍색으로 변해 있다면 암모니아가 생성된 것으로 간주하여 양성으로 판단하였으며, 배지의 색이 균 이 접종되기 전과 같이 노란색을 띠고 있으면 음성으로 간주하였다.

2.3.5. Nitrate reduction test

Nitrate broth 배지(표 5)에 분리한 균주를 접종하여 1~2일간 배양하였다. 배양한 배양액에 0.5%의 α -naphthylamine과 0.8%의 sulfanilic acid가 1:1로 혼합된 혼합액을 10방울 정도 떨어뜨려 1~2분 내에 배양액의 색깔변화를 관찰하였으며, 배양액이 분홍색 또는 진한 적색으로 나타났을 때 양성으로 간주하였다.

2.3.6. Starch hydrolysis test

Starch agar 배지(표 6)에 분리된 균주를 접종하고 1~2일 동안 배양한 후 gram 염색에 사용되는 iodine을 소량 떨어뜨려 투명환의 형성 유무를 관찰하였으며, 투명환이 관찰되면 양성, 관찰되지 않으면 음성으로 판단하였다.

3. *Sorangium cellulosum* 균주의 배양과 대사산물의 추출

3.1. *S. cellulosum* 균주의 배양

3.1.1. 고체배양

KAN4 agar 배지의 circular patch에서 순화된 균주를 Vy/2 agar 배지에 무균적으로 접종하여 증식시켰다. 일정한 양으로 자란 균은 균체양을 확보하기 위해서 새로운 Vy/2 배지에 선 도말하였으며, 30°C B.O.D incubator에서 배양하였다.

3.1.2. 액체배양



고체배양에서 타 균으로부터 오염이 없으며, 성장 속도가 우수한 균주를 선발하여 액체배양을 실시하였다. SC liquid 배지 50mL를 함유한 300mL flask에 고체배지에서 배양한 균체를 접종하여, 30°C shaking incubator에서 160rpm으로 5일간 배양하였다. 배양한 균체를 seed로 하여 45mL의 SC liquid 배지를 포함하고 있는 300mL flask에 균체 위주의 seed를 5mL 접종하였으며, 30°C shaking incubator에서 160rpm으로 5일간 배양하였다.

1.5%(w/v)의 흡착제 XAD-16 수지가 첨가된 SC liquid 배지 400mL를 포함하고 있는 2L의 flask에, 배양한 균체를 접종하여 30°C shaking incubator에서 160rpm으로 10일간 배양하였다.

3.2. 대사산물의 추출 및 분획

3.2.1. 대사산물의 추출

20일간 배양 된 *S. cellulosum*은 100mesh 체에 걸러 균체와 XAD-16 수지를 배양액과 분리시켰다. 배양액은 4°C, 10,000G로 20분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 배양액에 남아 있는 균체는 체에 걸러 분리한 균체와 XAD-16수지에 포함시켰다.

배양액으로부터 분리시킨 균체와 XAD-16 수지를 acetone으로 6시간 동안 실온에서 추출하였다. 거름종이를 사용하여 균체와 XAD-16 수지를 분리하고, 다시 acetone으로 6시간 동안 추출하였다. 여러 번의 acetone을 사용하여 균체와 XAD-16 수지에 흡착되어 있는 대사산물을 완전히 추출한 후, 감압 농축기로 농축하여 acetone 추출물을 얻었다.



3.2.2. 대사산물의 분획

Acetone 추출물을 농축한 후 H₂O 층과 EtOAc 층으로 분획하여 배지 성분을 제거하였고, EtOAc층은 sodium sulfate로 처리하여 물을 완전히 제거한 후 농축하였다. EtOAc 층은 다시 MeOH과 *n*-heptane으로 재분획하여 무극성의 세포성분을 제거하였고, 이렇게 얻어진 MeOH 층을 농축하여 얻은 농축물을 XE(XAD extract)라 명명하고 이를 각종 생물활성 실험의 시료로 하였다(그림 6).

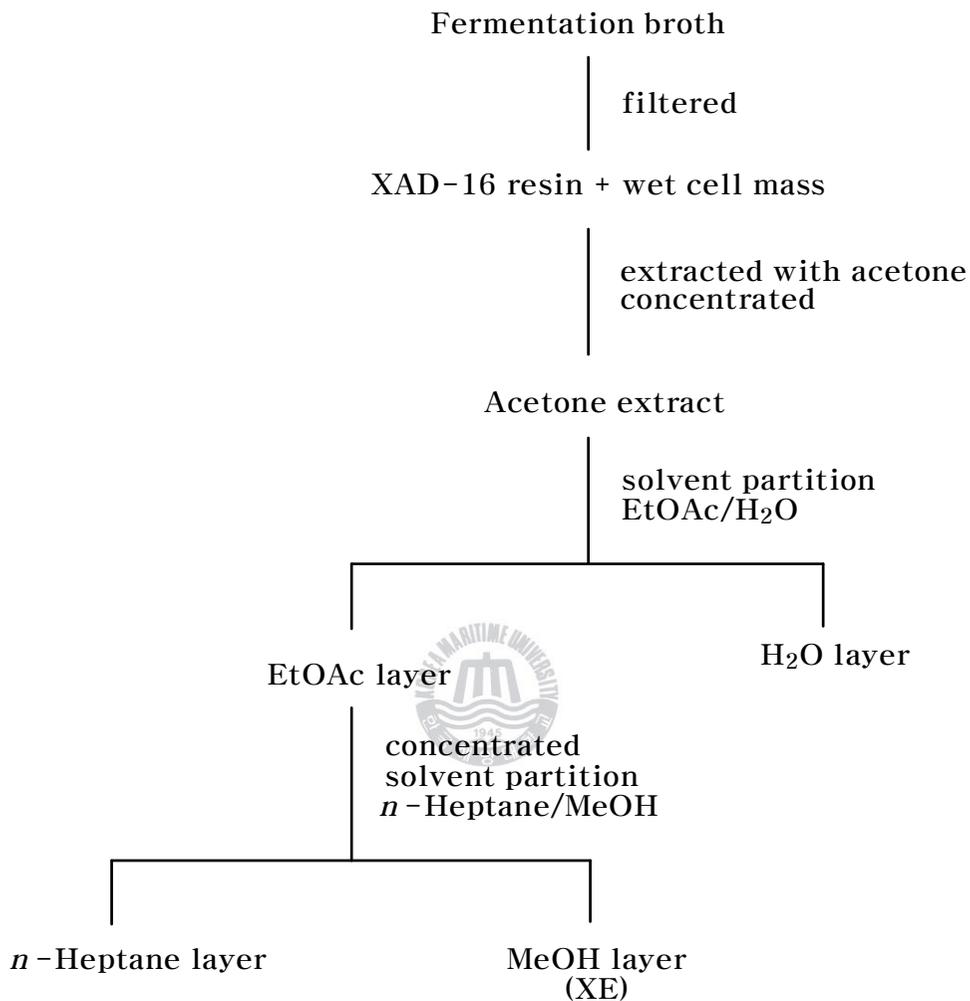


Figure 6. Work-up procedure of *Sorangium cellulosum* isolates.

4. Strain KM1045가 생산하는 세포독성물질의 분리

Strain KM1045 대사산물의 분획 과정을 통해 얻은 XE를 CH_2Cl_2 에 녹여 silica gel column chromatography를 실시하였다. 용출용매는 CH_2Cl_2 와 MeOH의 혼합액을 사용하였으며, CH_2Cl_2 (fraction 1), CH_2Cl_2 :MeOH 95:5(fraction 2), CH_2Cl_2 : MeOH 9:1(fraction 3), CH_2Cl_2 :MeOH 8:2(fraction 4), MeOH(fraction 5)의 순으로 step gradient 하였다.

세포독성 실험을 통하여 얻은 활성 분획물인 CH_2Cl_2 :MeOH 95:5(fraction 2)를 다시 CH_2Cl_2 에 녹여 silica gel column chromatography 하였다. 용출용매로는 CH_2Cl_2 :acetone의 혼합액을 사용하였으며, CH_2Cl_2 :acetone 95:5(fraction 6), CH_2Cl_2 : acetone 9:1(fraction 7), CH_2Cl_2 :acetone 8:2(fraction 8), CH_2Cl_2 : acetone 7:3(fraction 9), CH_2Cl_2 : acetone 5:5 (fraction 10), acetone(fraction 11)의 순으로 step gradient 하였다.

독성을 보인 CH_2Cl_2 :acetone 7:3(fraction 9)를 MeOH에 녹여 RP-18 MPLC 하였다. 50% aq. MeOH(fraction 12), 60% aq. MeOH(fraction 13), 70% aq. MeOH(fraction 14), 80% aq. MeOH(fraction 15), MeOH(fraction 16)의 순으로 step gradient 하여 다섯 개의 분획물을 확보한 후, 각 분획물에 대해 세포독성을 조사하였다.

세포독성을 나타낸 80% aq. MeOH fraction을 63% aq. MeOH을 용매로 하여 RP-18 HPLC하여, UV 270nm에서 강한 흡수를 활성물질을 순수 분리하였다(그림 7).

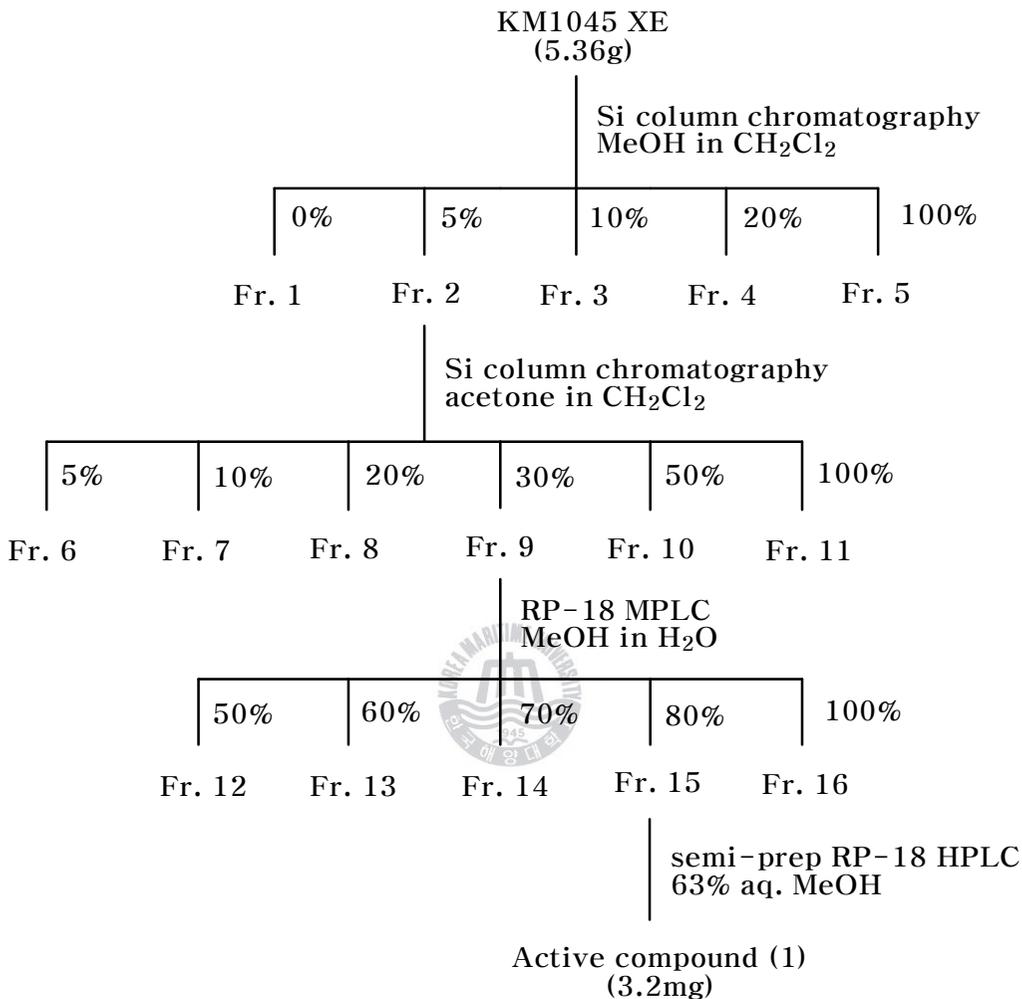


Figure 7. Isolation of a cytotoxic compound(1) from *S. cellulosum* KM1045.

5. Strain KM1033이 생산하는 항균물질의 분리

Strain KM1033 대사산물의 분획과정을 통해 얻은 XE를 CH_2Cl_2 에 녹여 silica gel column chromatography 하였다. 용출용매는 CH_2Cl_2 과 MeOH 혼합용매를 사용하였으며, CH_2Cl_2 (fraction 1), CH_2Cl_2 :MeOH 95:5(fraction 2), CH_2Cl_2 :MeOH 9:1(fraction 3), CH_2Cl_2 :MeOH 8:2(fraction 4), MeOH (fraction 5)의 순으로 step gradient 하였다.

항균활성 분획물인 CH_2Cl_2 :MeOH 95:5(fraction 2)을 다시 CH_2Cl_2 에 녹여 silica gel column chromatography 하였다. 용출용매는 CH_2Cl_2 과 acetone 혼합액을 사용하였으며, CH_2Cl_2 (fraction 6), CH_2Cl_2 :acetone 95:5(fraction 7), CH_2Cl_2 :acetone 9:1(fraction 8), CH_2Cl_2 :acetone 8:2(fraction 9), CH_2Cl_2 :acetone 7:3(fraction 10), CH_2Cl_2 :acetone 5:5(fraction 11)의 순으로 step gradient 하였다.

항균활성 fraction인 CH_2Cl_2 :acetone 8:2(fraction 9)를 MeOH에 녹여 RP-18 gel column chromatography 하였다. 70% aq. MeOH(fraction 12), 80% aq. MeOH(fraction 13), 90% aq. MeOH(fraction 14), MeOH(fraction 15)의 용매로 step gradient 여 4개의 분획물을 분리한 후 각각의 분획물에 대해 항균실험을 하였다.

항균활성을 보인 80% aq. MeOH fraction을 CH_2Cl_2 :*n*-hexane:MeOH 50:50:1을 용매로 하여 silica gel HPLC한 다음, UV 232nm에서 강한 흡수를 보이는 main fraction을 최종적으로 74% aq. MeOH을 용매로 RP-18 HPLC 하여 항균물질을 순수 분리하였다(그림 8).

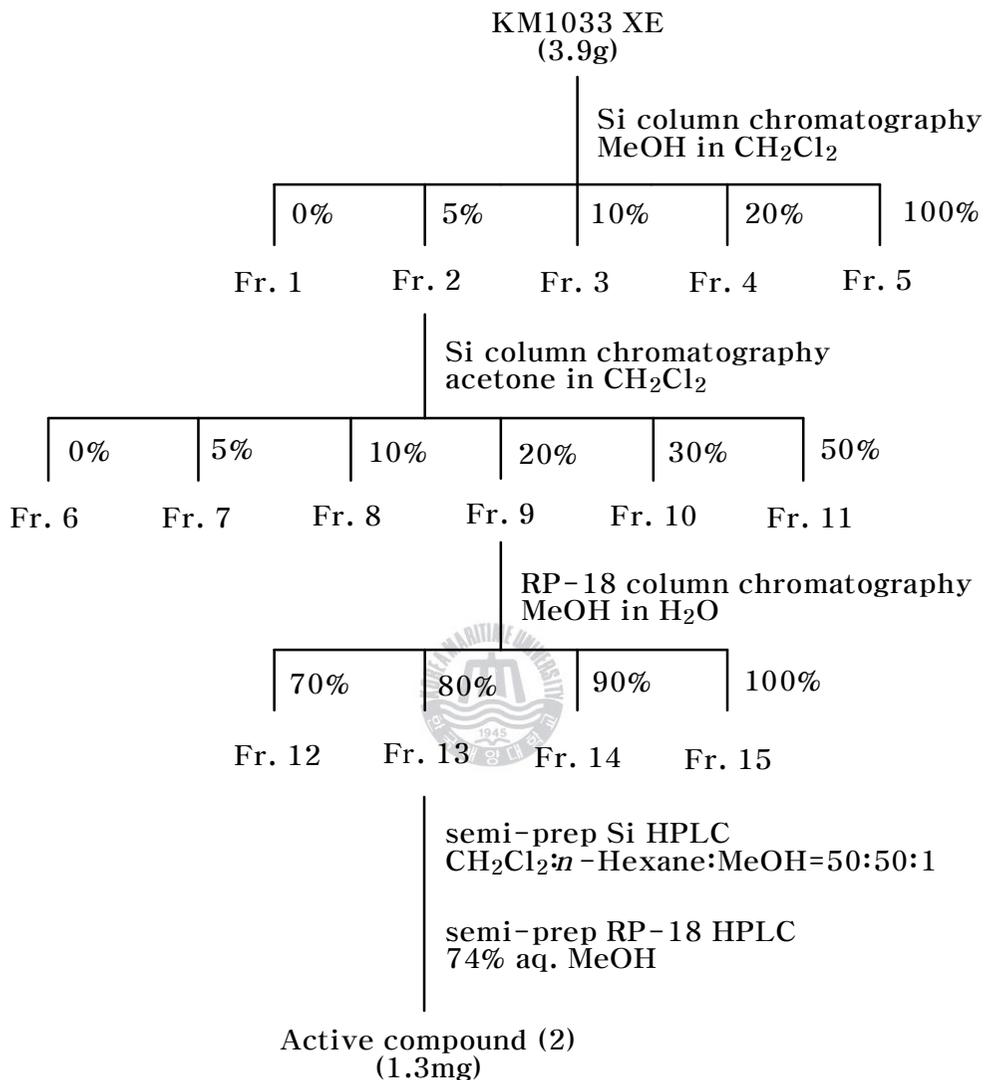


Figure 8. Isolation of an antimicrobial compound(2) from *S. cellulosum* KM1033.

6. 생물활성 측정

6.1. 항균활성

항균활성 측정은 paper disc 확산법을 사용하였으며, 실험에 사용된 균은 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 구입하였다. Gram 양성 세균으로 *Staphylococcus aureus*(KCTC 1916)를, gram 음성 세균으로 *Escherichia coli*(KCTC 12006)를 사용하였고, 진균류로는 *Saccharomyces cerevisiae*(KCTC 7246)와 *Rhodotorula rubra*(KCTC 1209), *Candida albicans*(TCTC 7965)를 항균활성 실험에 사용하였다.

