



이학석사 학위논문

Sorangium cellulosum KM1041이 생산하는 새로운 대사산물, Spirodienal A의 분리와 구조결정 및 생물활성

Spirodienal A, A Novel Metabolite from *Sorangium cellulosum* KM1041 (Myxobacteria): Isolation, Structure Determination and Biological Property



2009년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

유 송 이

本 論文을 유송이의 理學碩士 學位論文으로 認准함.

2008년 11월

한국해양대학교 대학원

List of Tables	i
List of Figures	ii
List of Abbreviations and Symbols	iv
Abstract	1
I. 서론	3
Ⅱ. 실험재료 및 방법	7
1. 실험재료	7
1.1 시약 및 기기	7
1.2 시험균	9
1.3 배지	10
2. 실험방법	11
2.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 순화	11
2.2 세루로즈 용해성 점액세균의 배양	13
2.3 대사산물 추출 및 분획	14
2.4 균주 KM1041의 대사산물의 분리정제	17
2.5 기기분석	19
2.6 생물활성측정	20

Ⅲ. 결과 및 고찰	23
1. 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 특성	23
1.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리	23
1.2 분리된 세루로즈 용해성 점액세균의 특성	24
2. 세루로즈 용해성 점액세균의 대사산물 스크리닝	30
3. 균주 KM1041이 생산하는 대사산물의 분리정제	31
3.1 균주 KM1041의 배양	31
3.2 대산산물의 추출 및 분리정제	31
4. 대사산물의 구조결정	39
4.1 Compound 1의 구조결정	39
4.2 Compound 2의 구조결정	50
5. 생물활성	58
Ⅳ.결 론	61
Ⅴ. 참고문헌	63
부 록	

맺 음 말

List of Tables

Table 1.	Compositions of media used in this experiment	10
Table 2.	Screening of <i>S. cellulosum</i> for antimicrobial activity	31
Table 3.	Physico - chemical properties of compound 1	39
Table 4.	^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of compound 1 (C ₆ D ₆ , 800MHz)	48
Table 5.	Physico - chemical properties of compound 2	50
Table 6.	 ¹³C and ¹H NMR chemical shifts of compound 2 (CD₃OD, 400MHz) 	55
Table 7.	Algicidal activity of compound 2	59

List of Figures

Fig 1.	Fruiting bodies of myxobacteria	4
Fig 2.	A few examples of secondary metabolites produced by cellulolytic myxobacteria, <i>S. cellulosum</i>	6
Fig 3.	Work - up procedure of <i>S. cellulosu</i> m isolates	16
Fig 4.	Key to the fruiting body type of myxobacteria	24
Fig 5.	Fruiting body color of <i>S. cellulosum</i> in filter paper culture	26
Fig 6.	Swarm colony of <i>S. cellulosum</i> on KAN4 agar plate	27
Fig 7.	Swarm colony of <i>S. cellulosu</i> m on Vy/2 agar plate	28
Fig 8.	Cultural characteristics of <i>S. cellulosum</i> during a shaker flask culture	29
Fig 9.	Shaker cultures of strain KM1041	34
Fig 10.	HPLC profile of compound 1	36
Fig 11.	HPLC profile of compound 2	37
Fig 12.	Isolation of compounds 1 and 2 from <i>S. cellulosum</i> strain KM1041	38
Fig 13.	^{13}C NMR spectrum of compound 1 (C ₆ D ₆ , 200MHz)	40
Fig 14.	Partial structure of compound 1	41
Fig 15.	HMBC spectrum of compound 1 (DMSO - d ₆)	42

Fig 16.	HMBC correlations for spiroketal moiety	43
Fig 17.	2D-NMR correlations for $\underline{1}$	44
Fig 18.	The ralative streochemistry of the spiroketal moiety of compound 1	45
Fig 19.	The structure of compound 1 (Spirodienal A)	47
Fig 20.	¹³ C NMR spectrum of compound 2 (CD ₃ OD, 100MHz)	51
Fig 21.	2D-NMR correlations for $\underline{2}$	52
Fig 22.	$^1\mathrm{H}$ NMR (CD ₃ OD, 400MHz) and UV spectra of compound 2	54
Fig 23.	¹ H NMR (CD ₃ OD, 400MHz) and UV spectra of Epothilone A ³³⁾	54
Fig 24.	The structure of compound 2 (Epothilone A)	57

List of Abbreviations and Symbols

[α] _D	:	specific optical rotation
aq.	:	aqueous
calcd.	:	calculated
¹³ C NMR	:	carbon 13 nuclear magnetic resonance
concd.	:	concentrated
COSY	:	homonuclear correlation spectroscopy
DMSO	:	dimethylsulfoxide
EI	:	electron impact
EtOAc	:	ethyl acetate
G	:	gravity force
¹ H NMR	:	proton nuclear magnetic resonance
HMBC	:	heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	:	heteronuclear multiple-quantum connectivity
HPLC	:	high performance liquid chromatography
HREI	:	high resolution electron impact
HRESI	:	high resolution electrospray ionization
Hz	:	hertz
IHD	:	index of hydrogen deficiency
IR	:	infrared
J	:	coupling constant (Hz)
kbp	:	kilo base pair
\mathbf{M}^{+}	:	molecular ion
МеОН	:	methyl alcohol
m.p.	:	melting point
MS	:	mass spectroscopy
m/z	:	mass to charge

NOESY	:	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
R _f (TLC)	:	retention factor
rpm	:	rounds per minute
TLC	:	thin layer chromatography
UV	:	ultraviolet
V max	:	maximum frequency
δ	:	chemical shift



Spirodienal A, A Novel Metabolite from *Sorangium cellulosum* KM1041(Myxobacteria) : Isolation, Structure Determination and Biological Property

Song-Yi Yu

Department of Marine Bioscience and Environment Graduate School of Korea Maritime University

Abstract

The gram-negative myxobacteria belong to the δ -group of proteobacteria and show some outstanding and unique features. They can move by gliding or creeping on surfaces and exhibit a complex life cycle which includes the formation of fruiting bodies and culminates in the production of myxospores upon starvation.⁷⁾ Using exoenzymes, they lyse different biological macromolecules as well as whole microorganisms such as bacteria and yeast.⁴⁾ Over the last decades, myxobacteria have increasingly gained attention as producers of biologically active secondary metabolites which exhibit diverse molecular mechanism of action.^{15,28,30,37)}

Especially, myxobacteria of the genus Sorangium have proved

to be extremely versatile producers of biologically active secondary metabolites.¹¹⁾ This diversity is true both for the basic structures, which are generally new, and for the biological effects and their underlying mechanisms.⁶⁾

But, myxobacteria are not obtained by the routine method for culturing bacteria and thus require a special technique for their isolation and culture. We had succeeded in isolation of pure *S. cellulosum* from Korean soil. Our collection increased last year by 96 strains.

In the course of screening for new bioactive substances from several *S. cellulosum* isolates, strain KM1041 was found to produce bioactive compounds such as epothilones, a promising class of anticancer agent. They were isolated by silica gel column chromatography and RP 18 column chromatography, consecutively. These compounds were finally purified using semi-prep HPLC. Their structures were elucidated by detailed NMR spectroscopic analysis.

As the result of this research, a new compound, termed Spirodienal A, has been isolated. Its structure was elucidated to be novel spiroketal with a terminal dienal group.

The well known anticancer compound epothilone $A^{13,23,35}$ was found to possess algicidal activity. It selectively inhibited the growth of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, in a concentration dependent manner with IC₅₀ of 30μ g/mℓ.

Keywords: Myxobacteria, *Sorangium cellulosum*, Spirodienal A, spiroketal, Epothilone A, algicidal activity

I. 서 론

과거부터 자연계를 통한 생리활성물질의 분리는 주로 식물과 미생물이 대 상이 되어 수행되었다. 특히 미생물은 종의 다양성과 함께 독특하고 흥미로 운 생리활성물질을 생산하는 예가 많고 세대기간이 짧으며 대량생산이 용이 하고 산업적 이용 가능성이 높아서 생리활성물질의 탐색 source로서 관심 을 받아왔다.⁴¹⁾ 그러나 지금까지 알려진 10,000여종의 미생물 기원의 생 리활성 물질은 약 70%가 방선균에서 분리되었고 20%가 진균류에서, 나머 지 10% 정도가 *Bacillus* 및 *Pseudomonas*를 주축으로 한 세균류에서 분리되었음을 볼 때 생리활성물질의 source가 되어온 미생물은 대단히 극 소수의 그룹으로 한정되어 있음을 알 수 있다.¹⁴⁾ 그러한 이유로, 이들을 대 상으로 한 신물질 탐색연구는 기지물질의 재분리에 그치는 경우가 많고 연 구에 소요되는 비용과 시간이 기하급수적으로 증가하게 되어 효과적인 신 물질 탐색을 위하여 새로운 source의 필요성이 대두되었다.⁴¹⁾

점액세균은 특이한 생활사와 독특한 생리적 특성으로 인해 자연계에서 분 리가 어렵고 배양이 까다로워서³⁸⁾ 아직 산업적으로 이용된 적은 없지만 최 근 독일과 일본 등을 중심으로 이들의 새로운 분리법과 배양기술이 개발되 어 연구됨에 따라 생리활성 물질의 새로운 source로 부각되고 있는 활주세 균이다. 아울러, 세루로즈 용해성 점액세균의 일종인 *Sorangium cellulosum* 의 대사산물에서 Taxol의 효과를 능가하면서 taxol-resistant cancer cell 에 효과적인 항암제로 미국 FDA에 승인된 Epothilone(lxabepilone)이 발 견됨으로서 과학자들의 더 많은 관심의 대상이 되고 있다.³⁾

점액세균은 간균으로서 절대호기성균이며 성장속도가 느리다. 모두 12속, 40여종이 알려져 있으며 계통분류상 proteobacteria & -그룹에 속한다. 또한 유전체의 크기가 대략 9,500~10,000kbp로 박테리아 중 가장 큰

- 3 -



Fig 1. Fruiting bodies of myxobacteria

유전체를 가지는 것으로 알려져 있다.^{8,29,31,34,40)}

점액세균은 다른 박테리아와는 구별되는 군집생활과 조직적인 다세포 자실 체 형성(Fig. 1)의 특징이 있으며 수십만에서 수억의 개체가 군집을 이루 어 살면서 활주운동에 의해 먹이를 찾아 이동한다. 또한 여러 가수분해효 소, 항생물질들을 세포 밖으로 배출함으로서 고분자물질을 분해하여 영양원 으로 삼는다.⁴²⁾

점액세균의 이차대사산물에 대해서는 현재 약 100개의 신규화합물과 500 여개의 동족체 화합물이 보고 되어있으며³⁷⁾, 이들은 대부분 타 미생물로부 터 생산된 적이 없는 점액세균 특유의 물질로서 aromatic, heterocycles, quinones, macrolides, polyethers, polyenic compounds, peptides 등 다양한 구조를 나타낸다.⁴¹⁾ 또한 이들 중에는 독특한 기작을 갖고 있는 것들이 많으며, 그 중에 Myxalamide²²⁾, Phenalamide²¹⁾, Myxothilazole¹⁰⁾ 등과 같은 electron transport 저해활성, Sorangicin¹⁷⁾, Disorazole¹⁶⁾ 등과 같은 nucleic acid polymerase 저해활성, Epothilone, Apicularen A²²⁾ 등과 같은 cytoskeleton에 작용하는 물질, Soraphen²⁶⁾의 진균의 acetyl-coA carboxylase 저해활성 등이 보고되어 있다.³⁰⁾(Fig. 2) 본 연구에서는 위와 같이 생리활성물질의 새로운 source로 급부상하고 있 는 세루로즈 용해성 점액세균 *S. cellulosum*을 대상으로 국내토양으로부

터 이들의 분리 및 배양에 관한 방법을 확립하고 분리한 균주의 대사산물에 대한 화학적 규명과 생물학적 특성을 조사하였다.