S. aureus, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *R. rubra*, *C. albicans*를 nutrient agar 배지, yeast extract agar 배지, micrococcus agar 배지에 각각 streak culture하여 30°C B.O.D incubator에서 활성화시켰다. 활성화 된 세균 및 효모의 colony를 멸균 증류수에 희석하였다. 균희석액 100 μ L를 배지에 각각 분주 한 후, 화염 멸균한 도말봉으로 도말하였다. 멸균한 직경 6mm의 paper disc에 시료용액을 20 μ L 씩 각각 loading 한 후, clean bench에서 20분간 건조시켜 균을 도말한 배지 위에 간격이 3.0cm 정도 되도록 올려주었다. 이때 대조구로서 MeOH:CH₂Cl₂ 1:1 비율로 혼합된 용매를 사용하였고, 대조약물로는 Ciprofloxacin과 Nystatin을 사용하였다. Paper disc를 loading한 각각의 배지를 30°C B.O.D incubator에서 48시간 배양 후 vernier caliper로 inhibition zone의 크기를 측정하였다.

6.2. 세포독성

세포독성은 인체 폐암세포주인 A549(non small cell lungcarcinoma), 난소암세포주인 SK-OV-3(adenocarcinoma, ovary malignant ascites), 흑색종세포주인 SK-MEL-2(malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), 중추신경계 암세포주인 XF498(central nerve system tumor), 대장암세포주인 HCT15 (colon adenocarcinoma)에 대해 실험하였다. 각 세포는 모두 human origin tumor cell line 으로, 미국 국립암연구소(NCI)로부터 분양받아 한국화학연구소에서 계대배양 중인 것을 사용하였다. 배양액은 5% fetal bovine serum 으로부터 보강된 RPMI 1640 medium을 사용하였으며, 37°C 항온 항습 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포의 계대는 3~4일에 1회씩 하였으며, 계대 시 세포를 용기 부착면으로부터 분리시키기 위하여 phosphate buffered saline(PBS) 용액에 0.25% trypsin 과 3mM trans-1,2-di-aminocyclohexane-n,n,n,n,-tetra acetic acid (CDTA)를 녹인 용액을 사용하였다³⁷⁾.

세포독성은 1989년에 미국의 국립 암연구소에서 약물의 *in vitro* 항암 활성을 1차적으로 측정하기 위하여 개발된 sulforhodamine B(SRB) assay 방법을 사용하였다. 즉 계대 중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 우선 trypsin-CDTA 용액으로 용기 부착면으로부터 분리시키고, 96 well flat bottom microplate(Falcon)에 각 well 당 세포수가 5×10^3 (A 549, HCT 15), 1×10^4 (SK-MEL-2, XF 498), 2×10^4 (SK-OV-3)이 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 CO₂ incubator 내에서 24시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후 aspirator로 배지를 제거하고 6농도의 log dose 로 medium으로 희석한 검체 용액들을 세포가 들어있는 well에 각각 3

배수(triplicate)로 넣어주고, 48시간 동안 더 배양하였다. 검체용액들을 조제하기 위하여 필요에 따라 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용하였으며, 이때 세포에 가해지는 DMSO 농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다. 또한 이렇게 희석한 검체용액은 세포에 가하기 전에 milipore filter로 여과하여 실험의 무균 상태를 유지하였다. 세포를 약물과 48시간 배양한 후 각 well의 배지를 제거하고 10% trichloro-acetic acid(TCA)를 100 μ L 씩 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 실온에서 남아있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well 당 100 μ L 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색 용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과잉의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조시킨 후 well 당 100 μ L의 10 mM trisma base(unbuffered) 용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 교반하여 염색액을 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

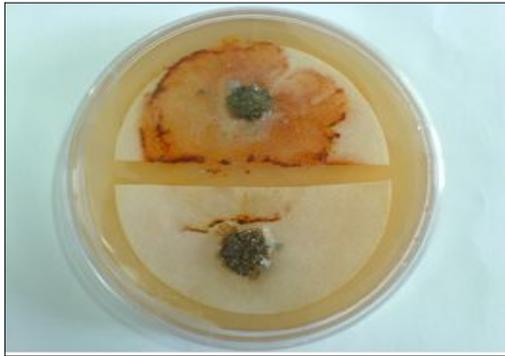
각각의 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가하는 시점에서의 세포 수(T_z , zero time)와 약물 대신 동량 성분의 배지만을 가하여 48시간 배양했을 때의 세포 수(C , control) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포 수(T , test) 을 각각 측정하여, $T_z \leq T$ 인 경우에는 $[(T - T_z)/(C - T_z)] \times 100$ 의 수식으로 계산하였으며, $T_z \geq T$ 인 경우에는 $[(T - T_z)/T_z] \times 10$ 의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Cellulolytic myxobacteria의 분리 및 동정

토양 시료 채집 및 처리과정을 통해 지역별로 분리한 약 3000점의 토양 시료를 지역별로 일정 수 선발하였다.

ST21CX agar 배지상의 여과지 위에 선발된 토양시료를 loading하여 30°C B.O.D incubator에서 배양 하였으며, 현미경으로 균의 출현 및 성장 유무를 매일 관찰하였다. 7~14일 정도 배양 후 여과지가 용해된 것이 관찰 되었으며, 그 주위로 많은 잡균과 함께 섞여 있는 cellulolytic myxobacteria의 자실체를 발견할 수 있었다. 최대한 잡균이 섞이지 않은 cellulolytic myxobacteria의 자실체를 백금이를 사용하여 용해된 여과지와 함께 소량 분리하여 새로운 ST21CX 배지에 옮겼다. 3~4번의 동일한 과정을 통해 어느 정도 분리된 cellulolytic myxobacteria를 얻을 수 있었으나, 더욱 순수하게 분리하기 위해 cycloheximide와 kanamycin가 첨가된 KAN4 agar 배지로 계대하였다. KAN4 agar 배지에서 3~7일 정도 배양 후 멸균된 먹이균 주위로 cellulolytic myxobacteria의 swarm이 뻗어 나가는 것이 관찰되었으며, 잡균이 없는 깨끗한 부위를 화염멸균한 백금으로 소량 긁어내어 새로운 KAN4 agar 배지에 옮겨주었다. 3~4번의 동일한 조작으로 순수한 cellulolytic myxobacteria를 얻었으며 이를 Vy/2 agar 배지에 무균적으로 계대하였다. Clean bench에서 무균적으로 계대한 cellulolytic myxobacteria의 집락을 Vy/2 agar 배지에 streak culture하여 균체량을 확보하여 보관하였고, 이러한 방법을 통해 총 96균주의 cellulolytic myxobacteria를 분리하였다(그림 9).



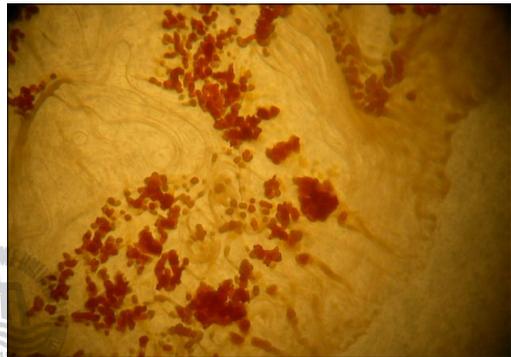
ST21CX agar plate



ST21CX agar plate



KAN4 agar plate



Vy/2 agar plate

Figure 9. The swarm colony of cellulolytic myxobacteria on agar plates.

이렇게 분리된 cellulolytic myxobacteria들은 여과지를 용해하여 성장에 이용하며 멸균 *E. coli*는 먹이로 이용할 수 있으나, 살아있는 *E. coli*는 먹이로 이용하지 못하였다. 또한 고체배지에서 포자를 형성하고 그 포자가 간균의 형태를 띠고 있음을 관찰할 수 있었다. 분리된 cellulolytic myxobacteria들은 gram 염색을 하였을 때 붉은색을 나타내어 gram 음성 세균임을 알 수 있었고, Congo red에 염색되지 않았다. Oxidase test와 urease test에서는 모두 음성으로 나타났으며, nitrate

reduction test와 starch hydrolysis test에서는 모두 양성으로 관찰되었다. 액체배양 시 배양 플라스크에 점액질의 띠를 형성함과 동시에 그 배양액이 맑아졌으며 처음 배지와 같이 무색임을 확인하였다(표 14).

이상의 결과를 토대로 분리된 96균주의 cellulolytic myxobacteria를 *Sorangium cellulosum*으로 동정하였으며, 대표균주로 선정한 KM1014 균주를 한국 미생물 보존 센터에 의뢰하여 수행된 16s rRNA 염기서열의 비교분석을 통해 *S. cellulosum*에 속하는 것임을 재확인하였다.

Mixobacteria는 다른 세균이나 미생물을 분리하는 일반적인 방법으로는 자연계로부터 분리되지 않을 뿐 아니라, single colony의 형성이 어려운 점, 저영양균인 점, 성장속도가 느린 점, 배양조건이 까다로운 점들로 인해 타 미생물에 비해 많은 선행연구가 이루어지지 않았으며³⁴⁾, 이렇게 부족한 선행연구로 인해 아직 그 분류가 명확히 확립되어 있지 않았다. 현재까지 myxobacteria는 16속 47종이 알려져 있으며 그 중에서 cellulolytic myxobacteria는 *Sorangium cellulosum* 1종만이 인정되고 있다^{1,23)}.

이러한 상황에서 본 실험을 통해 국내에서 처음으로 *S. cellulosum*의 분리방법을 자체 확립하였고, 총 96균주를 분리하여 보존하고 있다는 점은 주목할만한 가치가 있다고 생각된다.

Table 14. Morphological and physiological characteristics of *Sorangium cellulorum*.

Gram staining		—
Fruiting bodies on Vy/2	deliquescent	—
	consist of sporangioles	+
Myxospores	cylindrical rods	+
	optically refractile	+
Swarm	stained with Congo red	—
Enzyme activity of	oxidase	—
	urease	—
Pigment production		—
Nitrate reduction		+
Starch hydrolysis		+
Cellulose digestion		+

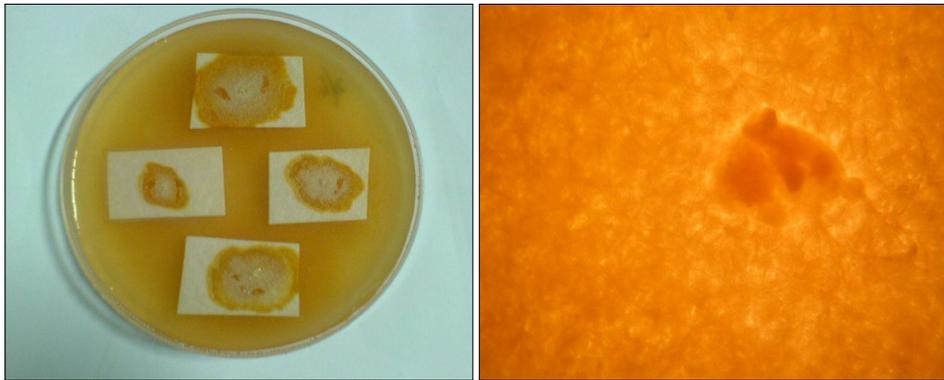


2. 분리된 *S. cellulosum*의 특성

Cellulolytic myxobacteria는 분류학적으로 모두 *S. cellulosum* 한 종에 속하는 것으로 되어 있지만, 본 연구에서 분리된 균주들은 형태적으로 서로 많은 차이를 나타내었다.

S. cellulosum 균주의 분리 및 순화과정에서 처음 ST21CX agar 배지에 시료를 올린 후 관찰을 통해 여과지를 용해하는 특징 외에도 이들의 swarm 및 자실체가 균주에 따라 yellow, orange, black 세 종류의 색을 띠고 있음이 관찰되었다(그림 10). KAN4 agar 배지에서 이들의 swarm은 먹이균을 따라 물결 모양으로 퍼져나가는 특징적 모습을 나타내었으며, 또한 균주에 따라 세 가지 종류의 색이 관찰되었다(그림 11). Vy/2 agar 배지에서는 균체의 색이나 활주운동 외에 균체가 배지 위로 둔덕을 형성하거나 배지 아래로 파고드는 형태, 배지 표면에 뺏어나가는 형태의 다른 생장특성이 관찰되었다(그림 12). 액체배양에서도 유사한 차이가 나타났으며, 동시에 myxobacteria의 특성이라 볼 수 있는 배양 플라스크 벽에 점액질의 띠가 형성되었다(그림 13). 이밖에도 *S. cellulosum* 균주의 분리 및 순화과정에서 균체의 색이 시간이 지남에 따라 yellow에서 black으로, 또는 red에서 black으로 변하는 균주가 발견되었으며, 액체배양에서 yellow에서 red나 black으로 변하거나 black에서 red나 yellow로 변하는 것이 있었다.

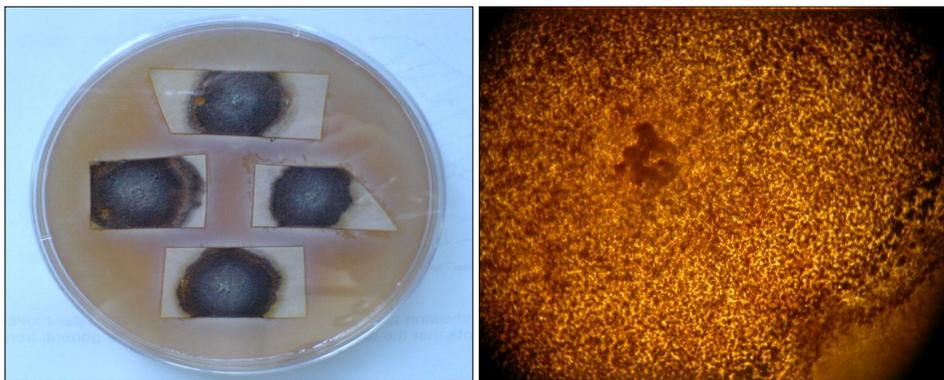
이와 같은 배양 시 형태적 특성으로 볼 때 *S. cellulosum*은 적어도 세 가지 이상의 다른 종으로 분류되어야 할 것으로 판단되며, 분류에 관한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.



Yellow type

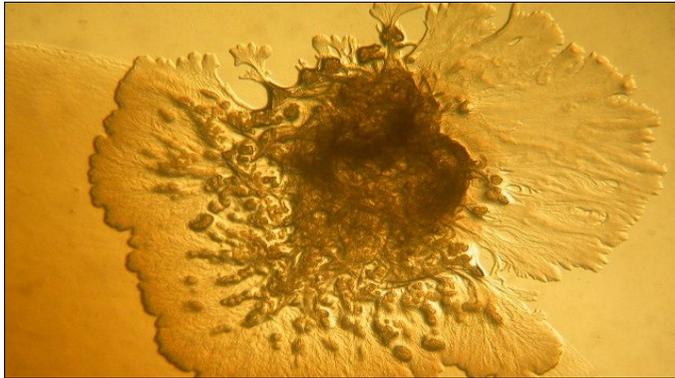


Red type

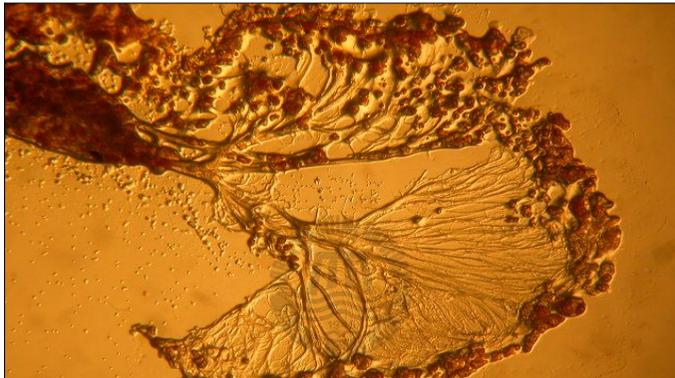


Black type

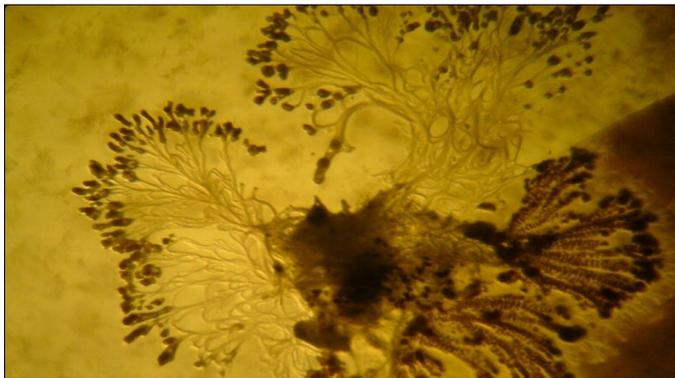
Figure 10. The characteristics of *S. cellulosum* on a filter paper on top of a ST21CX agar plate.



Yellow type



Red type



Black type

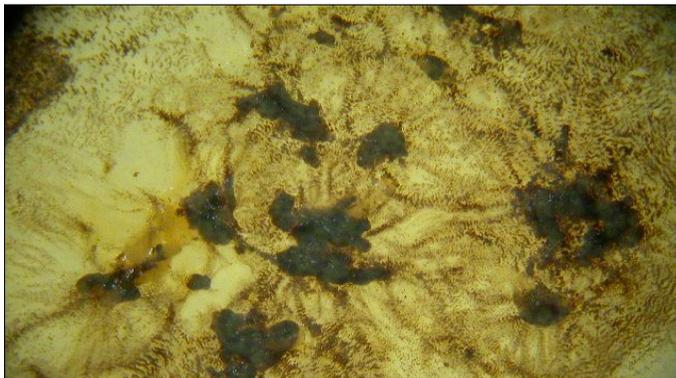
Figure 11. The characteristics of *S. cellulosum* on a KAN4 agar plate.



Yellow type



Red type

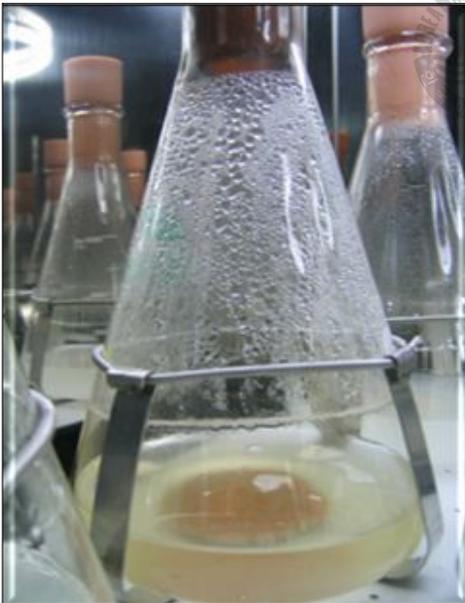


Black type

Figure 12. The characteristics of *S. cellulosum* on a Vy/2 agar plate.



Yellow type



Red type



Black type

Figure 13. Cultural characteristic of *S. cellulosum* in a shaker flask culture.

3. 대사산물의 항균활성 스크리닝

토양 시료로부터 분리된 총 77균주의 *S. cellulosum* 균주에 대해 그 대사산물을 대상으로 항균활성을 스크리닝 한 결과를 표 15에 나타내었다.