Fig 2. A few examples of secondary metabolites produced by cellulolytic myxobacteria, *S. cellulosum*

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1 시약 및 기기

1.1.1 시약

균주분리 및 보관에 사용된 배지의 각 구성성분은 Difco사, Junsei사, Sigma사의 EP급 시약을 구입하여 사용하였다(Table. 1참조). 배지에 첨 가한 항생제 Cycloheximide는 Acros사의 EP급을, Kanamycin A는 Junsei사에서 각각 구입하여 사용하였다. 항균활성실험에서 대조약물로 사 용된 Ciprofloxacin은 한국화학연구원으로부터 분양받아 사용하였으며, Nystatin은 Junsei사에서 구입하였다.

추출 및 분획, 대사산물의 분리에 사용된 모든 용매는 Ducsan사의 EP급 용매를 구입하여 재증류 후 사용하였다. NMR 측정을 위한 용매는 C₆D₆(Cambridge Isotope Laboratories, INC. D, 99.5%), CD₃OD (Cambridge Isotope Laboratories, INC. D, 99.8%), DMSO - d₆(Aldrich, D, 99.9%)를 사용하였다.

TLC는 silica gel F₂₅₄, RP-18 gel F₂₅₄(20× 20cm, 0.25mm, Merck) plate를 사용하였으며, column chromatography의 고정상으로는 silica gel 60(0.040-0.063mm, 230-400mesh ASTM, Merck), LiChroprep RP - 18(40-63µm, Merck)을 사용하였다. 1.1.2 기기

균주의 분리 및 배양을 위하여 Sejong사의 Autoclave(SJ-220A45), B.O.D incubator(SJ-250B), Clean bench(SJ-701S2), Shaking incuvator(SJ-808M2)를 사용하였고, Olympus사의 해부현미경(SZ11) 으로 균을 관찰하였다.

단일 compound의 분리를 위한 HPLC는 Shimadzu사의 Diode array detector(SPD-M10Avp), LC-6AD pump, DGV-14A degasser, CLASS-VP ver.6.14 sp1 program으로 수행되었다. 이 때 CAPCELL PAK C18(UG120Å, 5㎞; Shiseido) column을 analytical용(4.6mm i.d.×250mm), preparative용(10mm i.d.×250mm)으로 사용하였다.

¹H - NMR, ¹³C - NMR, 2D - NMR 실험은 한국기초과학연구원에 의뢰 하였으며 Bruker Avance 800과 Varian Unity 500을 사용하여 측정 하였다. Mass 실험은 ESI-MS(MARINE, Perspective Biosystem, U.S.A), HRESI-MS (ESI-IT-TOF, Shimadzu, Japan)로 수행되었다. FT/IR-4100(Jasco), V-670 Spectrophotometer(Jasco), Digital polarimeter(Perkin elmer, U.S.A, 341)로 각각 IR, UV, Optical rotation을 측정하였다. 실험에 사용한 세균과 fungi는 다음과 같으며 한국생명공학연구원 유전자 은행으로부터 분양받았다.

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

ARITIME 40

동결건조된 분말의 상태로 앰플에 담겨져 분양된 각 균주를 활성화 시켰 다. 줄칼을 이용하여 앰플의 중간부분에 금을 긋고, 70% ethanol을 적신 거즈로 잘 닦은 후 가볍게 화염멸균하였다. 이를 무균적으로 clean bench 안에서 절단하고 멸균된 증류수를 첨가한 후 그 현탁액을 적정 평판배지위 에 소량 옮겨 도말하고 B.O.D incubator에서 배양하였다. 순수한 콜로니 를 떼어 평판배양 후 냉장보관하였고, 실험 시에는 streak culture를 시 행하여 활성화 된 균주를 본 실험의 재료로 사용하였다.

1.3 배지

본 실험에서 사용된 배지의 조성은 다음과 같다.(Table. 1)

Table 1. Compositions of media used in this experiment

ST21CX	Solution A: K_2HPO_4 1%, Yeast extract 0.02%, Agar 1.5% Solution B: KNO_3 1%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1%, Cycloheximide 50mg/ ℓ , TES 1m ℓ/ℓ
KAN 4	CaCl ₂ ·2H ₂ O 1%, Cycloheximide 50mg/ ℓ , Kanamycin 250mg/ ℓ , Agar 1.5%, pH7.2
Vy/2	Baker's yeast 0.5%, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1%, Cyanocobalamin 0.5mg/ℓ, Agar 1.5%, pH 7.2
<i>Sorangium cellulosum</i> liquid medium	HEPES 50mM, Potato starch 0.8%, Soyameal 0.2%, Glucose 0.2%, Yeast extract 0.2%, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.01%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01%, Fe-EDTA 0.08%, TES 1ml/ l, pH 7.3~7.4
CAS	Casitone 1%, MgSO4·7H2O 0.1%
NA	Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1%, Glucose 0.1%, Agar 1.5%, pH 7.2
YM	Yeast extract 0.3%, Malt extract 0.3%, Peptone 0.5%, Glucose 1%, Agar 1.5%, pH 7.2
ММ	Peptone 0.5%, Yeast extract 0.3%, Beef extract 0.15%, Glucose 0.1%, Agar 1.5%, pH 7.4

2. 실험방법

2.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 순화

2.1.1 토양 시료 채집 및 처리

2.1.1.1 토양 시료 채집

세루로즈 용해성 점액세균을 분리하기 위하여 경기도 안산, 용인, 경상북도 김천 소재의 직지사, 직지천 부근, 덕천리 나대지 지역에 위치한 과수원, 제 주도 서귀포시 과수원 일대의 토양 시료를 채집하였다. 이 때 지표면의 흙을 걷어낸 다음 5㎝ 깊이까지의 흙을 일정한 간격으로 이동하면서 채취하였다. 채취한 시료를 곰팡이의 증식을 억제하기 위하여 약 일주일간 서늘한 곳에서 충분히 건조시킨 다음 세루로즈 용해성 점액세균의 분리, 순화에 사용하였다.

2.1.1.2 토양 시료 처리

ST21CX agar 배지위에 멸균해 놓은 여과지(직경 10㎝의 반원)를 올린 후,미리 멸균된 증류수를 3~4방울 떨어뜨려 분산되지 않도록 처리한 시료를 시약스푼을 사용하여 직경 0.3~0.5㎝크기로 뭉쳐 여과지 중앙에 한 점씩 올 려놓았다. 이와 같은 방법으로 시료 처리한 배지를 30℃ incubator에서 배 양하였다. 2.1.2 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 순화

토양 시료가 올려진 배지를 30일 동안 현미경을 통하여 세루로즈 용해성 점 액세균의 출현 여부를 관찰하였다. 시료 주위에서 자실체나 여과지가 용해된 부분이 관찰되면 그 부분을 3×1㎝의 크기로 잘라서 별도로 멸균한 여과지를 올린 ST21CX agar 배지에 옮겼으며 이러한 과정을 반복하여 토양 시료로 부터 세루로즈 용해성 점액세균을 일차 분리하였다.

이렇게 하여 분리된 점액세균의 콜로니에는 많은 곰팡이와 세균이 혼재되어 있으므로 다시 KAN4 agar 배지를 사용하여 순화하였다. 이 때 사용된 먹이 균은 *E. coli*였으며, *E. coli*는 다음과 같은 방법으로 배양하였다.

냉장보관 되어있는 *E. coli*를 NA agar 배지에 streak culture 한 후 30℃ incubator에서 24시간동안 활성화시켰다. 'L'자 시험관에 Nutrition Broth(NB)배지를 10㎡넣어 autoclave에서 121℃로 15분간 멸균한 후, 식은 배지에 활성 시켜놓은 *E. coli*의 단콜로니를 접종하여 30℃의 shaking water bath에서 120rpm으로 16시간동안 진탕배양 하였다. 2ℓ 삼각플라스크에 1ℓ의 NB배지를 멸균하여 식힌 후 미리 seed culture 해 둔 *E. coli*배양액 10㎡를 무균적으로 접종하였다. 접종 후 30℃ shaking incubator에서 160rpm으로 16시간 배양 후 4℃, 10000G로 20분 동안 원심분리하여 상등액과 균체를 분리한 다음, 균체를 다시 모아 0.2% NaCl 로 세척한 후 물기를 제거하여 수확하였다.

이러한 과정을 통해 얻어진 *E. coli*균체를 멸균증류수로 5배 희석하여 autoclave에서 멸균한 후 미리 조제해 둔 agar 배지위에 micro-pipet으 로 100^{μℓ}씩 loading하여 직경 1.2~1.5cm의 circular patch를 만들고, 그 가장자리에 일차 분리한 점액세균을 접종하였다. 이를 30℃의 incubator에 서 배양하면서 현미경을 통하여 swarm과 자실체의 형태, 성장도, 오염여부 를 관찰하였다. 이러한 과정의 반복을 통해서 완전히 순화되었다고 판단되면 swarm이나 자실체를 무균적으로 Vy/2 agar 배지에 재접종하여 계대하였 다. Vy/2배지에서는 순화된 균주의 균체량을 확보하기 위하여 streak culture하였으며, 이를 30℃ incubator에서 배양하였다. 성장속도가 우수 하고 자실체가 뚜렷한 균주를 선발하여 자실체의 일부분을 백금이로 긁어내 균주 보관용 배지인 CAS배지에 옮겨 액체질소에서 보관하였다.