스크리닝을 한 77균주 중 89%인 69균주에서 항균활성이 측정되었으며 gram 음성 세균인 *E. coli*에서는 18.2%인 14균주에서, gram 양성 세균인 *S. aureus*에서는 54.6%인 42균주에서, 효모 *R. rubra*에서는 7.8%인 6균주, *C. albicans*에서는 33.8%인 26균주에서 그 활성이 나타났다. 이로 *S. cellulosum*은 대부분이 세균이나 진균류에 대해 활성을 가지는 대사산물을 생산함을 알 수 있었으며, 대체적으로 gram 양성 세균인 *S. aureus*에 대한 활성이 있는 균주가 많이 존재하고 효모인 *C. albicans*에 대해서도 많은 균주들이 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

이는 *S. cellulosum*의 배양액으로부터 분리한 대사산물의 약 95%가 생물학적 활성이 있다는 독일의 GBF의 연구결과와 유사함을 확인할 수 있었으며, 이들 중 46%는 천연물에서 새롭게 분리된 생산물이었다는 보고에 빚대어 볼 때 연구할 가치가 높음을 알 수 있었다²⁴⁾.

Table 15. Bioassay-based screening of *S. cellulosum* strains producing antimicrobial secondary metabolites.

Strain	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition zone (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>R. rubra</i>	<i>C. albicans</i>
KM1001	50000	—	—	—	7.4
KM1002	50000	—	—	—	11.1
KM1003	10000	—	±	—	—
KM1004	10000	—	8.9	—	—
KM1006	10000	±	—	—	—
KM1007	10000	—	—	—	9.1
KM1008	10000	—	—	—	11.2
KM1010	50000	9.8	—	—	8.8
KM1011	50000	±	±	—	10.1
KM1013	50000	±	±	—	—
KM1014	50000	—	—	—	14.0
KM1015	40000	—	—	—	8.5
KM1016	10000	—	13.6	—	—
KM1017	10000	±	—	—	—
KM1018	10000	—	10.5	—	—
KM1019	10000	—	8.6	—	—
KM1020	10000	—	±	—	—
KM1021	50000	—	—	—	12.7
KM1022	50000	—	—	—	14.9
KM1023	50000	—	±	—	—
KM1024	10000	—	—	8.8	—
KM1025	50000	—	—	—	13.4
KM1027	20000	—	±	—	—
KM1028	40000	15.5	—	±	—

KM1029	10000	±	—	—	—
KM1031	10000	—	—	—	±
KM1032	10000	—	11.9	—	—
KM1033	50000	—	12.1	—	27.3
KM1034	50000	—	11.2	—	—
KM1035	50000	±	—	—	—
KM1036	50000	—	±	—	—
KM1037	50000	—	—	—	—
KM1040	50000	±	—	—	—
KM1041	50000	—	27.2	—	—
KM1042	50000	—	—	±	—
KM1043	50000	—	12.8	—	—
KM1044	50000	—	±	—	—
KM1045	10000	—	±	—	—
KM1049	50000	11.0	9.5	—	—
KM1050	50000	±	—	—	9.7
KM1051	50000	—	9.8	—	12.5
KM1052	50000	—	21.4	—	13.6
KM1054	10000	—	—	15.9	—
KM1055	10000	—	—	—	—
KM1056	10000	—	—	—	—
KM1057	10000	—	—	—	—
KM1059	10000	—	—	±	—
KM1060	50000	—	8.7	—	—
KM1063	10000	—	14.1	—	—
KM1064	50000	—	—	—	—
KM1065	10000	—	—	11.0	—
KM1066	10000	—	7.0	—	—
KM1067	50000	—	9.1	—	—



KM1068	50000	—	9.5	—	—
KM1071	50000	—	11.4	—	—
KM1072	50000	—	9.3	—	—
KM1073	50000	—	11.5	—	—
KM1074	50000	—	—	—	15.1
KM1075	50000	—	6.8	—	9.9
KM1076	50000	10.5	±	—	—
KM1077	50000	8.0	—	—	—
KM1078	50000	—	17.0	—	10.8
KM1080	50000	—	±	—	10.6
KM1082	50000	—	11.9	—	7.5
KM1083	50000	—	7.6	—	—
KM1084	50000	—	8.1	—	—
KM1085	50000	—	12.8	—	—
KM1086	50000	—	—	—	—
KM1087	50000	—	—	—	16.2
KM1088	50000	—	8.8	—	14.8
KM1089	50000	—	14.8	—	9.6
KM1090	50000	—	9.5	—	8.9
KM1092	50000	—	—	—	15.2
KM1093	50000	—	19.5	—	—
KM1094	50000	—	—	—	—
KM1095	50000	—	—	—	—
KM1096	50000	±	8.4	—	—

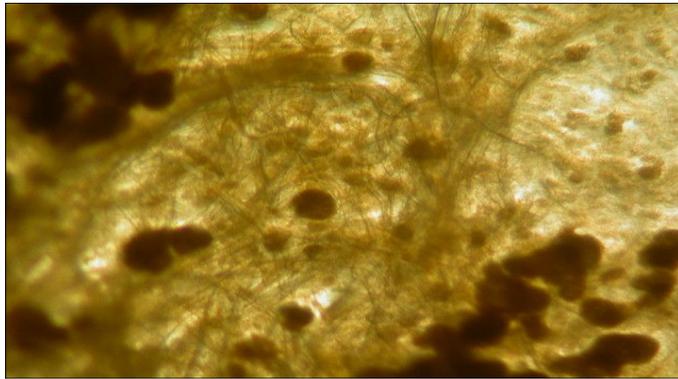
Determined by the agar diffusion test using paper disks of 6mm diameter.

4. Strain KM1045의 특성

대전에서 채집한 토양시료에서 cellulolytic myxobacteria의 분리 및 동정에 의해 분리된 strain KM1045는 ST21CX agar 배지에서 여과지를 용해하는 black type의 *S. cellulosum*으로, KAN4 agar 배지에서는 먹이균을 따라 나뭇가지 모양으로 뻗어나가는 brown색의 swarm의 형태가 관찰되었다. Vy/2 agar 배지에서는 균체들이 집락을 형성하여 둔덕을 이루었다. 액체배양 시 배양 플라스크 표면에 점액질의 띠를 생성하였으며 배양동안 배양액이 맑아졌다(그림 14). 30℃에서 배양 시 그 성장이 좋았으며 특히 다른 균주에 비해 Vy/2 agar 배지와 액체배양에서 빠른 성장 속도를 보였다.

이와 같은 배양상의 특징과 더불어 충분한 대사산물의 생산과 강력한 암세포증식억제활성을 보인 세포독성실험을 토대로 strain KM1045를 실험 균주로 선정하였다.

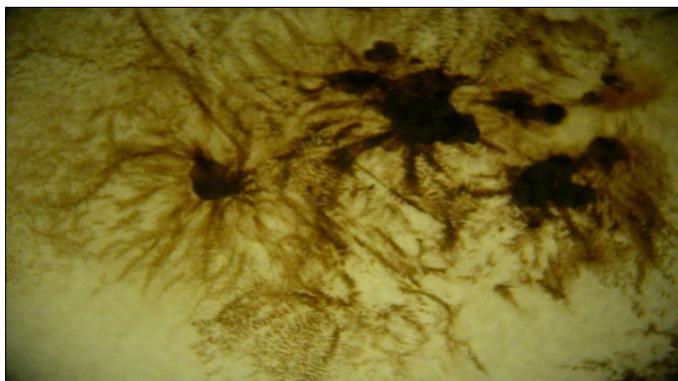




ST21CX agar plate



KAN4 agar plate



Vy/2 agar plate

Figure 14. The swarm colony of *S. cellulosum* KM1045 on agar plates.

5. Chivosazole F의 구조동정 및 생물활성

5.1. Chivosazole F의 구조동정

활성물질 compound 1은 선정된 strain KM1045의 배양으로부터 얻은 대사산물을 대상으로 여러 가지 column chromatography를 통해 순수하게 얻은 strain KM1045의 최종 대사산물이다. 총 60L의 액체배양으로부터 3.2mg 얻었으며, 이를 1D 및 2D NMR과 MS, UV, IR data를 종합하여 그 구조를 예상하였고 결정하였다.

Compound 1은 무정형의 고체로, HREI-MS와 ^{13}C NMR data를 바탕으로 $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{NO}_8$ (m/z 691 [M^+])의 분자식을 확립하였다.

Table 16. Physico-chemical properties of compound 1.

Appearance	amorphous solid	
Molecular formula	$\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{NO}_8$	
HREI-MS	Found	691.4061 [M^+]
	Calcd.	691.4084
UV λ_{max} (MeOH) nm	277	
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1}	3426, 2973, 2932, 2881, 2828, 1576, 1598, 1457, 1382, 1314, 1273, 1189, 1101, 1071, 996, 948, 825	
RP-TLC (Rf)		
MeOH-H ₂ O(85:15)*	0.38	
Solubility	Soluble	MeOH, CH ₂ Cl ₂ , Acetone
	Insoluble	H ₂ O, EtOAc, <i>n</i> -Heptane, <i>n</i> -Hexane

*RP-18 F₂₅₄ plate

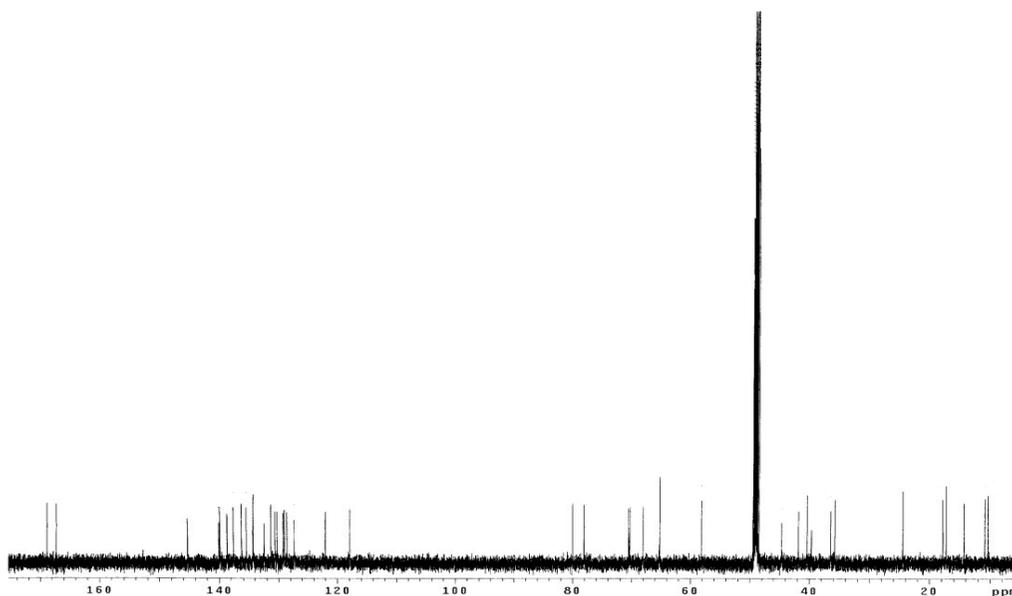


Figure 15. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

Compound 1의 모든 carbon 원소는 ^{13}C NMR data에서 확인할 수 있었으며(그림 15), ^{13}C NMR data를 통하여 4개의 quaternary carbon(δ_c 168.9, δ_c 134.3, δ_c 140.1, δ_c 167.3)이 존재하며 이 중에서 δ_c 168.9(C-1)과 δ_c 167.3(C-18)의 carbon은 carbonyl carbon임을 예상할 수 있었다. gHSQC 실험을 통해 carbon과 직접 결합된 proton을 모두 밝힐 수 있었으며(부록 3), ^{13}C NMR 과 ^1H NMR , gHSQC data의 분석을 통해서 4개의 exchangeable proton과 , 28개의 methine, 2개의 methylene, 7개의 methyl의 존재를 확인할 수 있었다(그림 15, 16, 부록 3). 또한 carbon의 chemical shift에 의해 이들이 20개의 sp^2 carbon(δ_c 117.9, δ_c 145.3, δ_c 130.6 , δ_c 139.9, δ_c 129, δ_c 139.8, δ_c 134.3, δ_c 136.3, δ_c 132.4, δ_c 131.3, δ_c 127.3, δ_c

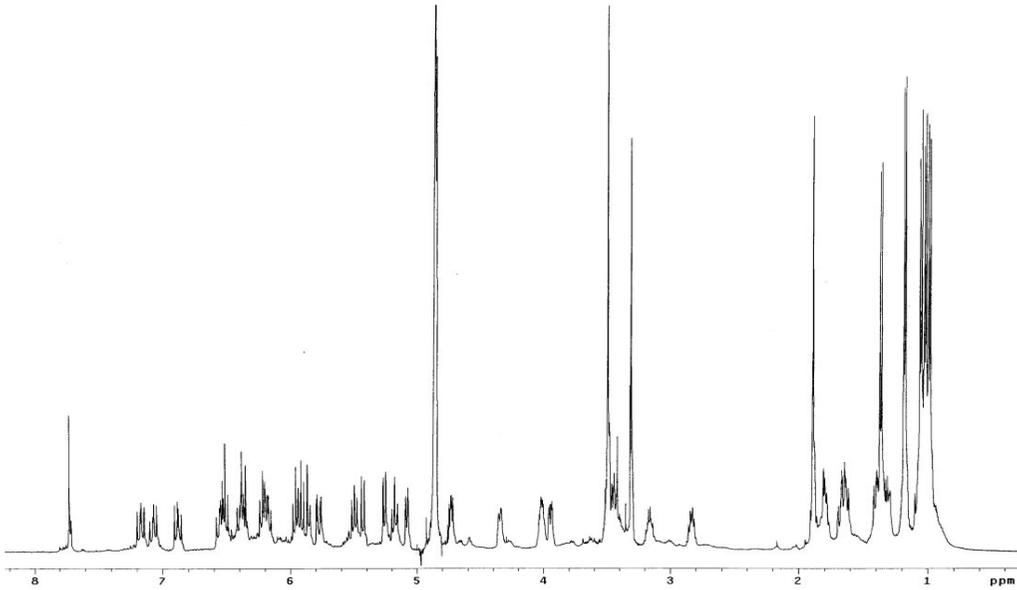


Figure 16. ^1H NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

122, δ_c 140.1, δ_c 137.6, δ_c 138.7, δ_c 129.2, δ_c 134.4, δ_c 128.5, δ_c 130.2, δ_c 135.4)와 7개의 oxymethine carbon(δ_c 70.5, δ_c 80.0, δ_c 68.1, δ_c 78.1, δ_c 70.4, δ_c 65.2, δ_c 58.2), 그리고 한 개의 oxymethyl carbon으로 이루어짐을 예상 할 수 있었다.

Compound 1을 이루고 있는 네 개의 부분구조인 I, II, III, IV는 각각을 구성하고 있는 모든 proton signal의 correlation으로 인해 ^1H - ^1H COSY와 TOCSY 실험으로 충분히 결정할 수 있었다(그림 17, 부록 4, 5). 또한 gHMBC 실험을 통한 C-30의 methine proton(δ_H 5.25)에서 C-29(δ_c 35.7), C-32(δ_c 70.4), C-41(δ_c 10.3)로의 correlation에 의해 부분구조 I, II의 연결을 확인하였으며, C-36의 methyl proton(δ_H 1.88)에서 quaternary carbon(δ_c 134.3)과 두 개의 methine carbon

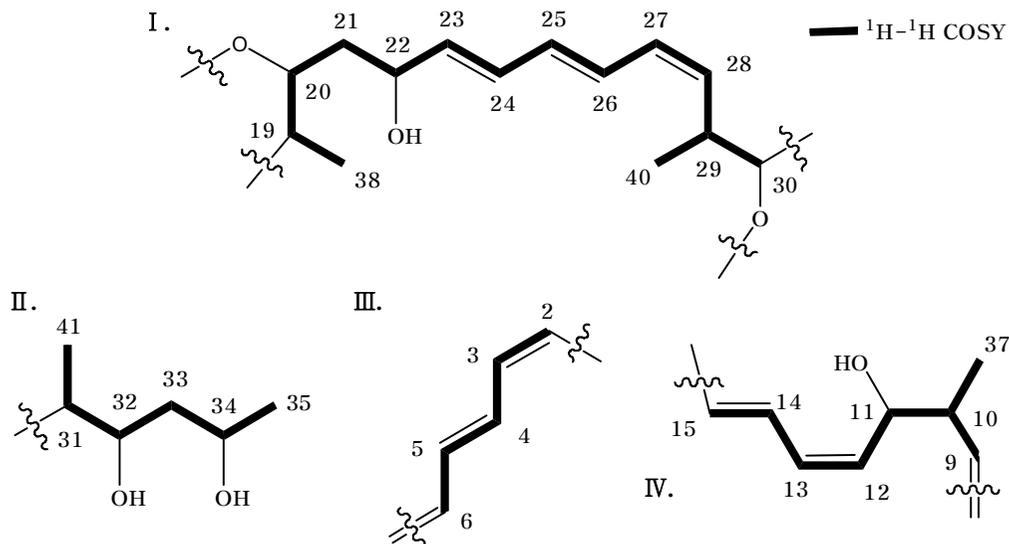


Figure 17. Partial structures(I) of compound 1.

인 C-7(δ_c 139.8)과 C-9(δ_c 136.3)로의 correlation에 의해 C-8 주위의 결합을 확인할 수 있었고, 이로 인해 III, IV의 연결을 확인하였다. Double bond의 configuration은 Z와 E bond의 vicinal coupling constant로부터 추론하였으며, 이러한 data의 해석으로 인해 최종적으로 두 개의 부분구조 A, B를 완성하였다(그림 18). EIMS와 ^{13}C NMR data를 바탕으로 얻은 분자식 $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{NO}_8$ 에서 부분구조를 예상하고 남은 세 개의 quaternary carbon(δ_c 168.9, δ_c 140.1, δ_c 167.3)과 하나의 methine carbon(δ_c 137.6), neighboring protone과 함께 남은 2개의 수소모자람지수에 의해 macrolide를 포함하는 두 개의 링이 존재함이 예상되었으며, 또한 δ_H 7.72(H-17)에서 두 개의 quaternary carbon(δ_c 140.1, δ_c 167.3)으로의 결합형태 등을 바탕으로 기존 cellulolytic myxobacteria

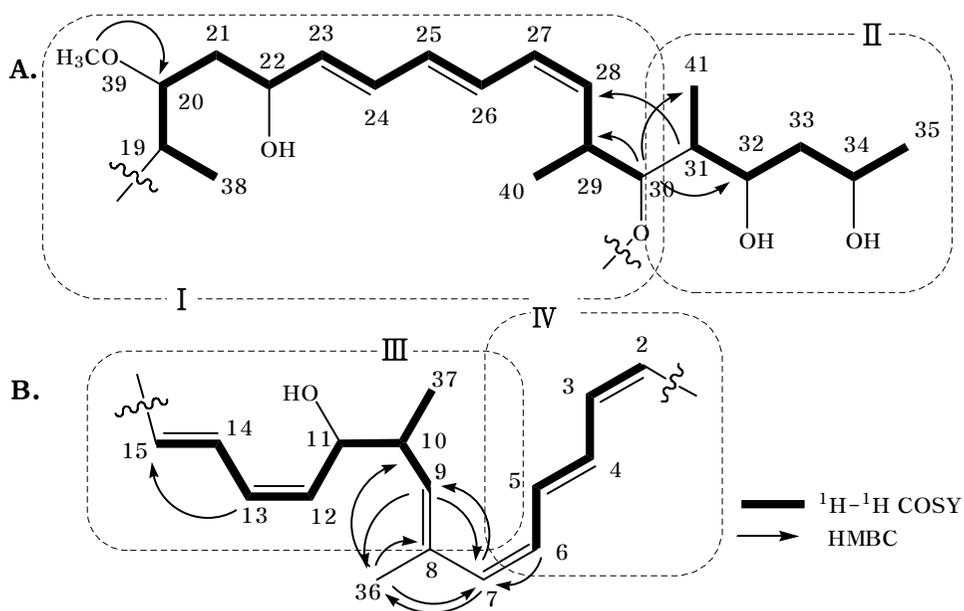


Figure 18. Partial structures(II) of compound 1.

의 이차대사산물에 대한 문헌을 참고로 하여 thiazole ring 혹은 oxazole ring의 존재를 예상할 수 있었다.

이러한 정보와 함께 부분구조를 바탕으로 *S. cellulosum*에 대한 문헌을 조사한 결과 이 화합물은 이전에 독일의 GBF연구소에 의해 myxobacteria로부터 분리되어 보고된 바 있는 chivosazole F로서, UV와 ^1H NMR data가 서로 동일함을 확인하였다^{8,25}.

1D 및 2D NMR data의 해석과 문헌조사로 인해 그림 20과 같은 Compound 1의 평면적 구조를 알 수 있었으며, ROESY 실험에 의해 active compound 1의 relative stereochemistry를 결정하였다(부록 7). 부분구조 A와 B의 relative stereochemistry는 그림 19에 나타내었으며, ROESY 실험으로부터 획득한 주요 NOE correlation은 표 17

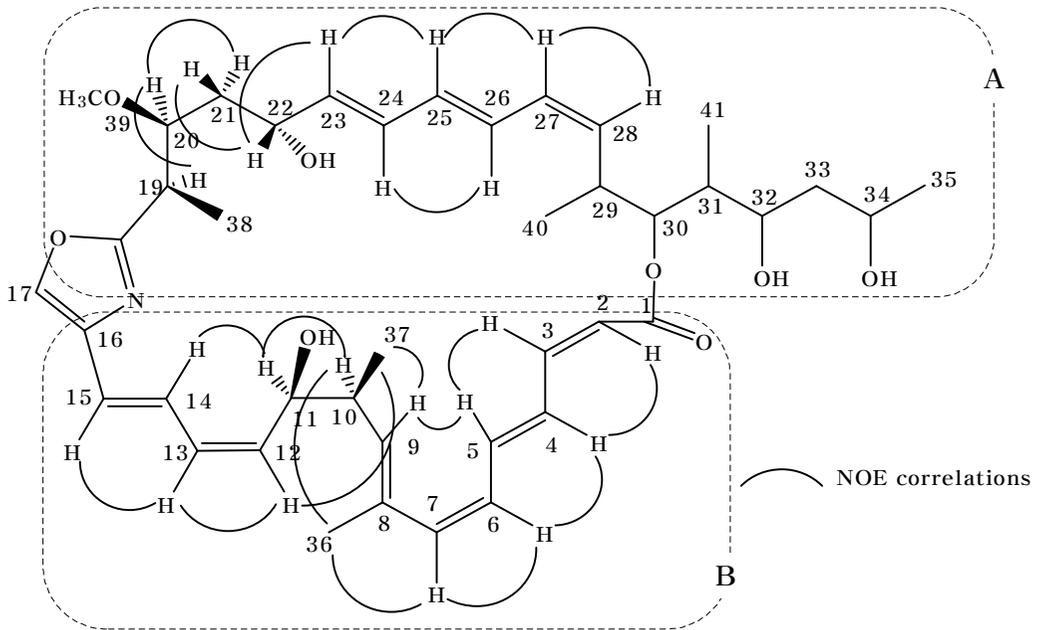


Figure 19. The structure of compound 1 with possible geometric configuration from the homonuclear 2D NMR experiments.

에 나타내었다. 전체구조를 위한 relative stereochemistry는 부분구조 A와 B사이의 확실한 NOE가 관찰되지 않아 밝혀질 수 없었다.

본 연구에 의해 밝혀진 compound 1의 구조는 1997년에 독일에서 이미 보고된 바 있는 chivosazole F와 동일하였다²⁵⁾. 하지만 본 연구에서 실시한 ROESY 실험의 결과, H-9(δ_H 5.07)와 H-5(δ_H 6.87) 사이에 나타난 분명한 NOE correlation은 H-5에 공간적으로 밀접해 있는 H-9의 conformation이 우선시 되어야 하며, 이때 H-2와 H-3 사이의 J값인 11.7Hz는 Z가 아닌 E로 해석해야함을 알 수 있었다. 이는 이전에 보고되었던 chivosazole F와 입체구조 상에서 차이를 보이는 것임을 알게 되었다²⁵⁾. 본 실험에 의해 밝혀진 H-9와 H-5사이의 NOE correlation은 앞서 연구된 chivosazole F를 위한 ROESY 실험에서는 나타나지 않았던

Table 17. The list of NOE data analyzed from the ROESY spectrum of compound 1.

Position	NOE correlation
H-2	H-3
H-3	H-2, H-5
H-4	H-6
H-5	H-3, H-9
H-6	H-4
H-7	H-36
H-9	H-5, H-6(w), H-7(w), H-12(w), H-11, H-37
H-10	H-11, H-36, H-37
H-11	H-10, H-14(w), H-36(w)
H-12	H-13, H-37
H-13	H-12
H-14	H-11
H-15	H-17
H-17	H-15
H-19	H-20, H-21- α (w), H-22
H-20	H-19, H-21- β
H-21- α (1.66)	H-21- β , H-22, H-23
H-21- β (1.06)	H-21- α , H-23
H-22	H-21- α
H-23	H-22, H-25
H-24	H-26
H-25	H-23, H-27
H-26	H-29, H-30
H-27	H-25, H-28
H-28	H-26, H-27
H-29	H-26, H-40
H-30	H-26, H-27, H-31, H-40
H-36	H-7, H-10, H-11
H-37	H-9, H-10, H-11(w), H-12
H-38	H-19, H-21- α
H-40	H-28
H-41	H-29, H-30, H-31, H-32

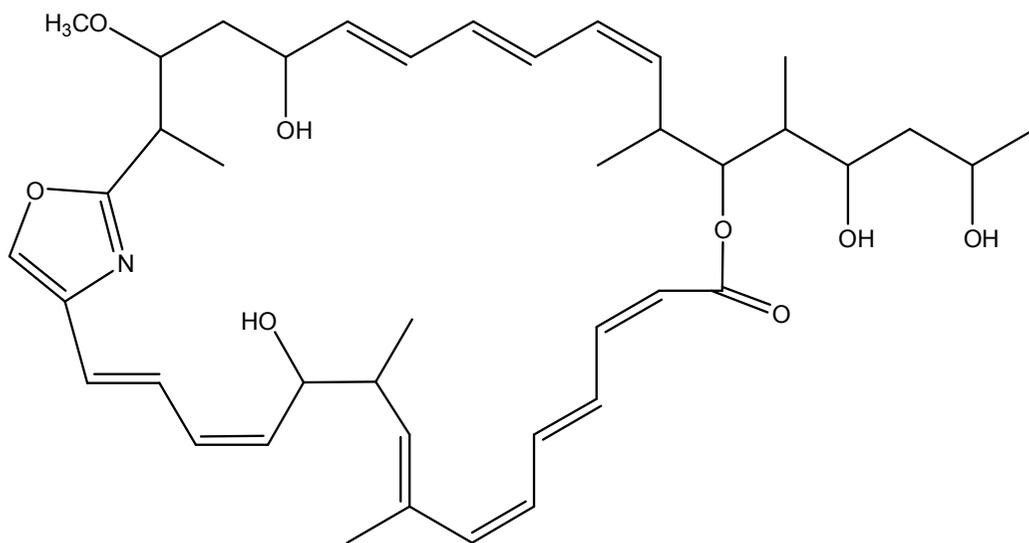


Figure 20. The structure of chivosazole F(1).

신호라는 점에서 본 연구에서 밝힌 compound 1의 구조가 더욱 근접하다고 생각되며, 또한 국내 토양에서 처음으로 chivosazole F를 분리·정제하였다는 점에서 본 실험은 의의를 갖는다고 생각된다.

Table 18. The ^1H and ^{13}C NMR assignments for compound(1).

	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1		168.9 s	
2	5.42 d (11.7)	117.9 d	C-1, C-4
3	6.50 dd (11.7, 11.7)	145.3 d	C-1, C-5
4	7.06 dd (15.1, 11.7)	130.6 d	C-6
5	6.87 dd (15.1, 10.7)	139.9 d	C-3
6	5.90 dd (11.2, 10.7)	129.0 d	C-7
7	5.84 d (11.2)	139.8 d	C-9, C-36
8		134.3 s	
9	5.07 d (8.8)	136.3 d	C-7, C-36
10	2.83 m	40.4 d	C-8, C-9, C-11, C-12, C-37
11	4.72 dd (9.2, 5.9)	70.5 d	C-13, C-37
12	5.49 dd (10.3, 9.2)	132.4 d	C-14
13	6.21 dd (11.7, 10.3)	131.3 d	C-11, C-15
14	7.16 dd (15.1, 11.7)	127.3 d	C-16
15	6.36 dd (15.1)	122.0 d	C-13, C-16
16		140.1 s	
17	7.72 s	137.6 d	C-16, C-18
18		167.3 s	
19	3.49 m	36.3 d	C-38
20	3.94 ddd (10.5, 3.9, 1.7)	80.0 d	
21	1.06 ddd (14.2, 10.8, 1.7)	39.6 t	C-20
	1.66 ddd (14.2, 10.5, 2.7)		
22	4.33 br d (9.8)	68.1 d	
23	5.76 dd (15.1, 3.5)	138.7 d	
24	6.38 ddd (15.1, 10.7, 1.7)	129.2 d	C-22
25	6.16 dd (14.6, 10.7)	134.4 d	C-27
26	6.54 dd (14.6, 11.3)	128.5 d	C-24
27	5.95 dd (11.3, 10.3)	130.2 d	C-25, C-29
28	5.17 dd (10.3, 10.3)	135.4 d	C-26
29	3.16 m	35.7 d	C-28, C-30, C-40
30	5.25 dd (10.2, 1.0)	78.1 d	C-1, C-29, C-32, C-41

31	1.78	m		41.8	d	C-28, C-32, C-41
32	3.44	m		70.4	d	
33	1.39	ddd	(14.2, 10.3, 2.5)	44.6	t	C-34
	1.62	ddd	(14.2, 9.7, 2.0)			
34	4.00	m		65.2	d	
35	1.16	d	(6.3)	24.4	q	C-33, C-34
36	1.88	s		17.2	q	C-7, C-8, C-9
37	1.04	d	(6.9)	14.3	q	C-9, C-10, C-11
38	1.35	d	(6.9)	10.8	q	C-18, C-19, C-20
39	3.49	s		58.2	q	C-20
40	1.01	d	(6.9)	17.8	q	C-28, C-29, C-30
41	0.97	d	(7.4)	10.3	q	C-30, C-31, C-32

NMR data were obtained in CD₃OD solution. ¹H and ¹³C NMR were measured at 500MHz and 125MHz, respectively. Assignments were aided by a combination of ¹H-¹H COSY, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.



5.2. Chivosazole F의 생물활성

5.2.1. Chivosazole F의 세포독성

Table 19. Cytotoxicities of chivosazole F(1) and doxorubicin(reference).

Compound	ED ₅₀ [ng/mL]				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
Chivosazole F(1)	13.7	0.1	0.2	0.6	0.9
Doxorubicin	9.8	89.1	36.9	82.5	72.2

분리·정제되어진 chivosazole F(1)는 *in vitro*에서 다섯 개의 인간암세포 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15에 대해 세포독성을 측정하였다. 세포독성 측정은 SRB assay 방법을 사용하였으며 그 결과는 표 19와 같았다. Chivosazole F(1)는 인간 암세포에 대해 ED₅₀ 값이 0.1에서 13.7ng/mL로 ng 수준에서의 강력한 세포독성을 가지는 것으로 보이며, 특히 난소암세포인 SK-OV-3에 대해서는 대조약물로서, 이미 시중에 시판되고 있는 탁월한 항종양제인 doxorubicin보다 약 90배 더 강한 세포독성을 확인하였다. 하지만 chivosazole F의 이러한 강력한 세포독성은 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 작용하는 것으로, chivosazole F의 실용화를 위해서는 더 많은 실험과 개발이 동반되어야 한다고 생각된다.

5.2.2. Chivosazole F의 항균활성

Table 20. Antimicrobial spectrum of chivosazole F(1).

Compound	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition zone (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>R. rubra</i>	<i>C. albicans</i>
Chivosazole F(1)	50000	—	—	—	14.5

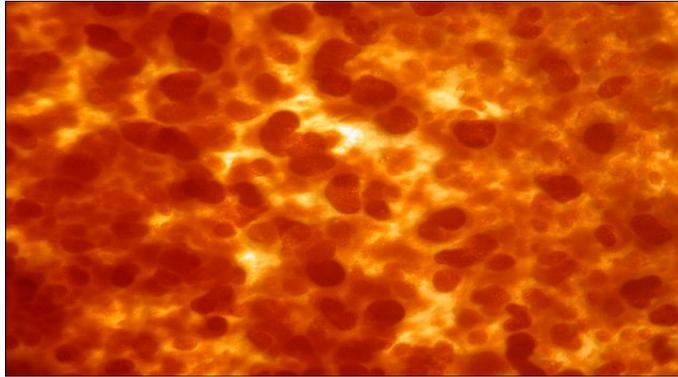
Chivosazole F(1)는 세균과 효모에 대해서 그 활성을 측정하였다. 세균으로는 gram 음성 세균인 *S. aureus*와 gram 양성 세균인 *E. coli*를 사용하였고, 효모로는 *R. rubra*와 *C. albicans*를 사용하였으며, 활성 측정을 위해서 paper disc 확산법을 채택하여 실험하였다. 그 결과 분리된 chivosazole F(1)는 세균에서는 그 활성이 측정되지 않았으나, 효모인 *C. albicans*에 대해서는 14.5mm의 활성을 보였다(표 20).

이미 밝혀진 chivosazole의 논문에서 chivosazole은 세균에 대해서는 항균활성이 존재하지 않으며 효모에서 그 활성이 있다고 보고한 바 있다⁸⁾. 이런 점에 미루어 보았을 때 본 연구에서 분리한 chivosazole F(1) 역시도 다른 chivosazole과 같은 양상의 항균활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 본 실험에서 측정된 세포독성은 이전 연구에서는 볼 수 없었던 human cell에 대한 첫 실험임을 고려하였을 때 큰 의의가 있다고 할 수 있을 것이다.

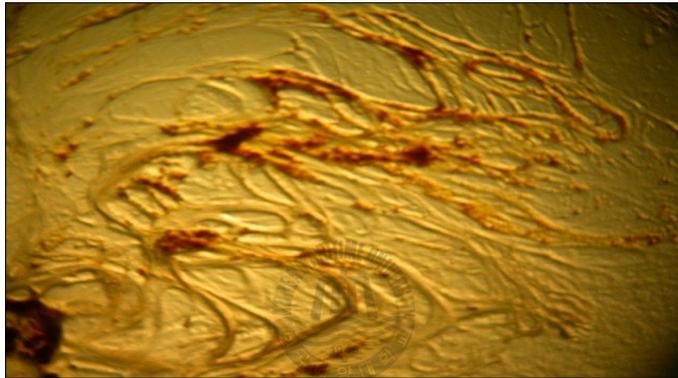
6. Strain KM1033의 특성

김천에서 채집한 토양시료에서 분리된 strain KM1033은 ST21CX agar 배지에서 여과지를 용해하는 red type의 *S. cellulosum*이다. KAN4 agar 배지에서 먹이를 따라 나뭇가지 모양으로 뻗어나가는 orange색의 swarm이 관찰되었으며, Vy/2 agar 배지에서는 균체가 서로 집락을 이루어 배지 표면을 파고드는 것을 확인하였다. 액체배양 시 배양 플라스크 표면에 점액질의 띠를 생성하였으며 배양동안 배양액이 맑아졌다 (그림 21). 30°C에서 배양 시 그 성장이 좋았으며, Vy/2 agar 배지에서는 성장이 더디었으나 액체배지에서는 월등히 빠른 성장을 보였다. 특히, 스크리닝을 통한 항균활성 실험에서 *C. albicans*에 대한 활성이 다른 균주들 보다 매우 뛰어났다.

이와 같은 배양상의 특징과 더불어 빠른 성장과 스크리닝을 통한 충분한 대사산물의 양, 항균활성실험에서의 우수성을 토대로 strain KM1033이 실험 균주로 선정되었다.



ST21CX agar plate



KAN4 agar plate



Vy/2 agar plate

Figure 21. The swarm colony of *S. cellulosum* KM1033 on agar plates.

7. Coriolide의 구조동정 및 생물활성

7.1. Coriolide의 구조동정

Compound 2는 스크리닝 과정에서 뛰어난 항균활성을 보인 strain KM1033으로부터 얻은 최종 대사산물이다. 총 60L의 액체배양과 3회의 open column chromatography, 그리고 2회의 HPLC를 통해 1.5mg의 순수한 물질을 얻었으며, 이를 1D 및 2D NMR과 MS, UV data를 종합하여 그 구조를 예상하였다.

Compound 2는 무색의 기름 형태이며 FABMS와 HR FABMS, 그리고 ^1H 및 ^{13}C NMR data를 바탕으로 $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$ (m/z 279[M+H] $^+$)의 분자식을 확립하였다.

Table 21. Physico-chemical properties of compound 2.