2.2. 세루로즈 용해성 점액세균의 배양

2.2.1 종배양

1차 종배양은 Sorangium cellulosum용 액체배지 50ml이 들어있는 300 ml삼각플라스크에 Vy/2 agar 배지에서 배양한 균체를 seed로 하여 30℃ shaking incubator에서 160rpm으로 5일간 배양하였다. 2차 종배양은 동 일한 배지를 사용하였고 1차 종배양한 균체를 seed로 하여 micro-pipet 으로 균체위주로 5ml접종하였다. 배양조건 또한 1차 종배양과 동일하게 수행 하였다.

2.2.2 스크리닝 배양

스크리닝 배양은 2차 종배양한 균체를 seed로 하여 Sorangium cellulosum용 액체배지 0.8ℓ를 기준으로 30℃ shaking incubator에서 160rpm으로 10일간 실시하였다. 스크리닝 배양을 통하여 획득한 균체와 흡 착제 XAD-16을 수확, 추출 및 분획하여 얻은 대사산물을 TLC 및 생물활 성실험에 이용하였고, 이를 종합적으로 고려하여 대량배양용 균주를 선정하 였다.

2.3.2 균주 KM1041의 대량배양

예비배양으로 얻어진 대사산물의 TLC 및 생물활성실험을 통하여 선정된 균주 KM1041의 대량배양을 실시하였다.

Sorangium cellulosum용 액체배지 400mℓ이 들어있는 2ℓ삼각플라스크 에 2차 종배양의 균체를 균체위주로 8mℓ접종하여 30℃ shaking incubator 에서 160rpm으로 10일간 실시하였다. 이 때 생산균주에 대한 자가독성을 방지하고 물질의 생산량을 높이기 위해 흡착제 XAD-16를 1.5%(w/v) 첨 가하였다. 대량배양은 15ℓ씩 10회 실시하였다.

10일간 배양된 KM1041은 pH를 측정한 후 100mesh 채에 걸러 XAD-16과 균체를 배양액으로부터 분리하였다. 배양액 속에 남아서 부유하 고 있는 균체 또한 수확하기 위하여 원심분리를 4℃, 10000G하에서 20분 간 실시하였다. 상등액은 버리고 남겨진 균체를 채에 걸러 분리한 균체와 XAD-16에 포함시켜 추출하였다.

2.3 대사산물 추출 및 분획

배양 후 얻어진 세루로즈 용해성 점액세균의 균체와 XAD-16에 MeOH과 Acetone을 1:1 비율로 넣고 magnetic spin bar와 stirrer를 이용하여 실온에서 6시간동안 추출하였다. 이를 거름종이로 걸러내어 추출액을 분리하 고, 2차 추출은 Acetone만으로 6시간 실시하였다. 다시 Acetone을 사용 한 추출 동작과 추출액의 분리를 여러 회 실시하여 균체와 XAD-16에 흡착 되어있는 대사산물을 완전히 추출하여 얻은 추출액을 rotary evaporator로 농축하여 분획을 실시하였다.

농축하여 얻은 추출액은 배지성분을 제거하기 위해 분별깔대기를 사용하여 H₂O와 EtOAc로 분획하였다. EtOAc층은 sodium sulfate anhydrous로 처리하여 여분의 H₂O를 제거한 후 농축하였다. 농축물에서 무극성의 세포성 분을 제거하기 위해 MeOH과 *n*-Heptane을 이용하여 재분획한 후. MeOH층을 농축하여 XE라 명명하였다.(Fig. 3)

예비배양 후 얻어진 MeOH층은 TLC 및 항균활성실험에 실시하여 대량배 양 균주 선정의 자료로 이용하였고, 선정되어 대량배양한 KM1041의 XE분 획물은 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 분리정제하였다.





Fig 3. Work-up procedure of S. cellulosum isolates

2.4 균주 KM1041 대사산물의 분리정제

2.4.1 TLC

TLC(Thin layer chromatography)는 Silica gel plate(silica gel F₂₅₄, 20×20cm, 0.25mm, Merck)와 RP-18 plate(RP-18 gel F₂₅₄, 20×20cm, 0.25mm, Merck)를 적절한 크기로 절단하여 이용하였고, 전개 용매로는 CH₂Cl₂, MeOH, EtOAc, *n*-Hexane, H₂O등의 다양한 유기용 매를 두개 이상의 조합으로 사용하였다. 전개 후 TLC는 UV 254nm와 365 nm에서 흡수를 관찰하였고, 여러 가지 발생시약을 통해 나타나는 색을 확인하 였다.

사용된 발색시약과 그 조제법은 다음과 같다.

① VS(Vanillin-sulfuric acid)

Ethanol 300㎖에 황산 3㎖, vanillin 9g을 넣어 시약을 제조하였다. 전개시킨 TLC plate에 분무한 후 120℃로 가열하였다.

NITIME

2 Ninhydrin

n-Buthanol 100㎖에 ninhydrin 0.3g을 녹인 다음 초산 3㎖을 첨가 하여 제조하였다. 전개시킨 TLC plate에 분무 후 100℃로 가열하였다.

③ Dragendorff

10ml의 빙초산이 함유된 40ml의 증류수에 0.85g의 basic bismuth nitrate를 녹인 후 8g의 KI를 녹인 20ml증류수를 첨가하여 시약을 제조 하였다. 전개시킨 TLC plate에 분무하였다. **④** Anisaldehyde-sulphuric acid (AS)

0.5ml의 anisaldehyde를 10ml 빙초산에 첨가한 후, 85ml의 MeOH, 5ml의 진한 황산 용액을 함께 TLC plate에 분무하였고, 100℃로 가열 하였다.

2.4.2 칼럼 크로마토그래피

Silica gel(silica gel 60, 43-63, Merck), RP-18 gel (LiChroprep RP-18, 40-63, Merck)을 고정상으로 충진하였고, 2×30cm, 3×30cm 크기의 칼럼을 사용하였다.

순상 크로마토그래피의 충진제는 silica gel을 사용하였고, 이동상으로 CH₂Cl₂/MeOH, *n*-Hexane/EtOAc계를 이용하여 극성을 단계적으로 증가시키는 방법으로 흘려주었다.

역상 크로마토그래의 충진제는 RP-18 gel을 사용하였고, 이동상으로 MeOH/H₂O계를 이용하여 MeOH의 농도를 점차 증가시키는 방법으로 흘려주었다.

2.4.3. HPLC

Analytical HPLC는 혼합물의 분리 조건을 정하거나 혹은 분리된 화합 물의 순도 평가와 기존 화합물의 비교확인을 위해 수행하였다. 본 실험에는 diode array detector를 장착한 HPLC를 사용하였으며, 칼럼은 CAPCELL PAK C18 (UG120, 5µm; 4.6mmI.D.×250mm, Shiseido)을 사용하였다. 이 때 MeOH/H₂O계를 이동상으로 하여 gradient mode와 isocratic mode로 분석하였다. Semi - preparative HPLC는 analytical HPLC로 정해진 분리조건을 기준으로 하여 혼합물에서 순수한 물질을 분리하기 위해 수행하였다. Analytical HPLC와 동일한 HPLC를 사용하였으며, 칼럼은 CAPCELL PAK C18(UG120Å, 5/m; 10mmI.D.×250mm, Shiseido)을 사용하였다. 이동상은 analytical HPLC와 동일하고, isocratic mode로 분취하였다.

2.5 기기분석

¹H, ¹³C - NMR, 2D - NMR 실험은 Bruker Avance 800와 Varian Unity 500을 사용하여 800MHz, 500MHz에서 측정하였으며, Mass 실 험은 ESI-MS(MARINE, Perspective Biosystem, U.S.A), HRESI-MS (ESI-IT-TOF, Shimadzu, Japan)로 수행되었다. FT/IR-4100(Jasco), V-670 Spectrophotometer(Jasco), Digital polarimeter(Perkin elmer, U.S.A, 341)로 각각 IR, UV, Optical rotation을 측정하였다. UV의 ε과 [α]_D는 다음의 식으로 결정하였다.

UV:
$$\varepsilon = \frac{OD \times MW}{Optical path length(cm) \times 놓도(mg/ml)}$$

$$[\alpha]_{D} = \frac{100 \times (\Lambda \mathbf{a} \mathbf{8} \mathbf{\mathfrak{S}} \mathbf{\mathfrak{S}})}{\text{Optical path length(dm)} \times \text{농도}(g/m\ell)}$$

2.6 생물활성측정

2.6.1 항균활성

항균활성 측정은 paper disc 확산법을 사용하였으며, 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양받은 gram positive의 *Staphylococcus aureus*, gram negative의 *Escherichia coli*, 효모 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Rhodotorula rubra*, *Candida albicans*를 시험균으로 하였다

냉장보관된 S. aureus, E. coli, S. cerevisiae, R. rubra, C. albicans 를 NA agar 배지, YM agar 배지, MM agar 배지에 각각 streak culture하여 30℃ B.O.D incubator에서 활성시켰다. 활성화 된 세균 및 효모의 콜로니를 멸균증류수에 희석하였다. 균희석액 100,40를 NA agar 배지, YM agar 배지, MM agar 배지에 각각 loading 한 후, 화염멸균한 도말봉으로 도말하였다. 멸균한 6mm paper disc에 50,000ppm과 10,000ppm으로 조제된 시료용액을 20,40씩 각각 loading 한 후 clean bench에서 20분간 건조시켜 균을 도말한 배지위에 간격이 3.0cm정도 되 도록 올려주었다. 이 때 무처리구로서 MeOH:CH₂Cl₂이 1:1 비율로 혼합 된 용매를 사용하였고, 대조약물로서 Ciprofloxacin 10ppm, Nystatin 100ppm을 사용하였다. Disc를 loading한 각각의 배지는 30℃ B.O.D incubator에서 48시간 배양 후 vernier caliper로 inhibition zone의 크기를 측정하였다. 분리한 물질 compound 1에 대하여 세포독성실험을 실시하였다. 본 실험 은 성균관대학교에 의뢰하여 수행하였으며 인체 대장암 세포인 HCT-15 외 5종에 대한 세포독성을 관찰하였다. 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)사로부터 분양받아 배양하였다. 세포배양은 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), penicillin (100units/ml), streptomycin(100µg/ml)을 첨가한 DMEM을 배양액으 로 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양하였으며, 세포밀도가 높아지면 수 분 동안 trypsin 처리(0.05% trypsin, 0.02% EDTA in Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium)하여 세 포를 떼어내어 사용하였다. 실험 시 세포가 지수기(logarithmic phase) 에 있도록 배양하였고, 모든 실험에는 계대배양 15번 이내의 세포를 사용 하였다. 세포가 받는 세포독성은 SRB assay³³⁾를 통하여 세포 생존율을 측정함으로서 수행되었다.