Appearance		Colorless oil
Molecular formula		$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$
HRFAB-MS	Found	279.2324[M+H] $^+$
	Calcd.	279.2324
UV λ_{\max} (MeOH) nm		234
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}		3615, 3500, 3005, 2920, 2850, 1735, 1450, 1430, 1410, 1370, 1360, 1245, 1195, 1170, 1015, 948
RP-TLC (Rf)		
MeOH-H ₂ O(9:1)*		0.45
Solubility	Soluble	MeOH, CH ₂ Cl ₂ , Acetone, EtOAc
	Insoluble	H ₂ O, <i>n</i> -Heptane, <i>n</i> -Hexane

*RP-18 gel F₂₅₄ plate

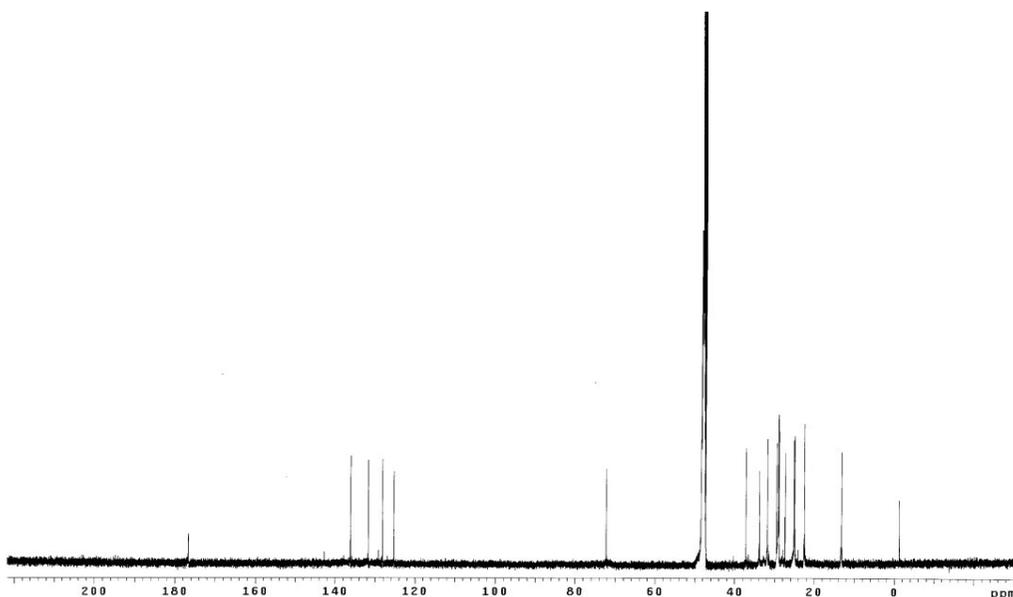


Figure 22. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD .

Compound 2에 존재하는 모든 carbon의 원소는 ^{13}C NMR data에서 확인할 수 있었으며(그림 22), 18개의 carbon 신호는 ^1H NMR과 함께 DEPT와 gHMQC실험을 통해 각각이 1개의 carbonyl carbon(δ_{c} 176.6)과 4개의 sp^2 methine(δ_{c} 136.1, δ_{c} 131.7, δ_{c} 128.1, δ_{c} 125.3), 1개의 oxymethine(δ_{c} 72.2), 11개의 methylene(δ_{c} 37.2, δ_{c} 33.6, δ_{c} 31.7, δ_{c} 29.5, δ_{c} 29.0, δ_{c} 29.0, δ_{c} 28.9, δ_{c} 27.3, δ_{c} 25.0, δ_{c} 24.9, δ_{c} 22.5, δ_{c} 13.1), 그리고 1개의 methyl(δ_{c} 13.1)을 이루고 있음을 확인하였다(그림 23, 부록 10, 11).

Compound 2의 부분구조 및 전체적인 평면구조는 ^1H - ^1H COSY과 gHMBC data를 통하여 결정하였다(부록 12, 13). 부분구조 I은 H-2(δ_{H} 2.26)와 H-3(δ_{H} 1.59)사이의 ^1H - ^1H COSY 신호와 C-3의 methylene

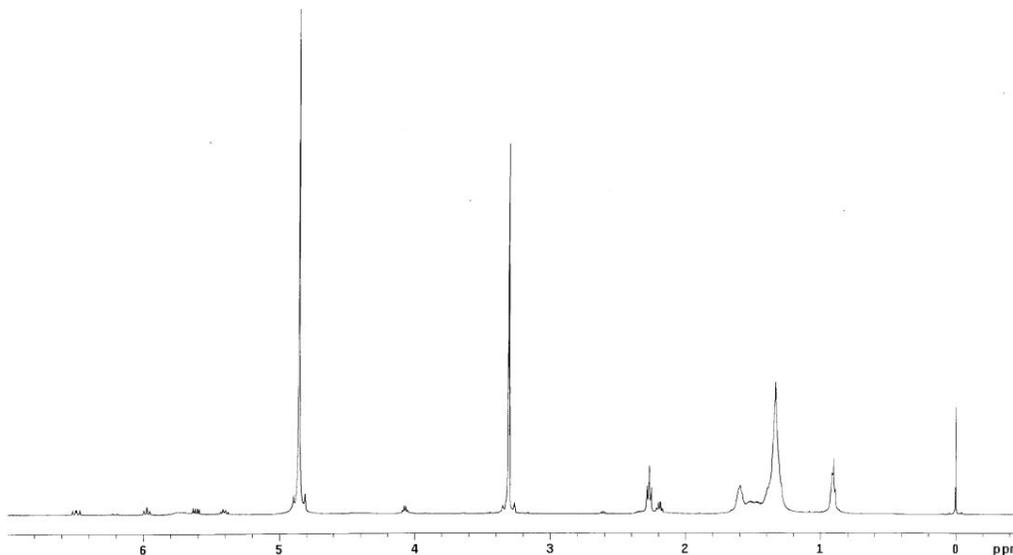


Figure 23. ^1H NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD .

proton(δ_{H} 1.59)에서 C-1(δ_{C} 176.6), C-2(δ_{C} 33.8), C-4(δ_{C} 29.0)로의 gHMBC correlation, 그리고 C-2의 methylene proton(δ_{H} 2.26)에서 C-1(δ_{C} 176.6), C-3(δ_{C} 24.9), C-4(δ_{C} 29.0)로의 gHMBC correlation에 의해 지정되었으며, 부분구조 II는 부분구조를 이루고 있는 모든 proton 신호의 correlation으로 인해 ^1H - ^1H COSY 실험으로 충분히 결정할 수 있었다. 여기에 이들의 분자식 $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$ (m/z 279 $[\text{M}+\text{H}]^+$)을 고려하여 부분구조 I과 II이 서로 연결되어 있을 것을 예상하였다. 또한 ^1H - ^1H COSY 실험에 의한 H-17(δ_{H} 1.43-1.30)과 H-18(δ_{H} 0.90)사이의 coupling, gHMBC data에서의 C-18의 methyl proton(δ_{H} 0.90)에서 C-17(δ_{C} 22.5)과 C-16(δ_{C} 31.7)으로의 cross peak로 인해 부분구조 III을 예상하였다(그림 24). 이렇게 예상한 부분구조를 제외한 지

정되지 않

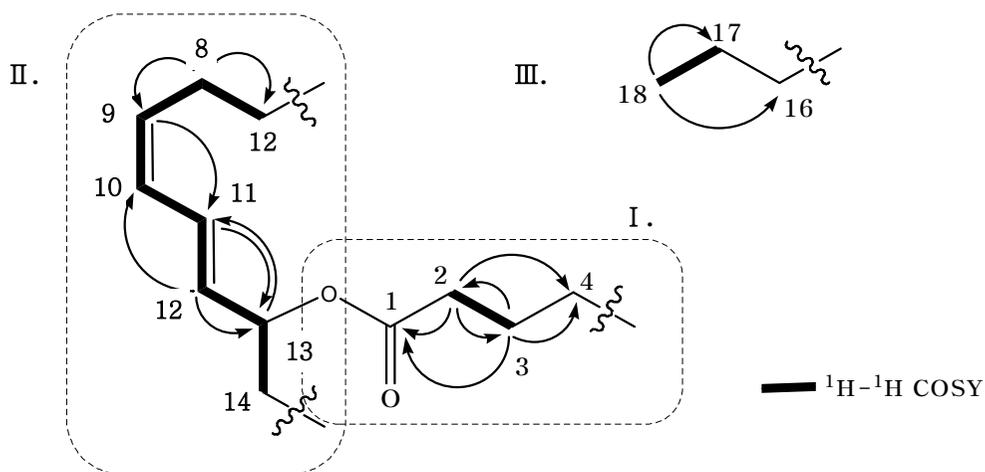


Figure 24. Partial structures of compound 2.

은 3개의 methylene carbon과 분자식으로부터 얻은 4개의 수소모자람 지수를 고려하여, 이들 부분구조가 methylene carbon들로 연결되어 있으며 하나의 링을 가진 구조임을 예상할 수 있었고 이러한 특징들을 바탕으로 *S. cellulorum*에 대한 문헌을 조사하였다. 그 결과 예상외로 compound 2는 *S. cellulorum*에서 생산된 예는 찾을 수 없었으며, 미생물에서 식물로 그 범위를 확대한 결과 compound 2는 1970년에 Polygalaceae 과 *Monnina* 속 종자유로부터 분리된 coriolide임을 알 수 있었으며, NMR data가 서로 일치함을 확인하였다(그림 25)^{20,29}. Coriolide는 지방산인 linoleic acid가 환을 이룬 형태로 식물유지에서 주로 발견되는 흔한 화합물이나, 미생물에서는 처음으로 보고된 것으로, 식물이 아닌 미생물기원의 coriolide를 순수 분리·정제하였다는데 그 의의

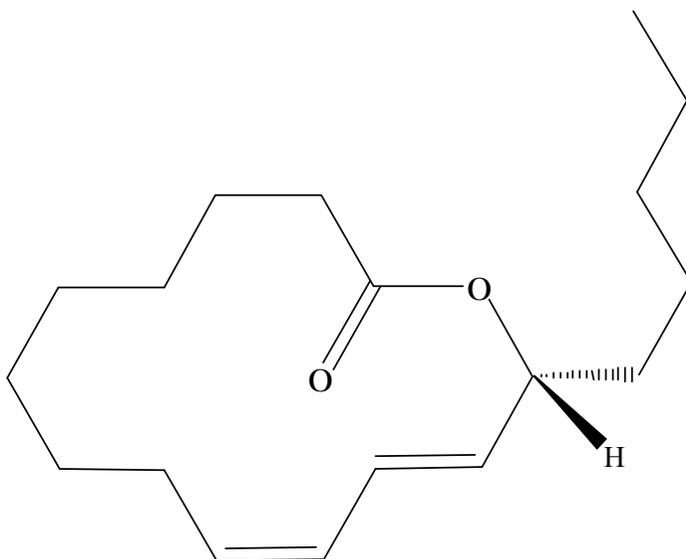


Figure 25. The structure of coriolide (2).



가 있다고 생각된다.

Table 22. The ^1H and ^{13}C NMR assignments for compound 2.

	δ_{H}		δ_{C}	HMBC
1			176.6	s
2	2.26	t (8.0)	33.8	t C-1, C-3, C-(4,5,6)
3	1.59	m	24.9	t C-(4,5,6), C-9, C-18
4	1.43-1.30	m	29.0	t C-(4,5,6), C-7, C-18
5	1.43-1.30	m	28.9	t C-(4,5,6), C-7, C-18
6	1.43-1.30	m	29.0	t C-(4,5,6), C-7, C-18
7	1.43-1.30	m	29.5	t C-(4,5,6), C-7, C-18
8	2.19	q (6.3, 14.0, 20.1)	27.4	t C-7, C-9
9	5.40	tt (11.2, 8.0)	131.7	d C-11
10	5.97	tt (11.2)	128.2	d
11	6.49	dd(11.2, 15.2)	125.3	d C-13
12	5.61	dd(7.1, 15.2)	136.1	d C-10, C-13
13	4.07	q (7.1, 13.0)	72.2	d C-11 C-12
14	1.50-1.40	m	37.2	t
15	1.43-1.30	m	25.0	t C-(4,5,6), C-7, C-18
16	1.43-1.30	m	31.7	t C-7, C-3, C-(4,5,6), C-18
17	1.43-1.30	m	22.5	t C-(4,5,6), C-7, C-18
18	0.90	m	13.1	q C-16, C-17

NMR data were obtained in CD_3OD solution. ^1H and ^{13}C NMR were measured at 500MHz and 125MHz, respectively. Assignments were aided by a combination of ^1H - ^1H COSY, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.

7.2. Coriolide의 생물활성

7.2.1. Coriolide의 항균활성

Table 23. Antimicrobial spectrum of coriolide(2).

Compound	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition zone (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>R. rubra</i>	<i>C. albicans</i>
Coriolide(2)	1000	—	—	—	26.4
Nystatin	100	—	—	—	11.5

Coriolide(2)의 세균과 효모에 대한 항균활성을 측정하였다. 항균활성 측정을 위해 paper disc 확산법을 사용하였으며, gram 양성 세균인 *S. aureus*와 gram 음성 세균인 *E. coli*, 그리고 효모인 *R. rubra*와 *C. albicans*를 사용하였다. Coriolide(2)는 세균류인 *S. aureus*와 *E. coli*에 대해서는 활성이 나타나지 않았으며, 효모 중에서도 *C. albicans*에 대해서만 1000ppm에서 26.4mm의 선택적 활성을 나타내었다(표 23). 이는 사상균과 효모감염의 약제로 쓰이며 특히 candida증의 좋은 치료제로 사용되고 있는 nystatin과 비교 하였을 때 충분히 실험해 볼 만한 물질임을 알 수 있었다.

IV. 결론

Myxobacteria는 gram 음성의 절대 호기성 세균으로 단세포세균임에도 불구하고 다른 세균에서는 찾아 볼 수 없는 군집생활을 영위하며 복잡한 생활사를 가진다. 또한 swarm을 형성하고 활주운동을 하며, 다른 세균에서는 형성되지 않는 독특한 자실체를 형성하며, exoenzyme을 이용하여 세균과 진균류와 같은 미생물뿐만 아니라 다른 생물학적 고분자 물질을 녹여 먹이로 섭취하는 특이한 생활사를 보인다.

새로운 활성물질의 발견은 새로운 계통의 이용에 있어 크게 좌우된다. 특히, *Sorangim* 속의 myxobacteria는 다른 미생물과 달리 대부분 특유의 생물학적 활성이 뛰어난 이차 대사산물을 생성하는 것으로 알려져 있으며, myxobacteria는 통상의 세균 분리 방법으로는 자연계로부터 분리되지 않고, 배양 역시 까다로워 그 동안 연구가 제한되어 왔기 때문에 밝혀진 myxobacteria의 수도 다른 세균에 비해 현저히 적은 실정이다. 이러한 이유로 현재는 밝혀지지 않은 생물활성물질의 미개척 자원으로서 집중적인 관심과 표적의 대상이 되고 있다.

이러한 myxobacteria로부터 생물활성 물질을 찾기 위해 우리는 filter paper 방법을 사용하여 한국 토양에서 다수의 *Sorangium* strain을 순수 분리·배양하였고, 총 96종의 *Sorangium* strain을 분리하는데 성공하였다. 분리된 *Sorangium* strain들로부터 생리활성이 있는 물질을 찾기 위한 스크리닝을 시행하였고, 그 결과 89%의 균주에서 생물학적 활성이 측정되었다. 이 중 분리를 위해 두 개의 *Sorangium* strain을 선택하였으며 guided screening을 토대로 하여 그들의 이차대사산물을 분리하였다.

선택하여 배양된 *Sorangium cellulosum* KM1045의 MeOH 추출물

은 human cancer cell에 대한 실험결과 cytotoxic activity를 보였으며, cytotoxicity에 따라 추출물로부터 chivosazole F(1)를 분리하였다. 분리된 chivosazole F(1)는 human cell에 대한 활성측정 실험에서 ED₅₀ 값이 0.1~13.7ng/mL로 강력한 세포독성을 가지는 것으로 보이며, 특히 난소암세포인 SK-OV-3에 대해서는 대조약물로서 이미 시중에 시판되고 있는 탁월한 항종양제인 doxorubicin보다 약 90배 더 강한 세포독성을 나타내는 것임을 확인할 수 있었으며, *C. albicans*에 대해서도 항균 활성을 나타내었다.

또한 함께 선택된 *S. cellulosum* KM1033의 배양물은 antifungal activity를 보였다. Antifungal activity 결과에 따라 추출물은 silica와 RP-18 column chromatography, HPLC를 이용하여 순차적으로 분리정제하였으며, 무색의 oil 상태의 순수한 활성 물질을 얻었다. 분리된 활성 물질은 ¹H NMR spectrum을 비교했을 때 *Monnina emarginate* 종자 유로부터 분리되어 보고된 coriolide와 동일한 물질임을 확인하였으며, antifungal test를 통해 분리된 coriolide(2)는 1000µg/mL에서 *C. albicans*에 대해 26.4mm의 antifungal activity를 나타냄을 알게 되었다.

본 실험을 통해 *S. cellulosum*은 항균뿐만 아니라 항암에도 탁월한 효과가 있는 우수한 생물활성물질의 생산자임을 재확인 되었다. 따라서 구조동정된 생리활성 물질에 대한 산업적 이용연구를 포함한 다양한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

V. 참고 문헌

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9, The fruting, gliding bacteria: the myxobacteria, 515-525.
2. Bollag, D. M., McQueney. P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz. M., Lazarides. E. Woods, C. M. Cancer Res., 55, 2325-2333(1995).
3. Dawid, L., FEMS Microbial. Rev., 24:403-427(2000).
4. Dworkin, M., Recent advances in the social and development biology of the myxobacteria, Microbial, 55, 525-549(1996).
5. Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. and Trowitzsch, W., Myxothiazol, An antibiotic from *Myxococcus fulvus*, J. Antibiot., 12, 1474-1479(1980).
6. Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. and Muller R., J. Biotechnol., 106, 233-253(2003).
7. G. Hofle and H. Reichenbach. 1990. GBF Scient. Ann. Report p95.
8. Herbert Irschik, Rolf Jansen, Klaus Gerth, Gerhard Hofle, Hans Reichenbach, Chivosazol A, a New Inhibitor of Eukaryotic Organisms Isolated from Myxobacteria, J. Antibiot., 803-816(1995).
9. Iizuka, T., Tokura, M., Jojima, Y., Hiraishi, A., Yamanaka, S., Fudou, R., Enrichment and phylogenetic analysis of moderately thermophilic myxobacteria from hot Springs in Japan., Microbes Environ. 21, 189-199(2006).

10. Jansen, R., Irschik, H., Reichenbach, H., Wray, V. and Hofle, G., Disorazoles, Highly cytotoxic metabolites from the sorangicin-producing bacterium *Sorangium cellulosum*, Strain So ce12, Liebigs Ann. Chem., 759-773(1994).
11. Jansen, R., Wray, V., Irschik, H., Reichenbach, H., Hofle, G., Isolation and spectroscopic structure elucidation of sorangicin a new type of macrolide-polyether antibiotic from gliding bacteria., Tetrahedron letter. 26., 49, 6031-6034(1985).
12. J. P. Karwowski, G. N. Sunga, S. Kadam, and J. B. Mcalpine, A method for the selective isolation of *Myxococcus* directly from soil., J. Ind. Microbiol., 16, 230-236(1996).
13. Kundim, B. A., Itou. Y., Sakagami. Y., Fudou. R., Yamanaka. S., Ojika. M., Novel antifungal polyene amide from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*: isolation, antifungal activity and absolute structure determination., Tetrahedron, 45, 10217-10221(2004).
14. Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Hofle, G., Apicularen A and B, new cytostatic macrolides from *Chondromyces* species (Myxobacteria); production, physico-chemical and biological properties. J. Antibiot. 51, 1075-1080(1998).
15. Koch, AL., White, D., The social lifestyle of myxobacteria., BioAssays., 20,1030-1038(1998).
16. K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Möller, Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*., J. Biotech., 106, 233-253(2006).