세포배양 종료 후 배지를 제거하고 15% cold TCA를 1ml씩 가하여 4℃ 에서 1시간 방치한 후 상수로 5회 세척, 건조하고 1% 초산용액으로 녹인 0.4% SRB 0.25ml를 가하여 1시간 방치하였다. 이 때 과량의 색소를 1% 초산용액으로 5회 세척 건조한 후 10mM Tris Brffer를 적당량 가 하여 색소를 용해시켜 96 well plate를 이용하여 520nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. Positive control은 5 - fluorouracil (5 - Fu)를 사용하였다. 분리한 물질 compound 2에 대하여 담수조류에 대한 생육저해활성을 조 사하였고 한국화학연구원에 의뢰하여 수행하였다. 본 실험에 사용된 시험생 물은 한국생명공학연구원 환경생물공학연구실에서 분양된 남조류 *Microcystis aeruginos*a UTEX2388, 녹조류 *Chlorella vulgaris*를 사용하였고, Allen's media, 온도 25℃, 광주기 14시간, 광도 50µmolm⁻²s⁻¹조건에 서 흔들면서 계대배양하였다.

시험약제 처리시 용액 3ml에 각각의 조류 건물중이 0.3mg이 되도록 조류 초기농도를 조정하였고, 시험농도는 1~100ppm 수준으로 하였다. 시험약 제를 DMSO에 녹여 50ml 배양병에 들어있는 10ml 배지에 직접 투여하여 각 농도의 시험용액을 조제하였고, DMSO 최종농도는 1%였다. 모든 처리 는 3반복하여 실시하였다. 시험기간동안 온도 25℃, 광주기 14시간, 광도 52µmolm⁻²s⁻¹조건을 유지하여 6일 배양하였다.

6일 후 각 처리별로 0.2ml씩을 취하여 96 well plate에 분주한 후 microplate reader를 이용하여 파장 679mm에서 흡광도를 구하였다. 그 후 사전 실험을 거쳐 구해진 흡광도(A670mm)-건물중 관계식을 통하여 건 물중으로 환산한 다음, 무처리 대비 건물중 억제율을 구하여 약제의 담수주 류 방제 효과로 표시하였다. 관계식은 다음과 같다. Y는 흡광도, X는 건물 중을 의미한다.¹⁹⁾

〈흡광도-건물중 관계식〉

Microcystis aeruginosa $Y=-0.00837X^2+0.2524X+0.00383$ Chlorella vulgaris Y=0.4304X+0.0384

- 22 -

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 특성

1.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리

경기도 안산, 용인, 경상북도 김천 소재의 직지사, 직지천 부근, 덕천리 나대 지 지역에 위치한 과수원, 제주도 서귀포시 과수원 일대의 토양 시료를 채집 하여, 곰팡이의 증식을 억제하기 위해 약 일주일간 서늘한 곳에서 충분히 건 조시켰고 약 3000점의 토양시료를 준비하여 지역별로 일정수를 선발하였다. 선발한 토양시료는 멸균한 여과지가 올려진 ST21CX agar 배지에 처리하 여 30일 동안 관찰하였고, 시료 주위로 형성되는 yellow, orange, black 의 여과지용해부분을 확인할 수 있었다. 현미경으로 관찰하여 자실체 및 swarm이 확인되면 3~4번의 순화를 통하여 KAN4 agar 배지에 계대하여 재순화하였고, 오염여부를 확인한 후 Vy/2 agar 배지에 무균적으로 계대하 였다. Vy/2 agar 배지에 streak culture하여 균체량이 확보되면 CAS media에 넣어 액체질소에 보관하였다. 이러한 방법을 통하여 총 96균주의 세루로즈 용해성 점액세균을 분리하였다.

점액세균은 타 세균이나 미생물을 분리하는 일반적인 방법으로는 자연계로 부터 분리되지 않고 single colony의 형성의 어려움, 저영양균이자 성장속 도가 느린 특징, 배양조건이 까다로운 점들로 인해 타 미생물에 비해 현저히 선행연구가 없다.³⁹⁾ 또한 미생물 보존기구에서 보존되고 있는 이들의 수도 매우 적은 실정이다. 이러한 상황에서 본 실험을 통해 국내에서 처음으로 세 루로즈 용해성 점액세균의 분리에 성공하고, 총 96균주를 분리하여 보존하고 있는 점에서 주목할 가치가 있다고 사료된다.

세계적으로 젂액세균은 아직 그 연구가 명확히 확립되어 있지 않다. 따라서 분류학적 연구가 분명하지 않아 변경될 수도 있는 과도기적인 상태에 있다. 현재 다양한 종류의 고분자 물질을 용해하여 영양원으로 하는 젂액세균의 특 성을 바탕으로 타 미생물을 용해하는 용균성 젂액세균(Bacteriolytic **용해성** 세루로즈를 용해하는 세루로즈 mvxobacteria)과 점액세규 (Cellulolytic myxobacteria)으로 크게 분류하며, 다시 용균성 점액세균 은 swarm과 자실체의 형태로 11속 34종 (*Myxococcus, Corallococcus,* Angiococcus, Archangium, Cystobacter, Melitangium, Stigmatella, Polyangium, Haploangium, Chondromyces, Nanocystis), 세루로즈 용 해성 점액세균은 모두 *Sorangium cellulosum*으로 1속 1종만이 인정되고 있다.^{2,27)}(Fig. 4) BITIME



Fig 4. Key to the fruiting body type of myxobacteria 27

본 실험에서는 여과지를 분해하여 영양원으로 이용하는 접액세균의 특성을 바탕으로 선택적으로 세루로즈 용해성 접액세균을 분리하였고, 고체배지에서 투명한 막 안에 둥그런 포자낭들이 군집을 이루는 형태의 자실체와 swarm이 뻗어나가는 모습을 통하여 세루로즈 용해성 점액세균임을 재확인 할 수 있었 다. 또한 분리한 균주 중의 하나인 KM1001을 한국미생물보존센터에 위탁 하여 수행한 16s rRNA 염기서열 분석에서 분류학적으로 S. cellulosum에 속하는 것임을 명확히 알 수 있었고 이를 KCCM 80040으로 기탁하였다. 그러나, 1속 1종만이 인정되는 S. cellulosum이지만 실험과정에서 고체배 양 시 균체의 성장양상과 액체배양 시 각기 다른 특성이 있음이 확인되었다. Vy/2 agar 배지에서는 세 가지 다른 성장 특성을 보였다. 균체가 배지위로 둔덕을 형성하는 형태, 배지 아래로 파고드는 형태, 배지 표면으로 뻗어가는 형태를 관찰할 수 있었고, 자실체의 색 관점에서는 vellow type, red type, black type의 세 가지 형태가 나타났다. 액체배양 시에는 균체의 색 이 vellow type, red type, black type으로 일정하게 유지된 경우와 red type에서 black type으로, 또는 black type에서 red type나 yellow type으로 변하는 경우도 확인되었다.(Fig. 5 - 8)

이러한 점에서 볼 때 세루로즈 용해성 점액세균은 적어도 세 가지 이상의 종 으로 분류되어야 할 것으로 판단되고, 더 많은 연구가 필요로 한 것으로 사료 된다.



Yellow type



Red type



Black type

Fig 5. Fruiting body color of *S. cellulosum* in filter paper cultures


Yellow type



Red type



Black type

Fig 6. Swarm colony of S. cellulosum on KAN4 agar plate



Yellow type



Red type



Black type

Fig 7. Swarm colony of S. cellulosum on Vy/2 agar plate



Yellow type



Red type

Black type

Fig 8. Cultural characteristics of *S. cellulosum* during a shaker flask culture

2. 세루로즈 용해성 점액세균의 대사산물 스크리닝

토양시료로부터 분리된 총 96균주의 세루로즈 용해성 점액세균 중 49균주 의 예비배양을 통하여 대사산물을 얻었고, 얻어진 대사산물에 대하여 TLC 패턴 및 항균활성을 측정하여 대량배양 선정에 이용하였다. 항균활성에 대한 결과는 Table 2와 같다.

독일의 GBF의 연구결과에 의하면 *S. cellulosum*의 배양액으로부터 분리 한 그 대사산물의 약 95%가 생물학적 활성이 있었으며, 그 중 46%는 천연 물에서 새롭게 분리된 생산물이었다고 보고한 바 있다.³⁰⁾

본 실험결과에서는 49균주 중 Gram 음성세균인 *E. coli*에 대하여 7균주 (14.2%), Gram 양성세균인 *S. aureus*에 대하여 26균주(53.0%), 효모 *R. rubra*에 대하여 6균주(12.2%), 효모 *C. albicans*에 대하여 15균주 (30.0%)가 활성이 있음을 확인하였다. 또한 49균주의 대사산물 모두가 하 나 이상에 대한 활성이 나타나 *S. cellulosum*의 약 95%가 생물학적 활성 이 있다는 보고에 확실성을 보여주었다.

C +	Conc. Inhibition zone (mm)							
Strain	($\mu g/m\ell$)	E. coli	S. aureus	R. rubra	C. albicans			
KM1001	10000	-	-	-	7.4			
KM1002	10000	_	-	-	11.1			
KM1003	10000	_	±	-	_			
KM1004	10000	-	8.9	-	-			
KM1006	10000	±	-	-	_			
KM1007	10000	_	-	-	9.1			
KM1008	10000	-	-	_	11.2			
KM1010	50000	9.8	-	_	8.75			
KM1014	50000	_	MARITIME WILL	_	14.0			
KM1015	40000	_		-	8.5			
KM1016	10000	_	1945	-	_			
KM1017	10000	±	-	-	_			
KM1018	10000	_	10.5	-	_			
KM1019	10000	_	8.6	_	_			
KM1020	10000	_	\pm	_	_			
KM1021	50000	_	-	-	12.7			
KM1022	50000	_	-	-	14.9			
KM1023	50000	_	\pm	-	_			
KM1024	10000	_	-	8.8	_			
KM1025	50000	_	_	_	13.4			

Table 2. Screening of *S. cellulosum* for antimicrobial activity

KM1027	20000	-	\pm	-	-
KM1028	40000	15.5	_	±	-
KM1029	10000	±	-	-	-
KM1031	10000	_	-	-	±
KM1032	10000	-	11.9	-	-
KM1033	50000	_	12.1	-	27.3
KM1034	50000	-	11.2	-	_
KM1036	50000	_	±	-	_
KM1040	50000	±	-	-	_
KM1041	50000	_	27.2	_	-
KM1042	50000	-		±	_
KM1043	50000	_	19 1945 01 93 11 31	_	12.8
KM1044	50000	±	-	-	_
KM1045	10000	_	±	_	-
KM1054	10000	-	-	15.9	_
KM1059	10000	_	-	±	-
KM1063	10000	_	14.1	_	-
KM1065	10000	_	_	12.0	-
KM1066	10000	_	7.0	-	-
KM1067	50000	_	9.1	_	_

KM1068	50000	-	9.5	-	-
KM1071	50000	-	11.4	_	-
KM1072	50000	-	9.3	_	-
KM1073	50000	-	11.5	-	-
KM1075	50000	-	6.8	-	9.9
KM1082	50000	-	11.9	-	7.5
KM1083	50000	-	7.6	-	-
KM1084	50000	-	8.1	-	_
KM1085	50000	-	12.8	_	-

– Determined by the agar diffusion test using paper discs of $6\,\mathrm{nm}$ diameter.



항균활성과 TLC 패턴에 대한 screening 결과 대량배양의 균주로 KM 1041이 선정되었다.

S. cellulosum 균주 KM1041은 경기도 용인지역의 토양시료에서 분리한 균주이며, 본 실험에서의 S. cellulosum 분류에서 red type에 속한다. 고 체배양 시에 붉은 색의 자실체를 형성하였고, swarm은 나뭇가지와 같은 형 태로 자랐으며 특히, 다른 균주에 비하여 성장 속도가 빠른 것을 확인하였다. 액체배양에서도 역시 성장 속도가 빨라 많은 균체를 형성하였고, 점액세균의 액체배양 특징인 벽면에 띠를 두르는 현상도 관찰되었다. (Fig. 9) 또한 균주 KM1041을 생물자원센터에 KCTC11426BP로 기탁하였다.



Fig 9. Shaker cultures of strain KM1041

3. 균주 KM1041이 생산하는 대사산물의 분리정제

3.1 균주 KM1041의 배양

경기도 용인에서 수집한 토양시료로부터 분리된 균주 KM1041은 균체색이 붉은 red type으로 15 ℓ씩 총 10회의 대량배양을 하였다. 배양 시 3일간은 노란색의 균체로 성장하다가 시간이 경과 할수록 붉은 색의 균체로 변하는 것 을 관찰할 수 있었고, 배지성분으로 인하여 혼탁했던 배양액도 균체가 성장해 감에 따라 투명하게 변하였다. 10일 간의 대량배양이 끝난 후 sieving 및 원 심분리를 통하여 배양액으로부터 균체와 흡착제 XAD - 16을 수확하였다.

3.2 대사산물의 추출 및 분리정제

대량배양을 거쳐 수확한 균주 KM1041의 균체와 흡착제 XAD - 16에서 MeOH과 Acetone 1:1 용매를 사용한 1차 추출과, Acetone만을 사용한 2~5차 추출을 통하여 그 대사산물을 추출하였다. Rotary evaporator를 이 용하여 추출액을 농축하고, EtOAc층과 H₂O층으로 분획하였으며, EtOAc 층을 다시 MeOH와 *n*-Heptane으로 분획하여 얻은 MeOH층을 농축하고 dark brown gum 형태의 XE(XAD extract)를 24.7g 얻었다.

ANTIME UM

Strain KM1041의 XE 24.7g을 CH₂Cl₂ 100%(fr.1), CH₂Cl₂:MeOH 95:5(fr.2), CH₂Cl₂:MeOH 9:1(fr.3), CH₂Cl₂:MeOH 4:1(fr.4) 비율 로 용매를 단계적으로 사용하여 silica gel column chromatography하였 다. 이 중 fr.2(9.9g)를 RP - 18 column chromatography를 하여 용매 는 aq. MeOH 30%(fr.2.1), 50%(fr.2.2), 60%(fr.2.3), 70% (fr.2.4), 80%(fr.2.5), 90%(fr.2.6), 100%(fr.2.7)로 step gradation으로 실시 하였다.

Fr. 2.6인 aq. MeOH 90%에서 얻어진 물질 4.5g은 *n*-Hexane: EtOAC 비율을 8:2(fr. 2.5.1), 7:3(fr. 2.5.2), 6:4(fr. 2.5.3), 5:5(fr. 2.5.4), 4:6(fr. 2.5.5), EtOAC 100%(fr. 2.5.6)로 단계적으로 사용하 여 silica gel column chromatography하였다. Fr. 2.5.3의 327mg은 RP - 18 prep HPLC(aq. MeOH 70, flow 4mℓ/min, UV 254nm)를 통 하여 run time 80min에 10mg의 Compound 1를 얻을 수 있었다. HPLC pattern에서 Compound 1를 제외한 다른 peak중 동일하게 277nm에서 최 대 UV흡수를 보이는 유도체가 run time 70min, 130min에 각각 관찰되 었고 최소한 2개 이상의 유도체가 더 있음을 알 수 있었다(Fig. 10).ℓ당 0.15mg으로 대사산물 중 미량 존재하는 compound 1에 비하여 더 적은 양 으로 존재하는 유도체들의 분리를 위하여 현재 대량배양 수행 중에 있다.



Fig 10. HPLC profile of compound 1

Compound 1을 분리하던 중 많은 양으로 존재하고, UV pattern이 특이 한 물질이 존재하여 그 또한 분리수행하였다. 분리방법은 다음과 같았다. Fr.2.3인 aq. MeOH 60%에서 얻어진 476mg을 RP-18 prep HPLC (aq. MeOH 65%, flow 4ml/min, UV 254nm)를 통하여 run time 12분 에 120mg의 compound 2를 얻을 수 있었다.(Fig. 11)



Fig 11. HPLC profile of compound 2



Fig 12. Isolation of compounds 1 and 2 from S. cellulosum KM1041

4. 대사산물의 구조결정

4.1 Compound 1의 구조결정

Compound 1의 물리학적 특성은 Table. 3에 나타내었다. 무색의 oil형 태로 분리된 compound 1은 277mm에서 UV의 최대흡수를 보였으며, Optical rotation은 +39.4° (c 0.66, MeOH)였다. ¹³C NMR과 EI - MS (573.7[M+Na]⁺)를 통해서 분자량 550을 예상하였고, 573.3785m/z (+1.8mmu error)의 HREI - MS를 통해 C₃₂H₅₄O₇(IHD:6)의 분자식을 결정하였다. IR의 data의 3437cm⁻¹, 1680cm⁻¹흡수는 NMR data와의 상 호관계를 고려하여 hydroxy group(-OH), carbonyl group중 aldehyde (-CHO)에 해당함을 알 수 있었다.

Table 3. Physico-chemical properties of compound 1

ARITIME UN

	and the second s
	Compound 1
Appearance	Colorless oil
Molecular formula	$\mathrm{C}_{32}\mathrm{H}_{54}\mathrm{O}_{7}$
Molecular weight	
ESI-MS(m/z)	$573.7[M+Na]^+$
HRESI-MS(m/z)	found 573.3785 calcd. 573.3767
UV λ_{\max} (MeOH) nm (ε)	277(23,200)
IR $v_{\max}(KBr) \operatorname{cm}^{-1}$	3437, 2926, 1680, 1116
$\left[\alpha \right]_{D}^{20}$	+39.4° (c 0.66, MeOH)
TLC (EtOAc: <i>n</i> -Hexane=1:1)	$R_f = 0.63$



Fig 13. ¹³C NMR spectrum of compound 1 (C₆D₆, 200MHz)

¹³C NMR과 ¹H NMR data를 통하여 2개의 quaternary carbon(δ 136.1, δ98.9), 6개의 oxymethine(δ77.6, δ76.4, δ75.6, δ 74.2,δ 71.9, δ70.6)과 aldehyde carbon을 포함하는 12개의 methine(δ192.8, δ145.6, δ144.0, δ133.2, δ129.4, δ121.6, δ39.5, δ36.9, δ36.0, δ35.3, δ32.9), 3개의 methylene(δ36.4, δ33.5, δ46.8), methoxy group(-OCH₃)을 포함하는 9개의 methyl(δ55.4, δ19.8, δ18.1, δ16.5, δ16.3, δ13.8, δ9.7, δ 7.7, δ4.5)이 존재하는 것을 알 수 있었다.(Fig. 13)

NMR data를 통하여 확인한 carbon(32개)과 proton(51개)의 수, 그리 고 chemical shift(aldehyde, methoxy, oxymethine)로 예상할 수 있는 oxyzen의 수를 분자식(C₃₂H₅₄O₇)과 대조하여 ether 결합(-C-O-C-)



Fig 14. Partial structures of compound 1

과 3개의 hydroxy기(-OH)가 존재함을 추정하였다. ¹H-¹H COSY, long-range ¹H-¹³C HMBC correlation spectroscopy를 통하여 compound 1의 부분구조 및 평면구조를 분석하였다.