17. Lie Ken Jie, M.S.F. Analysis of conjugated linoleic acid esters by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103, 628-632(2001).
18. Lie Ken Jie, M.S.F., Pasha, M.K. and Alam, M.S. Synthesis and nuclear magnetic resonance properties of all geometric isomers of conjugated linoleic acids. *Lipids*, 32, 1041-1044(1997).
19. M. Kopp, H. Irschik, F. Gross, O. Perlova, A. Sandmann, K. Gerth, R. Muller, Critical variation of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strain So ce12 and So ce56: development of a *mariner*-based transposon mutagenesis system., *J. Biotechnol.*, 107, 29-40(2004).
20. Phillips, B. E. et al., J. (S)-13-Hydroxy-cis-9,trans-11-octadecadienoic Acid Lactone, a 14-Membered-Ring Compound from *Monnina emarginata* Seed Oil, *Org. Chem.*, 35, 1916-1919(1970).
21. Pridzum, L., Sasse, F., Reichenbach, H., 1995. Inhibition of fungal acetyl-CoA carboxylase: a novel target discovered with the myxobacterial compound soraphen. *Antifungal Agent. Discovery and Mode of Action*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 99-109(1995).
22. Reichenbach, H., The ecology of the myxobacteria. *Env. Microbiol.* 1, 15-21(1999).
23. Reichenbach, H., Dworkin, M., Balows, A., Truper, H. G.(ed), *The myxobacteria, The prokaryotes*(2nd ed), Springer verlag, Newyork, 3416-3487(1992).
24. Reichenbach, H., Myxobacteria, producers of novel bioactive substances., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 149-156(2001).

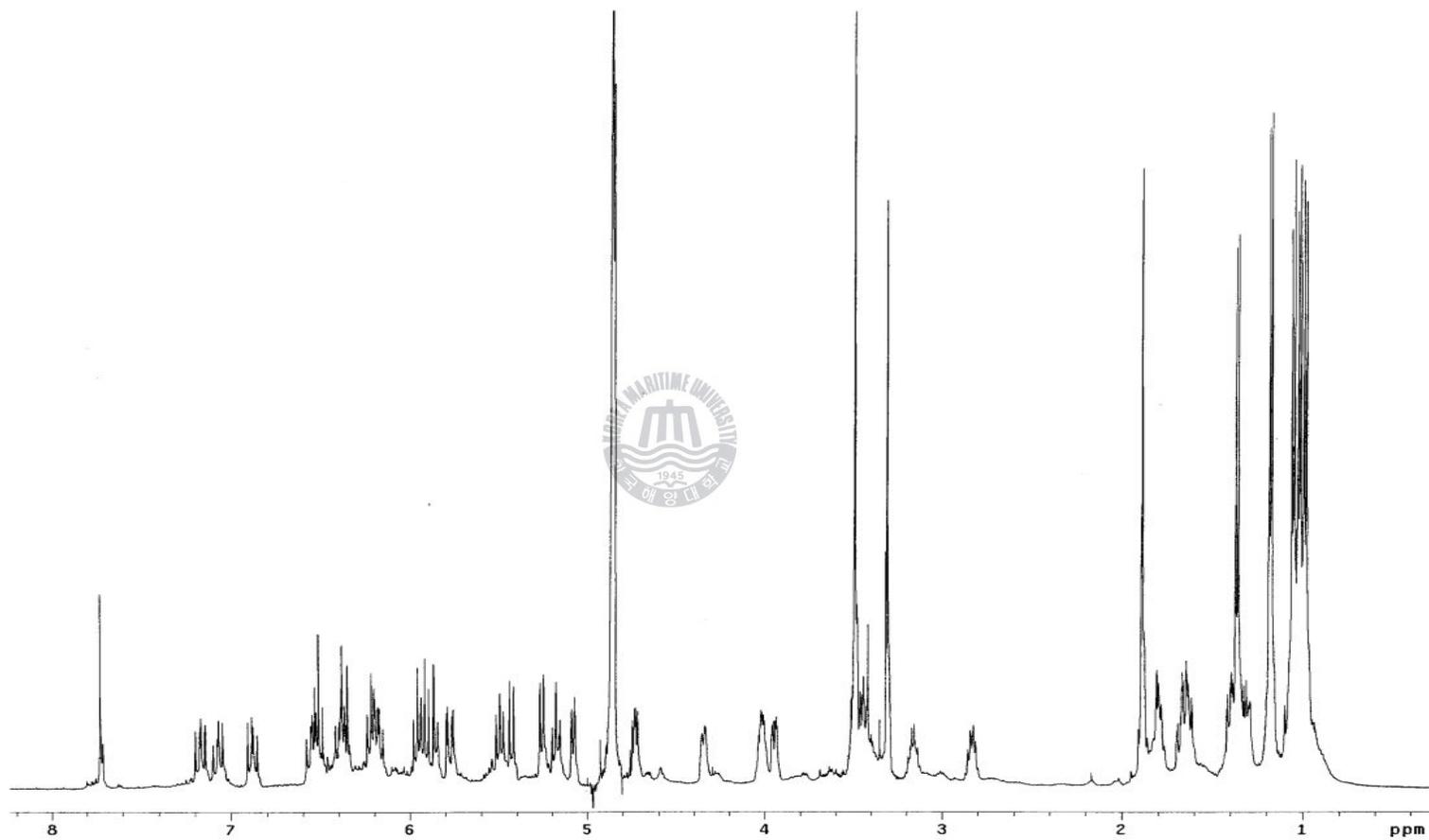
25. Rolf Jansen, Herbert Irschik, Hans Reichenbach, Gerhard Hofle, Chivosazoles A-F: Novel Antifungal and Cytotoxic Macrolides from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria), Liebigs Ann., 1725-1732(1997).
26. Rosenberg, E. Myxobacteria: development and cell interaction. Springer Verlag, New York(1984).
27. Schulz, S., fuhlendorff, J., Reinchenbach, H., Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus.*, Tetrahedron., 60, 3863-3872 (2004).
28. Shimket, L. Intercellular signaling during fruiting body development of *Myxococcus xanthus*. Annu. Rev. Microbiol. 55, 525-549(1999).
29. Talent, W. H. et al., (R)-13-Hydroxy-cis-9,trans-11-octadecadienoic acid, The Principal Fatty Acid from *Coriaria Nepalensis* Wall, Seed Oil, Tet. Lett., 4329-4334(1966).
30. T. Iizuka, Y. Jojima, R. Fudou, S. Yamanaka, Isolation of myxobacteria from the marine environment., FEMS Microbiology Letter., 169, 317-322(1998).
31. Wenzel, S. C., Muller. R., Myxobacterial natural product assembly line: fascinating examples of curious biochemistry., Nat. Prod. Rep., 24, 1211-1224(2007).
32. Wolgenuth, Ch., Hoiczky, E., Kaiser, D., Oster, G., How myxobacteria glide., Current Biology. 12, 369-377(2002).
33. Yamanaka, S., Chem.& Biol. 27, 656(1989).
34. Zhang, L., Wang, H., Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strain., J. Microbial. Method., 54,21-27(2003).

35. Zusman, D. R. Cell-cell interactions and development in *Myxococcus Xanthus*., *Quarterly Reviews of Biology*., 59, 119-138(1984).
36. 김용석, 배우철, 백성진, *Myxobacteria*의 생리활성 물질. *Kor, J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1-12(2003).
37. 안종웅, 이정옥, *Myxococcus stipitatus* JW150이 생산하는 세포 독성 물질의 분리 및 특성., *Kor, J. Pharm. Soc.*, 46, 108-112(2002).
38. 안종웅, 정영훈, 정유섭, 지옥표, The Discovery of Promising New Leaders for Anticancer Drug Development from *Myxobacteria*., 21세기 바이오 산업과 천연물과학 심포지움, 서울대학교., 55-61(2002).
39. 조경연, *Myxobacteria*의 군집생활, 자실체 형성 및 생리활성물질의 생산., *생물산업*, 14, 11-16(2001).

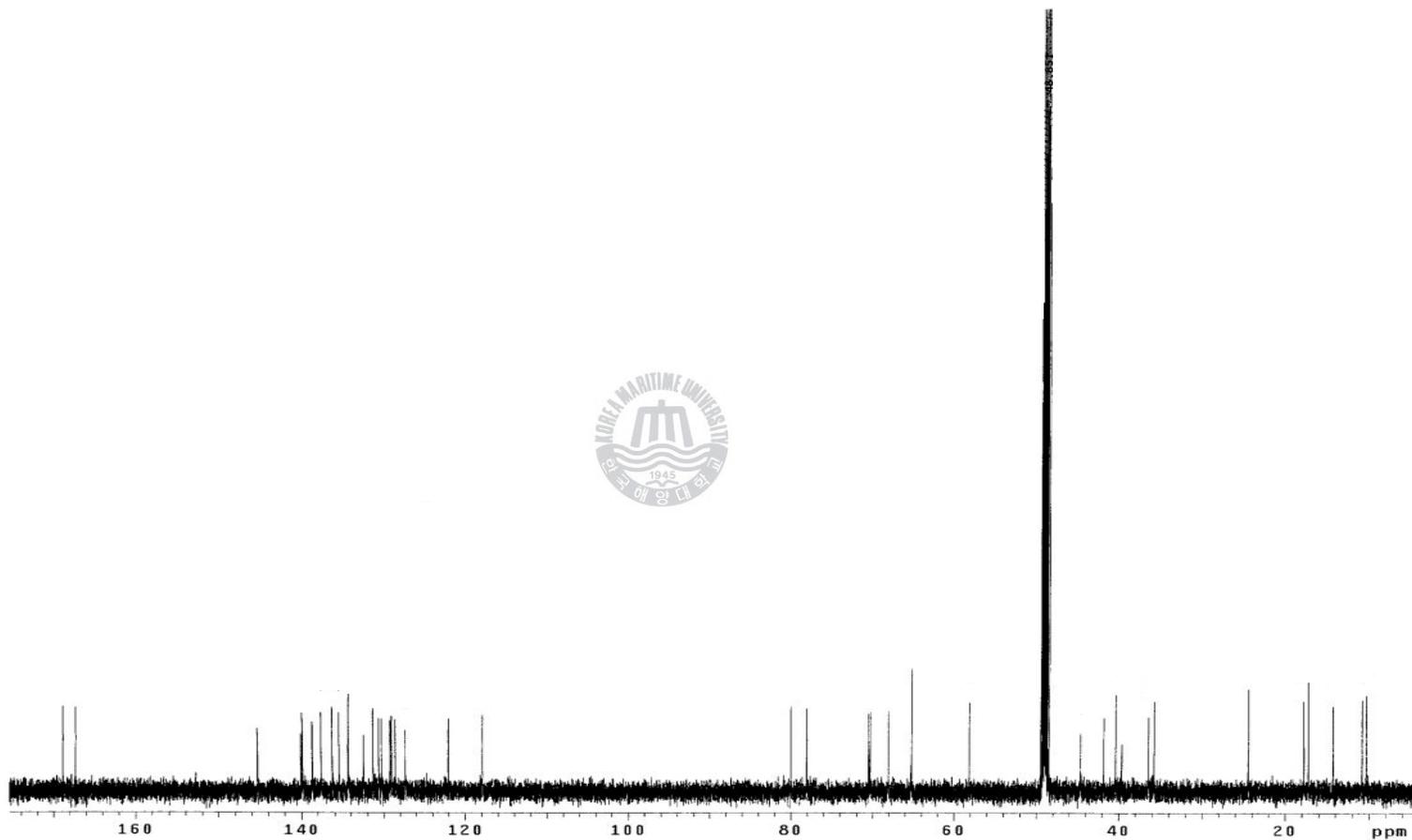


Appendix

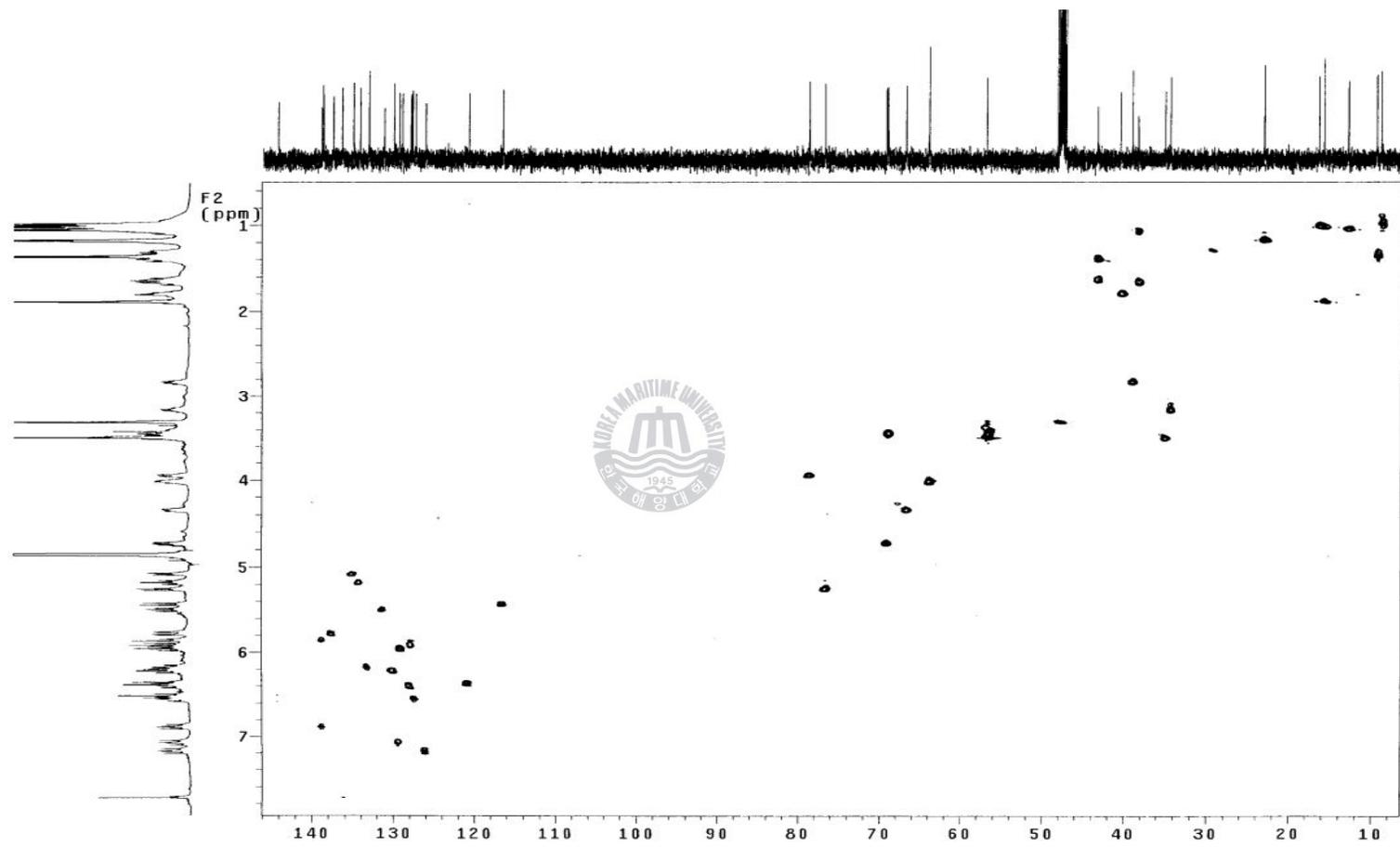
1. ^1H NMR spectrum of chivosazole F(1).
2. ^{13}C NMR spectrum of chivosazole F(1).
3. gHSQC spectrum of chivosazole F(1).
4. ^1H - ^1H COSY spectrum of chivosazole F(1).
5. TOCSY spectrum of chivosazole F(1).
6. gHMBC spectrum of chivosazole F(1).
7. ROESY spectrum of chivosazole F(1).
8. ^1H NMR spectrum of coriolide(2).
9. ^{13}C NMR spectrum of coriolide(2).
10. DEPT spectrum of coriolide(2).
11. gHMQC spectrum of coriolide(2).
12. ^1H - ^1H COSY spectrum of coriolide(2).
13. gHMBC spectrum of coriolide(2).



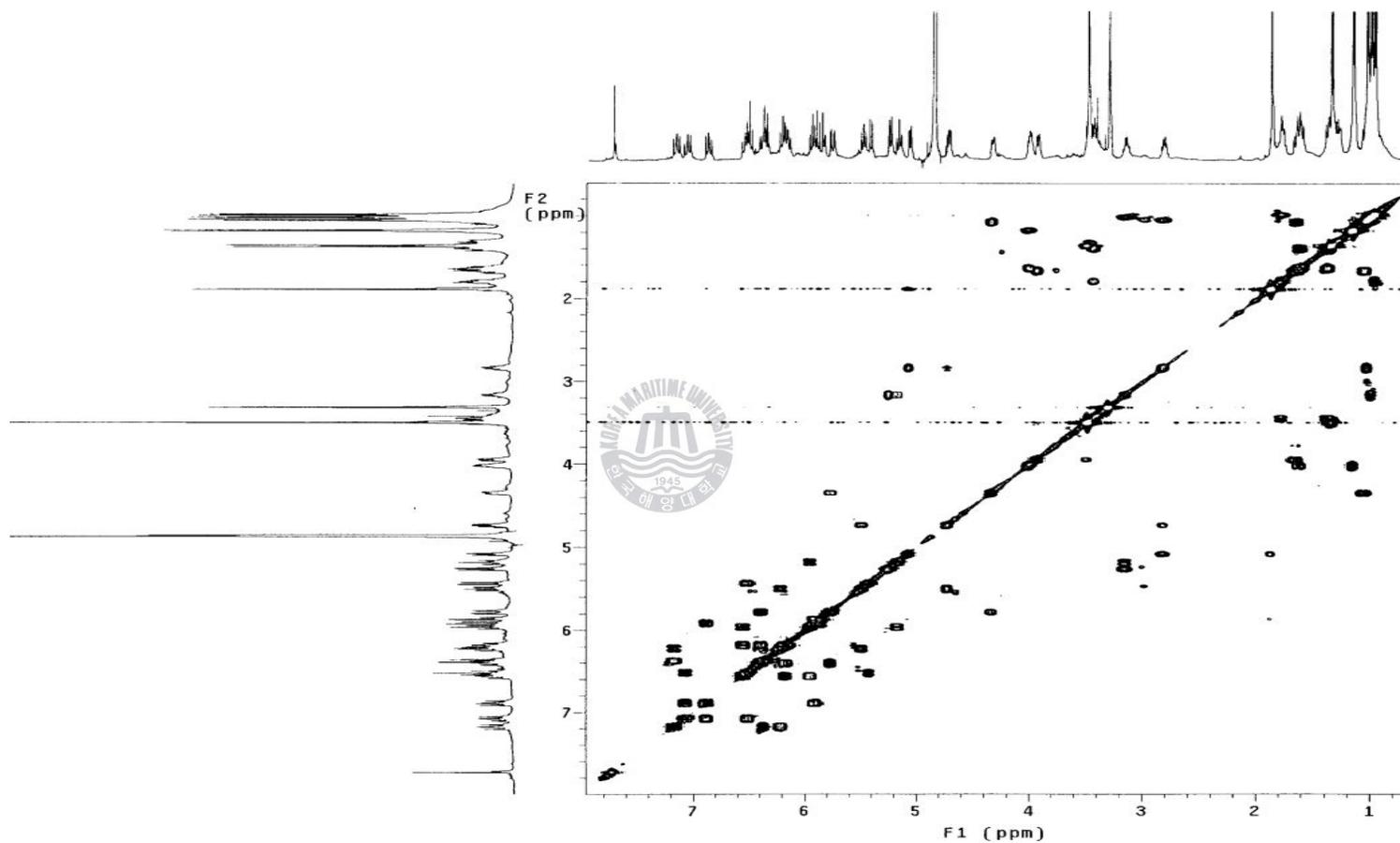
Appendix 1. ^1H NMR spectrum of chivosazole F(1).