Aldehyde proton H - 1(δ9.48)부터 주변의 proton에 의해 계속적으 로 연결되는 ¹H-¹H COSY data를 통해 H - 8(δ1.68)까지의 구조와 H - 10(δ1.8)에서 H - 12(δ3.38)까지의 구조를 알았으며 HMBC correlation으로 이들이 연결됨을 확인하여 첫 번째 부분구조를 알 수 있 었다. 또한 methylene proton H - 14(δ 2.36, δ1.52)부터 methine proton H - 20(δ1.6)까지의 ¹H-¹H COSY data로 연결되는 두 번째 부분구조 또한 확인할 수 있었다. Sp₂ carbon인 C - 22(δ136.1)과 C-23



Fig 15. HMBC spectrum of compound 1 (DMSO $- d_6$)

(∂121.6)은 각각의 치환된 methyl기 22 - CH₃(∂1.53), 23 - CH₃(∂
1.54)proton의 HMBC correlation으로 서로 연결됨을 확인하였고,
C - 21(∂46.8)로의 연결도 관찰되어 세 번째 부분구조를 완성하였다.
20 - CH₃(∂0.72)의 C - 21로 의 HMBC correlation은 두 번째, 세 번
째 부분구조 연결됨을 증명하였다.(Fig. 14)

Compound 1은 분자식에서 알 수 있듯이 7개의 oxyzen을 포함하고 있 었다. 그 중 NMR data와 IR로서 확인한 aldehyde의 oxyzen을 제외한 6개의 oxyzen의 성격을 확인하기 위하여 DMSO-d₆를 용매로 한 500MHz NMR spectroscopy를 실시하였다. 앞서 언급했듯이 ¹H NMR data에서 3개의 hydroxy기(-OH)의 존재를 확인할 수 있었으며, ¹H-¹H COSY data에 의해 H - 12에 연결된 hydroxy기와 C-6(δ 36.0),



Fig 16. HMBC correlations for spiroketal moiety

C - 13(∂98.9), C - 20(∂35.3)으로의 각각의 HMBC correlation을 통하여 세 개의 hydroxy기의 위치를 결정하였다.(Fig. 15)

Ether 결합, 남은 IHD인 2를 고려하여 ring 두개가 ether 결합으로 연결 되는 spiroketal ring이 예상되었다. 완성된 두 개의 부분구조 중 H-11 (δ1.62), H-14(δ1.52, δ2.36), H-17(δ3.8)의 quaternary carbon C-13(δ98.9)로의 HMBC correlation이 이를 지지하였다(Fig. 16). 이 상의 data로서 compound 1의 평면구조를 결정하였다.(Fig. 17)



Fig 17. 2D-NMR correlations for <u>1</u>. Bold lines show TOCSY correlation and arrows show HMBC correlations.



Fig 18. The relative streochemistry of spiroketal moiety of compound 1

Spiroketal ring의 side chain에 존재하는 이중결합들의 configulation은 vicinal coupling constants와 ROESY data로 이루어졌다. H - 2(6.00)와 H - 3(δ 7.13)의 vicinal coupling constant 15.2Hz는 E configuration을, H - 4, H - 5의 10.4Hz vicinal coupling constant 는 Z configuration를 의미하였다. 또한 H - 1/H - 3, H - 2/H - 4, H - 4/H - 5의 ROESY correlation이 이를 지지하였다. H - 22,H - 23의 configulations은 H - 23/H - 21의 ROESY correlation으로 Z configuration임을 알 수 있었다.

Spiroketal ring의 relative streochemistry는 ¹H - ¹H coupling constants와 NOE correlation을 통하여 결정하였다. H - 12(&3.38)의 broad한 singlet의 multiplicity를 통하여 H - 11(&1.88, &1.62)과 작 은 coupling constant로 correlation함을 확인하였다. 이를 통하여 H - 12가 ring에서 equatorial로 향함을 알 수 있었다. H - 12에서부터 관 찰되는 NOE correlation을 Fig. 18에 나타내었다.

H - 12/14 - Hb, 14 - Hb/16 - CH₃, 16 - CH₃/15 - OMe, H - 12 /11 - Hb, 11 - Hb/H - 10 사이의 NOE correlation과 10 - CH₃/H - 9, H - 9 /H - 11a, H - 16/H - 17의 NOE correlation이 확인되었다. 구조의 안정성을 위해 서 치환체인 R₁과 R₂가 equatorial로 향해있어야 하는 이론적 사실 또한 이 data를 통해 인정되었다.

Compound 1의 평면적, 입체적 구조를 결정한 후 문헌을 조사한 결과 Spiroketal ring을 포함하는 새로운 화합물로서 *S. cellulosum*에서 새로 운 물질을 분리하였음을 확인하여 Spirodienal A라 명명하였다.(Fig. 19) Spirodienal A는 spiroketal ring을 중심으로 두개의 side chain이 존 재하며 그 중 하나의 chain 말단에 dienal을 포함하는 구조이다.





Fig 19. The structure of Spirodienal A (compound 1)

	s ca)	5 T T b)	NA 1/1 11 1/	J	IIMDO
Pos.	ð C='	δH	Multiplicity	[Hz]	НМВС
1	192.8 d	9.48	d	8.0	C - 2, C - 3
2	133.2 d	6.00	dd	8.0, 15.2	C - 1, C - 4
3	145.6 d	7.13	dd	11.2, 15.2	C - 1, C - 5
4	129.4 d	5.92	t	10.4	C - 2, C - 6
5	144.0 d	6.18	t	10.4	C - 3,C - 6,C - 7,6-CH ₃
6	36.0 d	2.88	m		C - 5, 6-CH ₃
7	75.6 d	3.78~3.84 ^{c)}	m		C - 5,C - 8,C - 9
8	39.5 d	1.68	m		C - 10,8-CH ₃
9	74.2 d	3.78~3.84 ^{c)}	m		
10	24.9 d	1.8	AN MARKEN		C - 9
11a	26.4.4	1.88	m		C - 9,C - 10
11b	30.4 t	1.62	m		C - 9,C - 10,C - 12,C - 13
12	70.6 d	3.38	br s		C - 10
13	98.9 s	_	_		
14a		2.36	dd	4.8, 12.8	
14b	33.9 t	1.52	m		C - 13,C - 15,C - 16
15	77.6 d	3.78~3.84 ^{c)}	m		
16	32.9 d	2.16	m		C - 14,C - 15
17	71.9 d	3.78~3.84 ^{c)}	m		C - 13
18	36.9 d	1.93	m		C - 17,18 - CH ₃
19	76.4 d	3.93	d	9.6	C - 20,C - 21,18 - CH ₃ , 20 - CH ₃

Table 4. ${}^{13}C$ and ${}^{1}H$ NMR chemical shifts of compound 1 (C₆D₆, 800MHz)

20	35.3 d	1.6	m		C - 19,20 - CH ₃
21a	1C 0 +	2.45	dd	4.8, 12.8	C - 19,C - 20,C - 22,C - 23,
21b	40.8 l	1.8	m		22 - CH ₃
22	136.1 s	-	_		
23	121.6 q	5.31	q	6.4	C - 21,23 - CH ₃
6 - CH ₃	19.8 q	1.15	d	7.2	C - 5,C - 6,C - 7
8 - CH3	9.7 q	0.86	d	7.2	C - 7,C - 8,C - 9
10 - CH ₃	18.1 q	0.74	d	8.0	C - 9,C - 10,C - 11
16 - CH ₃	4.5 q	0.94	d	7.2	C - 15,C - 16,C - 17
18 - CH ₃	7.7 q	0.70	d	8.8	C - 17, C - 19
20 - CH ₃	16.5 q	0.72	d	7.2	C - 19,C - 20,C - 21
22 - CH ₃	16.3 q	1.53	HIN'S		C - 21
23 - CH ₃	13.8 q	1.54	d 1945	6.4	C - 22,C - 23
15 - OCH3	55.4 q	3.17	S		C - 15
7 - OH ^{d)}		5.03	d	5.5	C - 8
12 - OH ^{d)}		4.61	d	5	C - 13
19 - OH ^{d)}		4.42	d	7	C - 20

a) Chemical shifts are shown with reference to C_6D_6 as 128.0ppm.

b) Chemical shifts are shown with reference to C_6D_6 as 7.1ppm.

c) Multiplicity patterns were unclear due to signals overlapping.

d) This data is provided by ${}^{1}H$ NMR measured in DMSO - d₆ at 500MHz for elucidation of hydroxyl group.

4.2 Compound 2의 구조결정

Compound 2의 물리학적 특성은 Table. 5에 나타내었다. 무색의 결정형 으로 분리된 compound 2는 ¹³C NMR과 HREI-MS를 통해서 C₂₆H₃₉NO₆S(IHD:8)의 분자식을 결정하였다. UV spectrum은 211nm와 249nm에서 흡수를 보였다. IR 흡수정보에 의해 hydroxyl기(3476cm⁻¹)와 carbonyl group 중 ester(1738cm⁻¹)와 ketone을 추정하였고, ¹³C NMR 에서 확인되는 172.1ppm, 219.8ppm을 통하여 이를 명확히 하였다.

Table 5. Physico-chemical properties of compound 2

	Compound 2
Appearance	Colorless crystal
Molecular formula	$C_{26}H_{39}NO_6S$
Molecular weight	
EI-MS(m/z)	$493[M]^+$
HREI-MS(m/z)	found 493.2485 calcd. 493.2498
UV λ_{\max} (MeOH) nm (ε)	211(17800), 249(12500)
IR $v_{\max}(\text{KBr}) \text{ cm}^{-1}$	3476, 2974, 2938, 2882, 1738, 1692
$[\alpha]_{D}^{25}$	-47.1(c=1.0, MeOH)
TLC (MeOH:H2O=7:3)	$R_f = 0.26$



Fig 20. ¹³C NMR spectrum of compound 2 (CD₃OD, 100MHz)

¹³C NMR과 ¹H NMR data를 통하여 ester와 ketone carbon을 포함하 는 6개의 quaternary carbon(δ172.1, δ54.6, δ219.8, δ139.7, δ 153.1, δ166.9), 5개의 oxymethine(δ73.0, δ78.0, δ58.8, δ 56.3, δ78.0)과 4개의 methine(δ46.7, δ37.1, δ120.5, δ117.7), 5개의 methylene(δ39.9, δ30.7, δ25.1, δ28.4, δ33.4), 6개의 methyl(δ18.6, δ20.8, δ23.0, δ16.8, δ18.4, δ15.3)이 존재하는 것을 알 수 있었다.(Fig. 20)

¹H-¹H COSY, long-range ¹H-¹³C HMBC correlation spectroscopy를 통하여 compound 2의 부분구조 및 평면구조를 분석하였 다.

H - 6(∂3.25)부터 주변의 proton에 의해 계속적으로 연결되는 ¹H-¹H



Fig 21. 2D-NMR correlations for <u>2</u>. Bold lines show TOCSY correlations and arrows show HMBC correlations.

COSY data를 통해 H - 15(δ 5.37)까지의 첫 번째 부분구조를 알 수 있었 다. ¹H-¹H COSY data를 통하여 H - 2(δ 2.52)와 H - 3(δ 4.14)이 연결 되는 두 번째 부분구조를 알 수 있었고, H - 3의 C - 4(δ 54.6), C - 5(δ 219.8)로의 HMBC correlation, H - 22(δ 1.03)와 H - 23(δ 1.33)의 C - 3(δ 73.0), C - 4, C - 5로의 HMBC correlation, H - 24(δ 1.18)의 C - 5로의 HMBC correlation을 통해 두 부분구조가 이어짐을 알 수 있었 다. H - 6의 chemical shift(δ 3.25)는 ketone carbonyl의 영향으로 down field되어 이를 명확히 해 주었다. 또한 H - 2, H - 15이 ester carbon인 C - 1(δ 172.1)로 HMBC correlation이 있는 것을 확인하여 16-membered macrolide ring을 형성함을 알 수 있었다. H - 2의 down field된 chemical shift(δ 2.52)는 ester carbonyl의 영향을 분명하게 나타낸 것이었다.

이 외에도 HMBC correlation 정보를 통하여 H - 15의 proton이 sp₂

carbon인 C - 16(δ 139.7), C - 17(δ 120.5)로 연결되어 macrolide에서 이어지는 골격을 알 수 있었다. ¹H-¹H COSY, HMBC correlation을 통 하여 확실히 알 수 있는 부분구조는 Fig. 21과 같았다. 이에 해당하는 원소 를 총 molecular formula에서 제외하고 남아있는 C₄H₄NOS와 IHD 4, 남은 sp₂ carbon이 홀수라는 점(δ 153.1, δ 166.9, δ 117.7), H - 19의 δ 7.22의 수치는 aromatic ring의 존재를 암시한다는 점에서 hetero cyclic ring이 존재를 추정케 하였다.

부분구조와 추정되는 증거를 바탕으로 문헌대조를 해 본 결과 1993년 독일 의 GBF에서 *S. cellulosum*으로부터 분리한 Epothilone A임을 확인하였 다. Compound 2와 Epothilone A는 UV와 ¹H NMR에서 동일한 패턴을 보여주었다.(Fig. 22,23)





Fig 22. $^1\mathrm{H}$ NMR(CD_3OD, 400MHz) and UV spectra of compound 2



Fig 23. ¹H NMR(CD₃OD, 400MHz) and UV spectra of Epothilone A^{35}

Pos	$\delta C^{a)}$	$\delta H^{b)}$	Multiplicity	J [Hz]	HMBC
1	172.1 s				
2	39.9 t	2.52	dd	14.6, 10.1	C - 1,C - 3,C - 4
3	73.0 d	4.14	dd	10.1, 3.8	C - 1,C - 2,C - 4,C - 5,C - 22 ,C - 23
4	54.6 s				
5	219.8 s				
6	46.7 d	3.25	dq	8.4, 6.8	C - 5,C - 7,C - 8,C - 24
7	78.0 d	3.65	dd	8.4, 1.8	C - 5,C - 6,C - 8,C - 9,C - 24 ,C - 25
8	37.1 d	1.48	m		C - 10
9	30.7 t	1.28	m		C - 10,C - 25
10a		1.58	m MARI	SIME UMILES	C - 8,C - 25
10b	25.1 t	1.4	m		
11a		1.72	m	1945 A N	C - 8,C - 9
11b	28.4 t	1.4	m		
12	58.8 d	2.92	dt	7.5, 1.9	C - 11,C - 13
13	56.3 d	3.09	dt	7.5, 3.5	C - 12,C - 14,C - 16
14a	22.4.+	2.15	ddd	12.4,3.5, 1.8	C - 12,C - 13,C - 26
14b	33.4 t	1.88	dt	12.4, 9.1	C - 12,C - 13,C - 15,C - 16, C - 26
15	78.0 d	5.37	d	9.1	C - 13,C - 14,C - 16,C - 17, C - 26
16	139.7 s				
17	120.5 d	6.58	s		C - 15,C - 16,C - 19,C - 26
18	153.1 s				

Table 6. ¹³C and ¹H NMR chemical shifts of Compound 2 (CD₃OD, 400MHz)

19	117.7 d	7.22	S		C - 16,C - 17,C - 20
20	166.9 s				
21	18.6 q	2.67	S		C - 18,C - 19,C - 20
22	20.8 q	1.03	S		C - 3,C - 4,C - 5
23	23.0 q	1.33	S		C - 3,C - 4,C - 5
24	16.8 q	1.18	d	6.8	C - 5,C - 6,C - 7
25	18.4 q	1.00	d	6.6	C - 5,C - 6,C - 7
26	15.3 q	2.05	d	0.9	C - 15,C - 16,C - 17,C - 18

a) Chemical shifts are shown with reference to CD₃OD as 49.0ppm.b) Chemical shifts are shown with reference to CD₃OD as 4.78ppm.





Fig 24. The structure of Epothilone A (compound 2)

5. 생물활성

5.1 Compound 1의 세포독성

새로운 화합물로 분리된 compound 1(Spirodienal A)는 spiroketal ring을 중심으로 두개의 side chain이 존재하며 그 중 하나의 chain 말단 에 dienal을 포함하는 구조이다. 문헌조사를 통하여 spiroketal ring을 포 함하는 천연물은 다양한 생물활적 활성이 있음을 확인하였으며 그 중 대표적 인 화합물로 *S. cellulosum*에서 분리된 Spirangien A, B^{9,24,25)}와 해면에 서 분리된 Spongistatin 1^{20,32)}은 매우 강한 세포독성의 물질로 알려져 있 다. 골격의 유사성을 가지므로 Spirodienal A 또한 그 활성에 대한 가능성 이 엿보여 HCT-15 인간결장암세포의 5종의 인간암세포에 대하여 SRB method를 통해 실험 중에 있으며 강한 활성이 예상된다.

5.2 Compound 2의 살조활성

Epothilone은 현재 약 60개국에서 유방암과 난소암의 치료제로 판매되고 있는 taxol과 동일한 원리로 암 억제를 하며, 물에 대한 용해도가 높고 multiple drug resistant(MDR)세포에도 효과적으로 작용하는 장점으로 차세대 항암제로의 전망이 밝은 물질이다. 그 중 Epothilone B는 항암제로 시판되고 있는 실정이다.

이미 Epothilone에 대한 MTT assay와 면역형광염색 등의 생물활성은 많은 연구가 진행되어 그 활성은 크게 각광받고 있다.^{5,12,18,36)} 우리는 그 외 의 활성에 대한 Epothilone의 가능성을 알아보고자 분리한 compound 2 인 Epothilone A의 살조활성(algicidal activity)을 알아보았다. 녹조현상은 산업폐기물이나 가정하수 혹은 축산폐수로 오염된 물에 인, 암 모니아, 질소 등의 증가와 같은 부영양화에 따른 현상으로 녹조가 심한 물을 섭취했을 때 발생되며, 야생동물이나 일반가축에서의 치명적인 간독성이나 뇌독성을 나타내며 폐사하는 일이 발생할 수 있다. 현재, 우리나라 담수에서 는 남조류 Microcystis가 우점종을 이루고 있고, 이들에 의한 녹조현상이 관찰된 바 Microcystis aeruginosa UTEX2388에 대한 살조활성을 알아 보았다. 또한 체질개선 및 성인병예방으로 알려진 Chlorella에 대한 대조활 성을 알아보고자 Chlorella vulgaris에 대해서도 동일한 살조활성을 실시 하였다. Test는 한국화학연구원에서 수행되었다.

	G			
C 1	Conc.	% inhibition of algal growth		
Compound	$(\mu g/m\ell)$	Chlorella vulgaris	Microcystis aeruginosa	
	10	0	2.4 ± 1.5	
	20	0 grun	46.1 ± 4.5	
Compound 2	40	0	$55.5 {\pm} 1.0$	
(Epothilone A)	60	0	$82.8 {\pm} 2.5$	
	80	0	$99.2 {\pm} 0.5$	
	200	0	100 ± 0.0	

Tabel 7. Algicidal activity of compound 2

Compound 2의 농도에 따른 두 종에 대한 활성실험에서 녹조류인 *Chlorella vulgaris*에 대해서는 시험농도에서 방제활성이 나타나지 않았 다. 남조류인 *Microcystis aeruginosa* UTEX2388에 대해서는 80ppm 에서 99.2% 생육억제활성이 있었으며 20ppm에서 46.1%를 억제하여 상 대적으로 미약한 활성을 나타내었다. 본 실험 조건에서는 적어도 1ppm 이하 에서 완전방제 효과가 있어야 활성이 양호한 것으로 간주하는 바 compound 2 의 살조활성은 뛰어나지 않는 것으로 판단된다.(Table. 7)

하지만 유용한 자원으로 이용가능한 *C. vulgaris*에 활성을 보이지 않는 선 택적 활성은 연구대상으로의 충분한 가치가 있다고 사료된다. 또한 *S. cellulosum*의 대사산물에 대한 살조활성의 첫 보고라는 점에서 의의가 있으 며, 약한 활성이 관찰되는 점에서 compound 2외의 *S. cellulosum* 대사산 물에 대한 살조활성의 가능성이 전망되어진다.



IV. 결 론

점액세균은 proteobacteria의 δ -그룹에 속하는 gram 음성균이다. 활주 운동과 기아상태하에서 자실체 형성, 군집생활 등의 특징을 보이며 세포외 효 소를 분비하여 영양분섭취를 용이하게 한다. 이 때 분비되는 효소와 그 외의 이차대사산물에 관한 연구에서 대사산물의 약 95%가 생물학적 활성이 있고, 그 중 46%는 천연물에서 새롭게 분리된 생산물임이 밝혀져 현재는 신 물질 분야의 미개척자원으로서의 가치가 기대되고 있다. 특히 항암제로 주목되고 있는 Epothilone은 그 효과가 입증되어 현재 항암제(lxabepilone)로서 미 국 FDA에 승인되었다. 이로써 그 생산균주인 세루로즈 용해성 점액세균에 대한 관심이 확대되고 있다.

그러나 점액세균은 타 세균이나 미생물을 분리하는 일반적은 방법으로는 자 연계로부터 분리되지 않고, 배양 역시 까다로워 그에 대한 연구가 아직은 미 흡한 실정이다. 본 연구는 이러한 배경을 바탕으로 세루로즈 용해성 점액세균 의 분리 및 배양, 대사산물의 규명에 관한 연구를 수행하였다.

분리 및 배양이 까다로운 세루로즈 용해성 점액세균을 국내토양시료로부터 그 분리법을 확립하여 총 96균주를 분리하였고 실험과정에서 균체의 성장 양상과 배양상태를 관찰해 본 결과, 분류상 1속 1종만이 인정되는 세루로 즈 용해성 점액세균이지만 각기 다른 특성이 있음이 확인되어 분류학적으로 더 많은 연구가 필요로 한 것으로 사료된다.

분리한 96균주 중 49균주에 대한 항균활성실험에서 모두가 한 종 이상에 대한 활성이 나타나 세루로즈 용해성 점액세균의 대사산물 중 약 95%가 생 물학적 활성이 있다는 보고에 확실성을 보여주었다. 항균활성과 TLC 패턴에 대한 screening 결과를 바탕으로 균주 KM 1041을 선정하여 대량배양을 실시하였다.