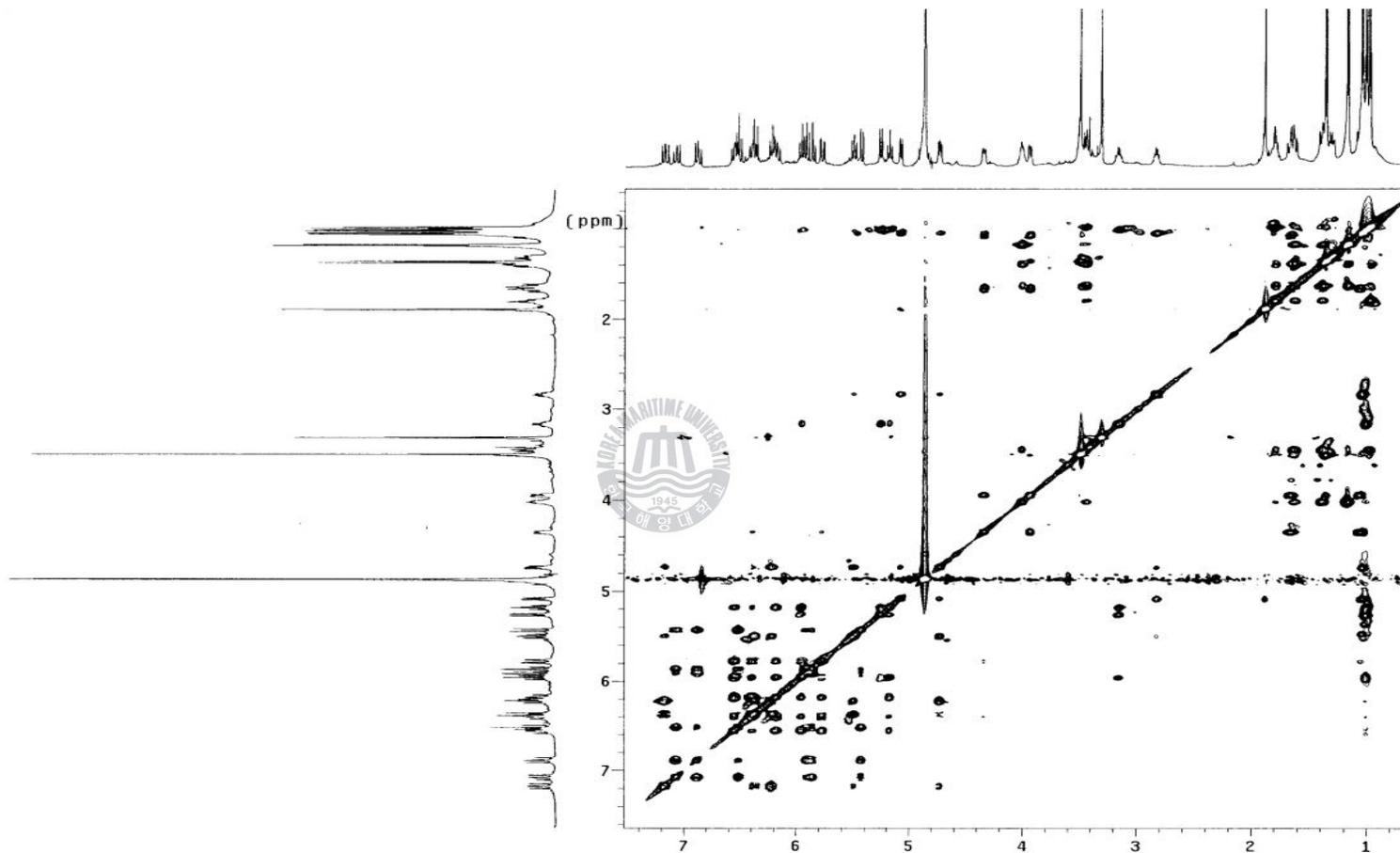
Appendix 2. ^{13}C NMR spectrum of chivosazole F(1).



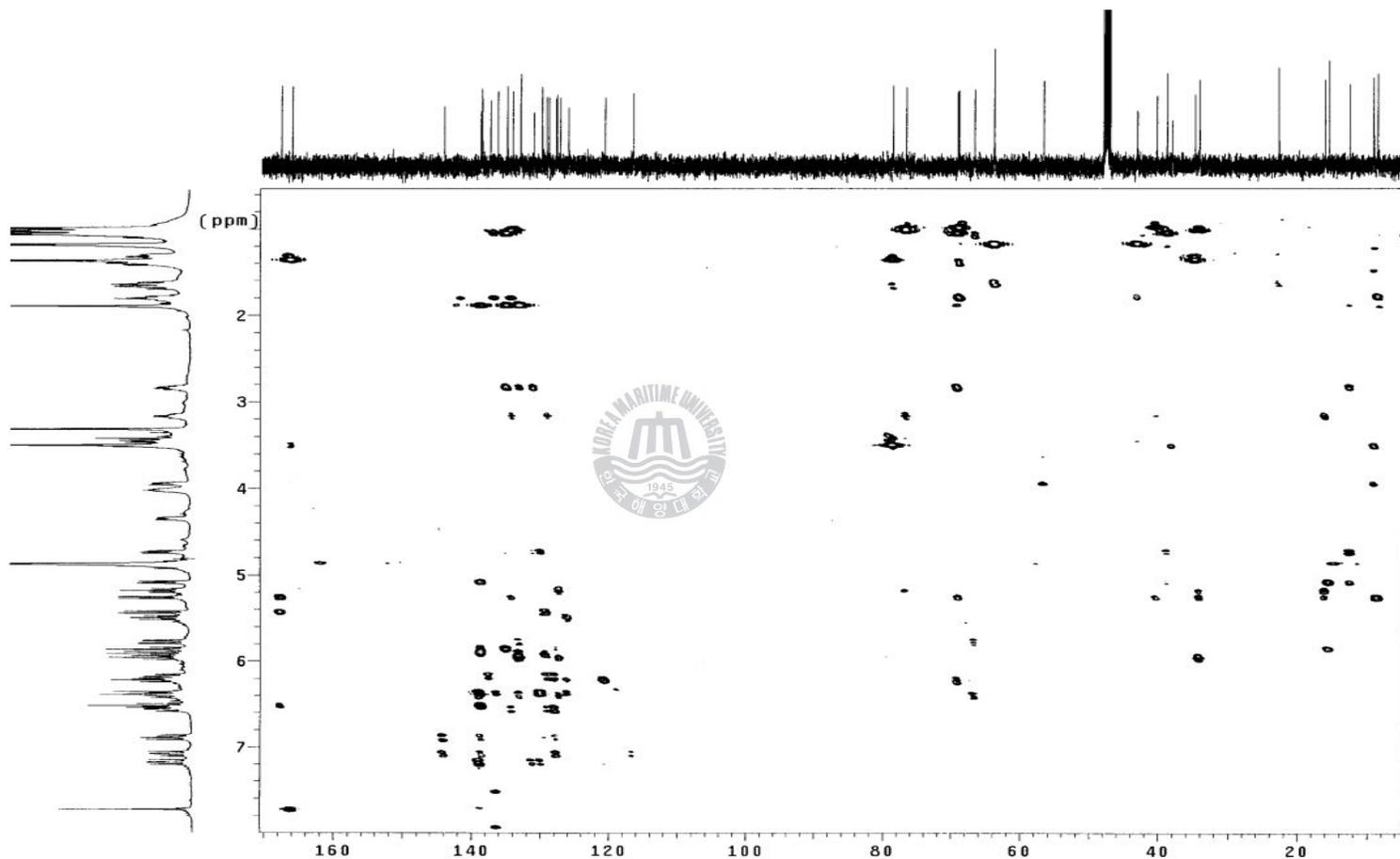
Appendix 3. gHSQC spectrum of chivosazole F(1).



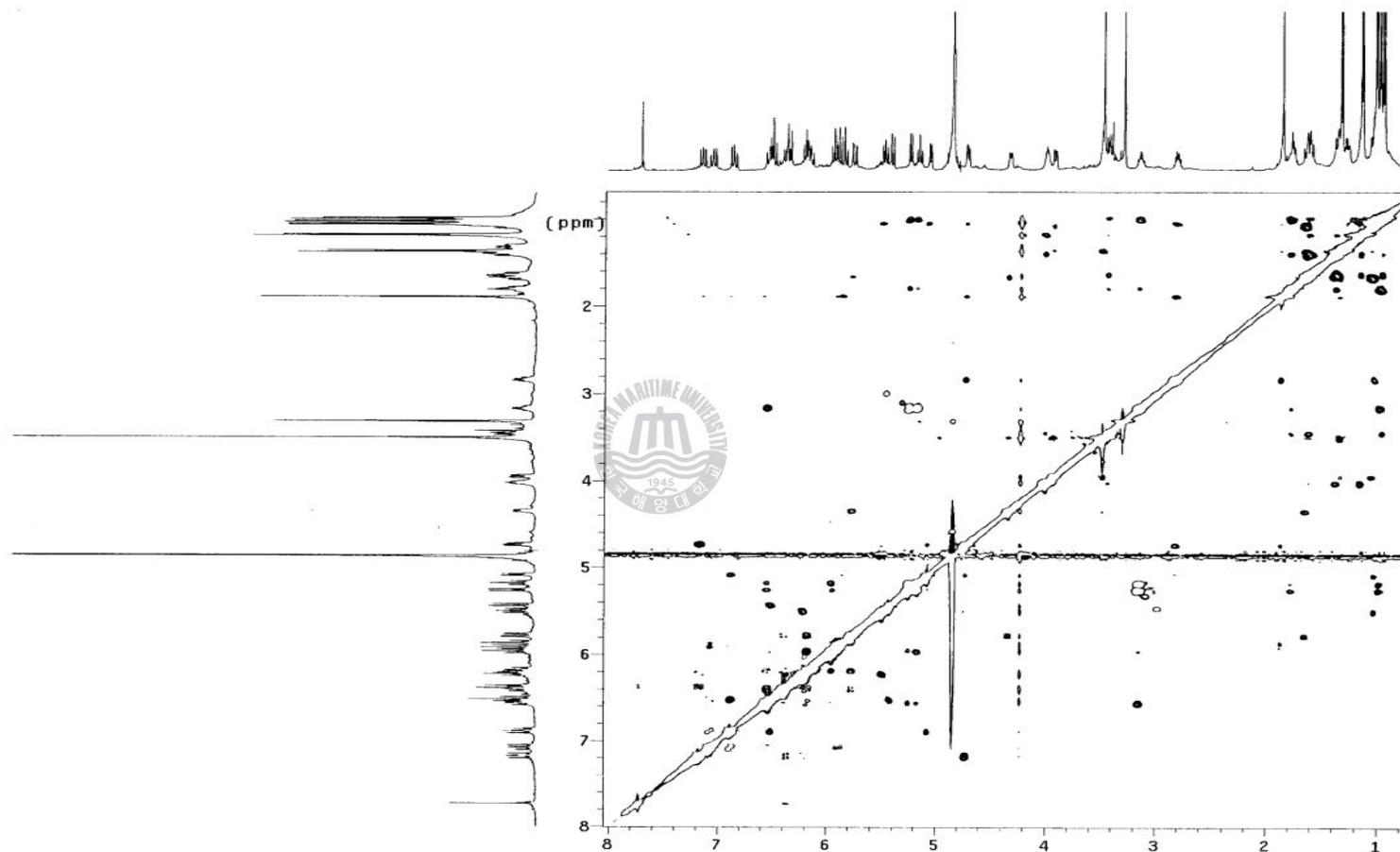
Appendix 4. ^1H - ^1H COSY spectrum of chivosazole F(1).



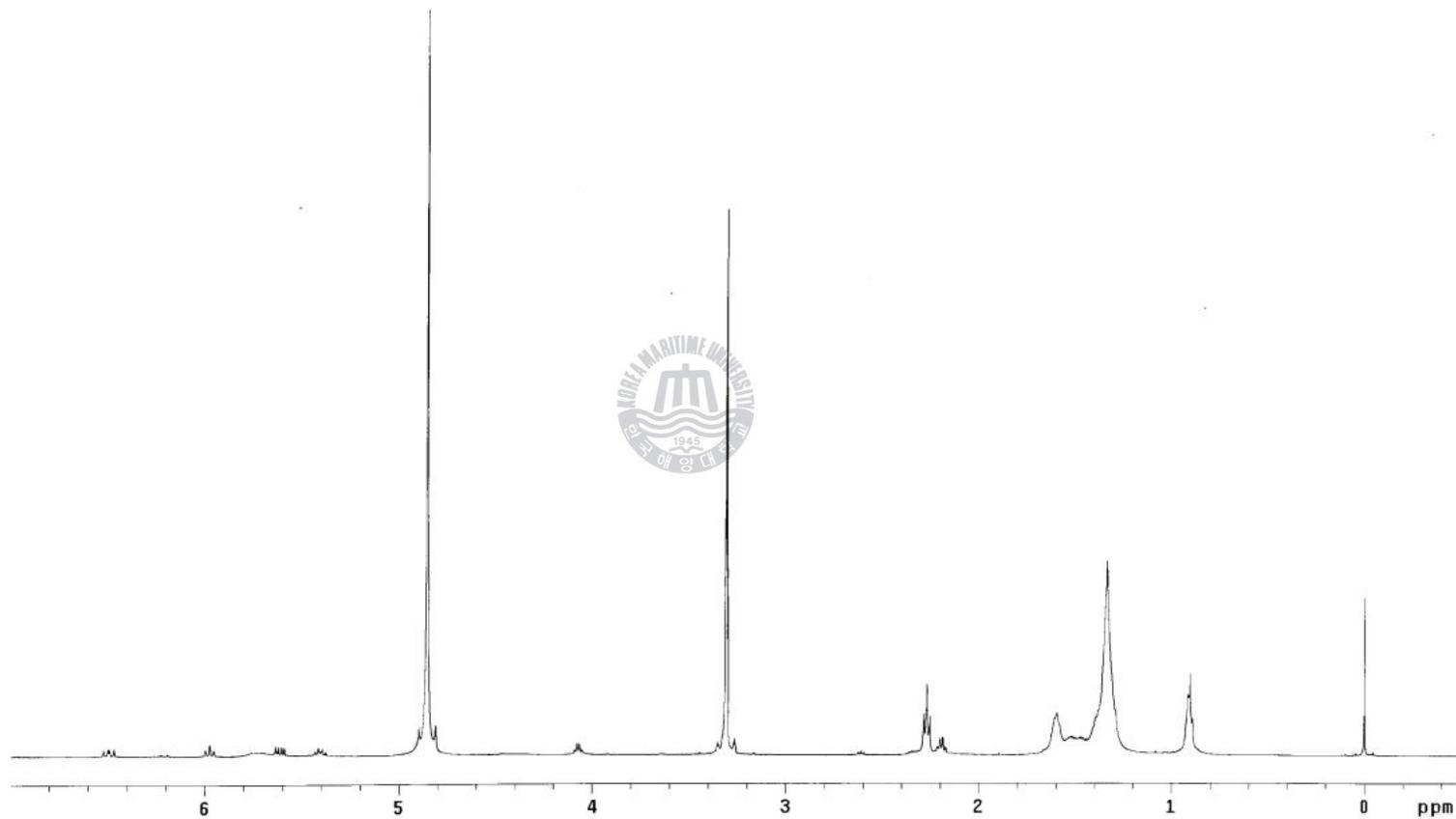
Appendix 5. TOCSY spectrum of chivosazole F(1).



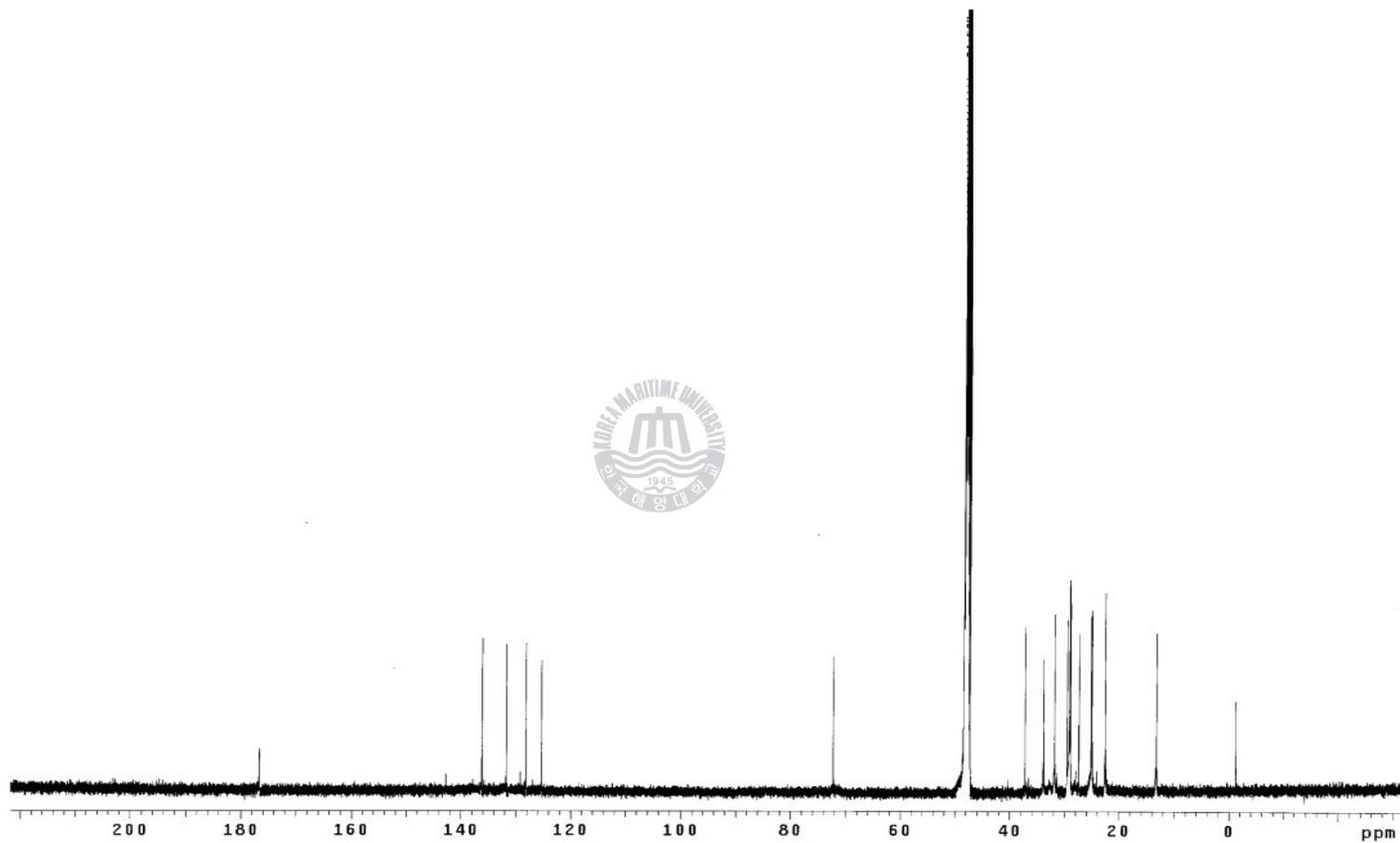
Appendix 6. gHMBC spectrum of chivosazole F(1).



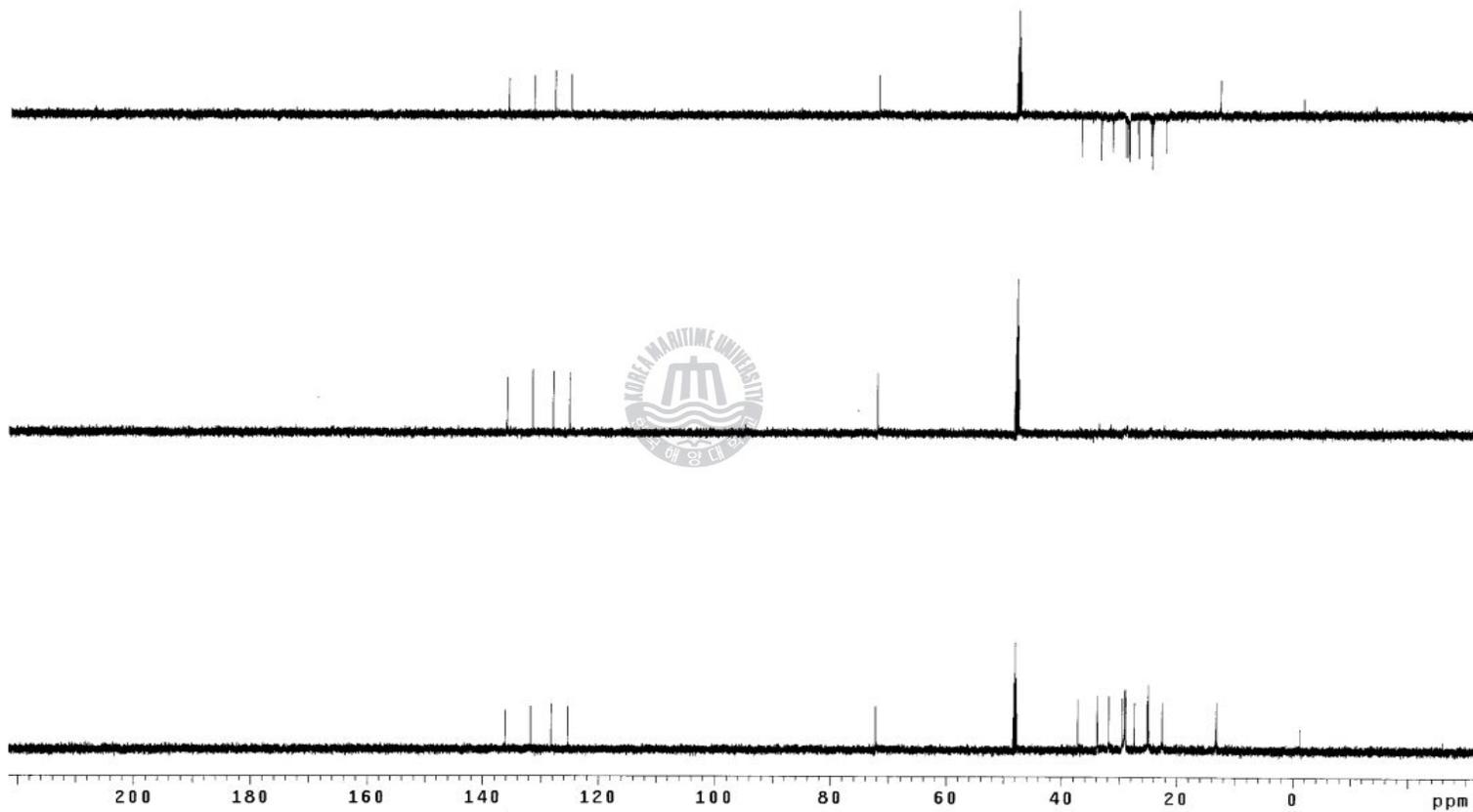
Appendix 7. ROESY spectrum of chivosazole F(1).



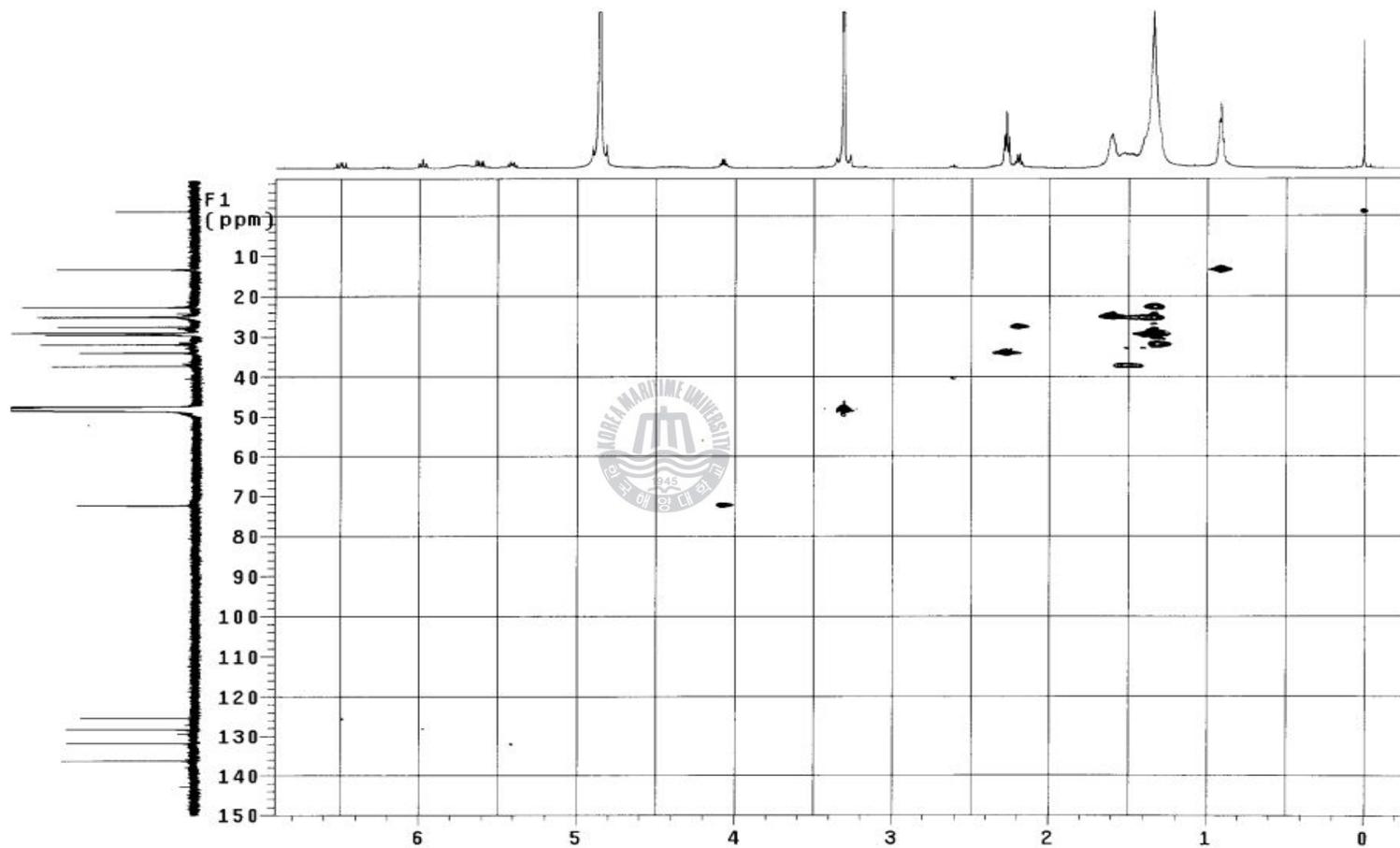
Appendix 8. ^1H NMR spectrum of coriolide(2).



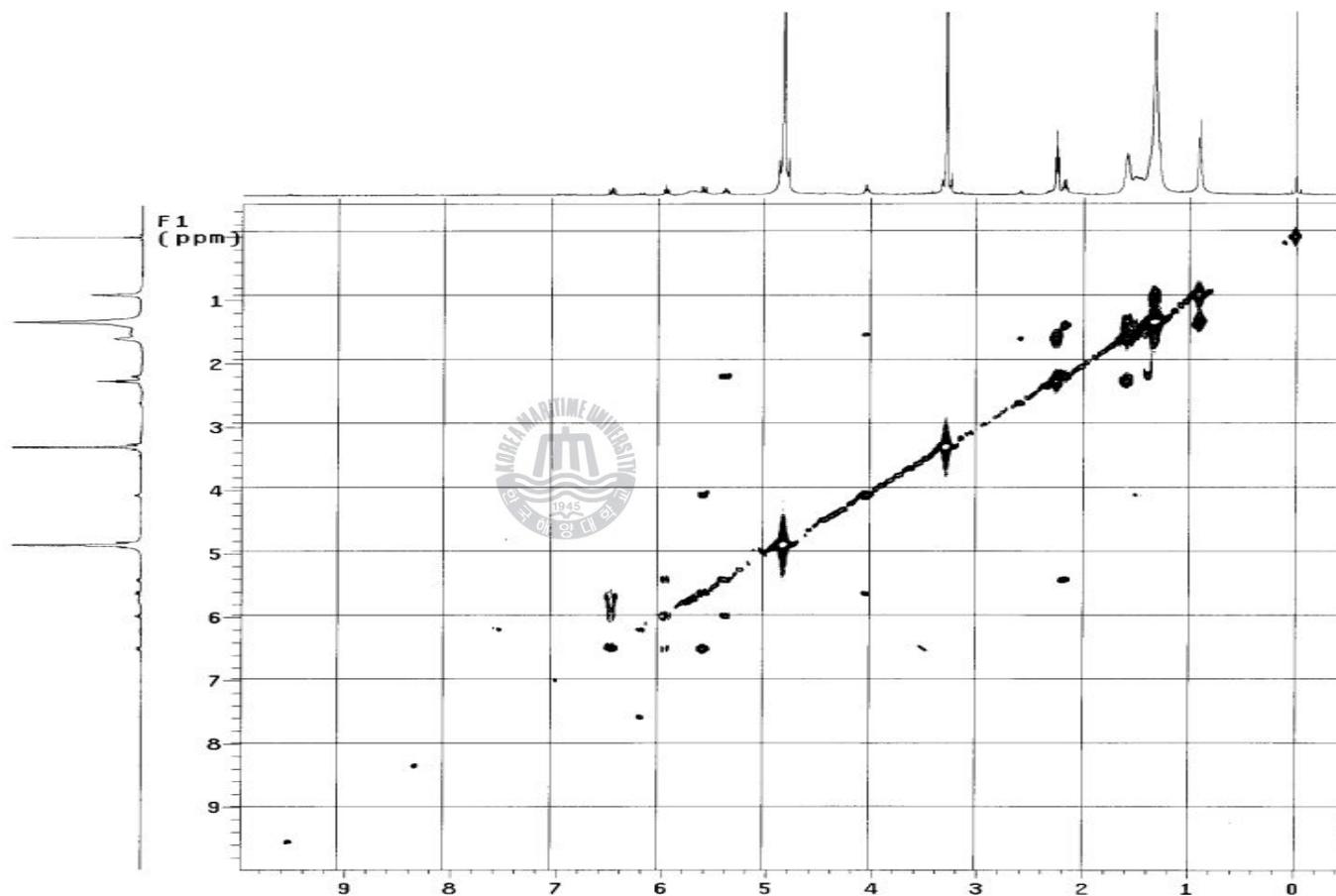
Appendix 9. ^{13}C NMR spectrum of coriolide(2).



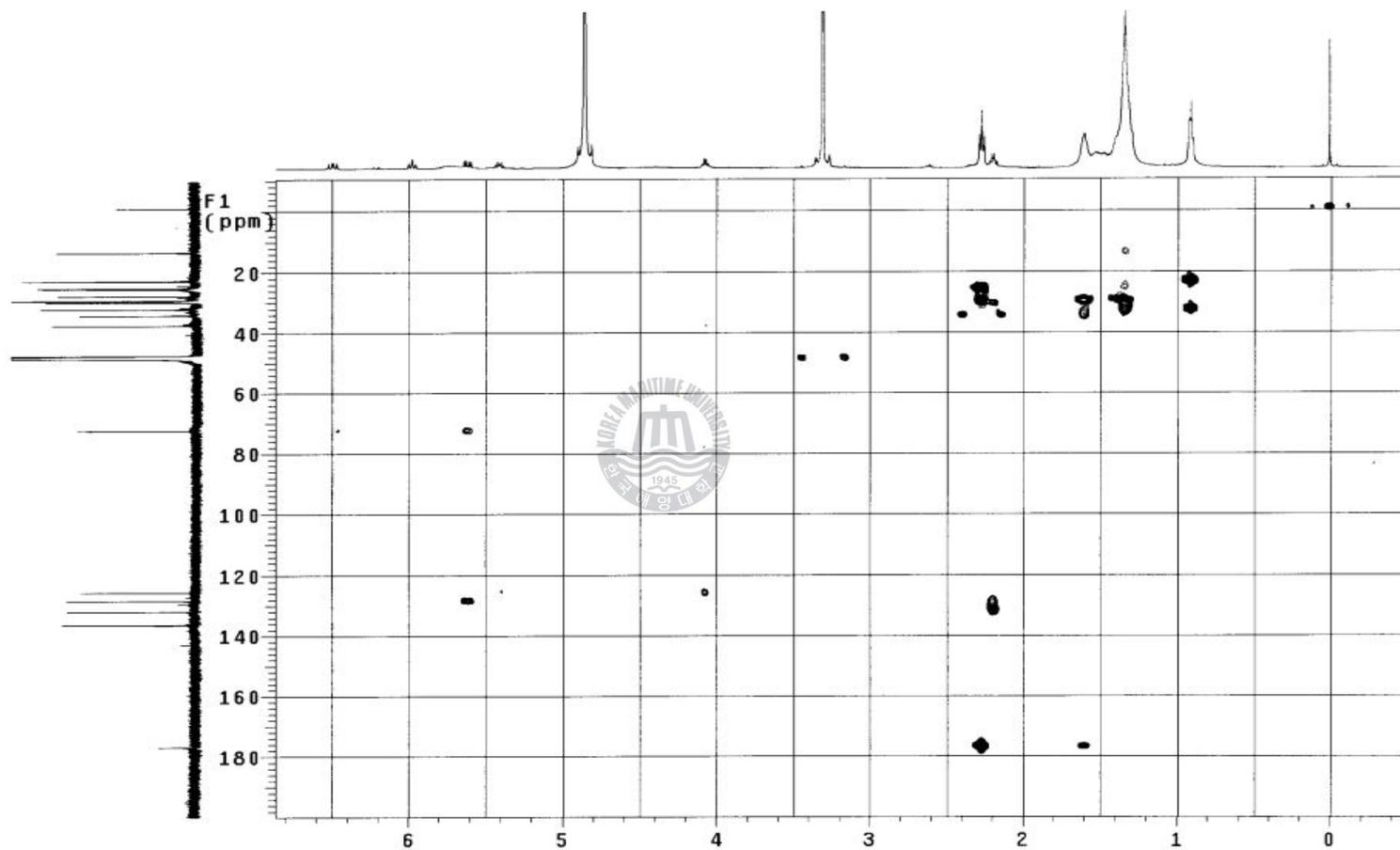
Appendix 10. DEPT spectrum of coriolide(2).



Appendix 11. gHMQC spectrum of coriolide(2).



Appendix 12. ^1H - ^1H COSY spectrum of coriolide(2).



Appendix 13. gHMBC spectrum of coriolide(2).

맺 음 말

아무것도 몰랐던 제가 어느덧 2년의 대학원 생활을 마치고 논문으로 맺음을 하려고 합니다. 논문이 나오기까지 많은 분들의 도움이 있었기에 이를 빌어 감사의 마음을 전합니다.

우선 저에게 많은 가르침과 질책, 그리고 격려를 아끼지 않으셨던 안중웅 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 또한 제가 졸업을 하기까지 학부생활에 많은 가르침을 주신 교수님들께도 감사합니다. 많이 서툴고 모자란 저를 이끌어주고 다독여준 선후배와 동기들에게도 고마운 마음을 전합니다. 특히 지금의 제가 있기까지 많은 고민과 기로 속에서 저를 지지해주고 믿어 주신 부모님과 가족들, 그리고 사랑해주신 모든 분께 정말 감사합니다.

저의 부족함을 채우기 위해 대학원을 선택했습니다. 그런데 배워갈 수록, 채워갈 수록 저의 부족함을 더 느끼게 되는 것 같습니다. 저는 아직 많이 부족합니다. 하지만 차곡차곡 채워 많은 분들이 주신 도움에 보답할 수 있도록 더욱더 노력하겠습니다.

졸업을 앞두고 저는 다시 새 출발을 준비하고 있습니다. 다시 시작하는 저의 길이 되돌아보았을 때 부끄럽지 않도록 항상 노력하는 사람이 되겠습니다. 지금까지 저를 지켜봐주신 모든 분께 다시 한 번 감사합니다.

열심히 하겠습니다.