- 61 -

총 10회(150ℓ)의 대량배양을 통하여 이차대사산물을 획득하였으며, silica gel column chromatography, RP - 18 column chromatography 와 semi - preparative HPLC 등의 화학적 분리법을 이용하여 두 개의 compound를 분리하였다.

Compound 1은 분광학적 방법을 바탕으로 지금까지 알려지지 않은 새로운 물질임을 확인하여 Spirodienal A라 명명하였다. Spirodienal A는 spiroketal ring을 중심에 가지고 두개의 side chain이 연결되어 있으며, 한 쪽 side chain의 말단에 dienal group을 포함하고 있다. 이들의 유도체 가 더 존재하는 것으로 확인되어 또 다른 새로운 화합물의 분리를 위하여 대 량배양 수행 중에 있다.

Compound 2는 분광학적인 방법과 문헌조사를 바탕으로 1996년에 antifungal, cytotoxic compound로 독일의 GBF에서 발표된 Epothilone A 임을 확인하였고, 살조활성 실험 결과 *Microcystis aeruginosa*에 대하여 선택적 활성이 있음을 알 수 있었다. 이는 *S. cellulosum*의 대사산물에 대 한 살조활성의 첫 번째 보고로 의의가 있다.
참고 문헌

- 1. Ahn. J. W., 2002, Cytotoxic Polyene Antibiotics from *Myxococcus stipitatus* JW111, Jounal of the Korean Society of Agriculture Chemistry and Biotechnology, 45, 2:114–118
- 2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9, The fruting, gliding bacteria: the myxobacteria:515-525
- Bollag, D. M., McQueney. P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz. M., Lazarides. E. Woods, 1995. C. M. Cancer Res., 55:2325-2333
- 4. Dawid, L., 2000, FEMS Microbial. Rev., 24:403-427.
- 5. Downing, K. H., 2000, Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. Annu Rev Cell Dev Biol 16:89–111
- 6. Dworkin, M., Kaiser, D., Reichbach, H., 1993, Myxobacteria Ⅱ, ASM Press, Washington, DC:13-63

- ABITIME III

- Dworkin, M., Ward, M. J., Zusman, D. R., Kaiser, D., Shimkets, L. J., White, D. and Schairer, H. U., 2000, Myxobacteria, ASM Press, Washington, DC:219-294
- 8. Dworkin, M., 1996, Recent advances in the social and development biology of the myxobacteria, Microbial, 55:525-549
- Frank, B., Knauber, J., Steinmetz, H., Scharfe, M., Blocker, H., Beyer, S. and muller. R., 2007, Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes. Chemistry&Biology, 14:221-233
- Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. and Trowitzsch, W., 1980, Myxothiazol, An antibiotic from *Myxococcus fulvus*, J. Antibiot. 12:1474-1479

- Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. and Muller, R., 2003, J. Biotechnol., 106:233-253.
- Hamel, E., 1996, Antimitotic natural products and their interactions with tubulin, Med. Res. Rev. 16:207–31
- Hofle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schomburg, D., Gerth, K. and Reichenbach, H., 1996. Epothilone A and B-novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:1567-1569
- 14. Hofle, G. and Reichenbach, H., 1990. GBF Scient. Ann. Report. :95
- Hofle, G. and Reichbach, H., 1995, The Biosynthetic potential of the myxobacteria, Attempo. Verlag. Tubingen:61-78
- Jansen, R., Irschik, H., Reichenbach, H., Wray, V. and Hofle, G., 1994, Disorazoles, Highly cytotoxic metabolites from the sorangicin-producing bacterium *Sornagium cellulosum*, Strain So ce12, Liebigs Ann. Chem.:759-773
- Jansen, R., Wray, V., Irschik, H., Reichenbach, H., Hofle, G., 1985, Isolation and spectroscopic structure elucidation of sorangicin a new type of macrolide-polyether antibiotic from gliding bacteria. Tetrahedron letter. 26. 49:6031-6034
- Kim. J. C., Kim. J. S., Saha, D., Cao, Q., Shyr, Y., Choy, H., 2003, Potential radiation-sensitizing effect of semisynthetic epothilone B in human lung cancer cells Radiotherapy and Oncology 68:305–313
- Kim. J. S., Kim. J. C., Lee. S., Lee. B. H., Cho K. Y., 2006, Biological activity of L-2-azetidinecarboxylic acid, isolated from *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum* against several algae, Aquatic Botany 85:1-6
- 20. Kobayashi, M., Aoki, S., Sakai, K., Kawazoe, K., Kihara, N., Sasaki, T., Kitagawa, I., 1993, For key references on the isolation, structure elucidation and biological activity of the altohyrtins, spongistatins and cinachyrolide A, Tetrahedron Lett., 34:2795-2798

- 21. Kundim, B. A., Itou. Y., Sakagami. Y., Fudou. R., Yamanaka. S., Ojika. M., 2004, Novel antifungal polyene amide from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*: isolation, antifungal activity and absolute structure determination Tetrahedron, 60. 45.:10217-10221
- 22. Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Hofle, G., 1998. Apicularen A and B, new cytostatic macrolides from *Chondromyces* species (Myxobacteria); production, physico-chemical and biological properties. J. Antibiot. 51:1075-1080
- Nicolaou, K. C., Ninkovic, S., Sarabia, F., Vourloumis, D., Vallberg, H., Finlay, M. R. V., Yang, Z., 1997, Total syntheses of epothilones A and B via a macrolactonization-based strategy., J. Am. Chem. Soc., 119:7974–7991.
- 24. Niggemann, J., Bedorf, N., Florke, U., Stenmetz, H., Gerth, K., Reichenbach, H. and Hofle, G., 2005, Spirangien A and B, Highly cytotoxic and antifungal spiroketals from the myxobacterium *Sorangium cellulosm*; isolation, structure elucidation and chemical modifications. Eur, J. Org. Chem.:5013–5018.
- 25. Paterson, I., Findlay, A.D. and Anderson, E.A., 2007, Synthesis of an advanced C10-C32 spiroacetal fragment and assignment of the absolute configuration of Spirangien A. Angew. Chem. 119:6819-6822
- 26. 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
- 27. Reichenbach, H., Dworkin, M., Balowsm, A., Truper, H. G.(ed), 1992, The myxobacteria, The prokaryotes(2nd ed), Spriger verlag, Newyork:3416-3487
- 28. Reichenbach, H. and Hofle, G., 1999, Myxobacteria as producers of Secondary Metabolites, Springer, Berlin:149-179.
- Reichenbach, H., 1999, The ecology of the myxobacteria. Env. Microbiol. 1:15-21

- Reichenbach, H., 2001, Myxobacteria, producer of novel bioactive substances., J. Ind. Microbial, 27:149-156
- 31. Rosenberg, E. 1984, Myxobacteria: development and cell interaction. Springer Verlag, New York.
- 32. Schyschka, L., Rudy, A., Jeremias, I., 2008, spongiastatin 1: a new chemosensitizing marine compound that degrades XIAP, official journal of the Leukemia Society of Ameria, Leukemia Research Fund, U. K. 22, 9:1737-1745
- 33. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Semoff, D., Boyd, M. R., 1998, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 48:4827-4833
- 34. Shimket, L. 1999. Intercellular signaling during fruiting body development of *Myxococcus xanthus*. Annu. Rev. Microbiol. 55: 525-549
- Steinmetz, H., Gerth, K., Sasse, F., Reichenbach, H., Höfle, G., 2001, New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, Strains So ce90/B2 and So ce90/D13. J. Nat. Prod. 64:847-856.
- 36. Walczak, C. E., 2000, Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins, Curr. Opin. Cell Biol. 12:52–6.
- Wenzel, S. C., Muller. R., 2007, Myxobacterial natural product assembly line: fascinating examples of curious biochemistry. Nat. Prod. Rep. 24:1211-1224
- 38. Yamanaka, S., 1989. Chem.& Biol. 27:656
- 39. Zhang, L., Wang, H., 2003, Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strain., J. Microbial. Method. 54:21–27.

- 40. Zusman, D. R. 1984. Cell-cell interactions and development in Myxococcus Xanthus. Quarterly Reviews of Biology 59:119-138
- 41. 안종웅, 정영훈, 정유섭, 지옥표, 2002, The discovery of promising new leads for anticancer drug development from myxobacteria. 21세기 바 이오산업과 천연물과 심포지엄, 서울대학교
- 42. 조경연, 2001. Myxobacteria의 군집생활, 자실체 형성 및 생리활성물질의 생산, 생물산업, 14:11-16



부 록

- 1. ¹³C NMR spectrum of compound 1 (200MHz, C_6D_6)
- 2. gHMQC spectrum of compound 1 (C_6D_6)
- 3. ${}^{1}H {}^{1}H$ COSY spectrum of compound 1 (C₆D₆)
- 4. gHMBC spectrum of compound 1 (C_6D_6)
- 5. 13 C NMR spectrum of compound 1 (125MHz, DMSO d₆)
- 6. ${}^{1}H {}^{1}H COSY$ spectrum of compound 1 (DMSO d₆)
- 7. gHMBC spectrum of compound 1 (DMSO d₆)
- 8. HR EIMS data of compound 1
- 9. IR spectrum of compound 1
- 10. ¹H NMR spectrum of compound 2 (400MHz, CD₃OD)
- 11. ¹³C NMR spectrum of compound 2 (100MHz, CD₃OD)
- 12. gHMBC spectrum of compound 2 (CD₃OD)
- 13. IR spectrum of compound 2



1. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (C₆D₆, 200MHz)



2. gHMQC spectrum of compound 1 (C₆D₆)



3. $^{1}H^{-1}H$ COSY spectrum of compound 1 (C₆D₆)



4. gHMBC spectrum of compound 1 (C_6D_6)



5. ¹³C NMR spectrum of compound 1 (DMSO- d_6 , 125MHz)



6. ¹H⁻¹H COSY spectrum of compound 1 (DMSO-d₆)



7. gHMBC spectrum of compound 1 (DMSO- D_6)



8. HR-ESIMS data of compound 1



9. IR spectrum of compound 1



10. ¹H NMR spectrum of compound 2 (CD₃OD, 400MHz)



11. ¹³C NMR spectrum of compound 2 (CD₃OD, 100MHz)



12. gHMBC spectrum of compound 2 (CD₃OD)



13. IR spectrum of compound 2