



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*이
생산하는 신규 spiroketal 화합물,
Spirodienal D의 구조 및 생물활성

Structure and Biological Activity of Spirodienal D, A New
Spiroketal from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum*.



지도교수 안 종 응

2011년 2월

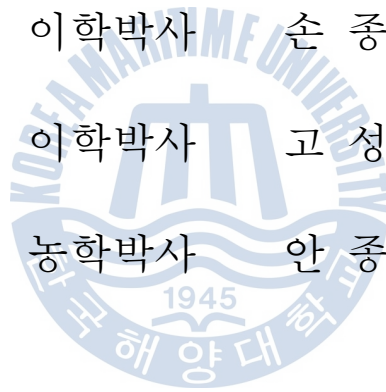
한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

이 화 선

本 論 文 을 이 화 선 의
理 學 碩 士 學 位 論 文 으 로 認 准 함 .

위 원 장	이 학 박사	손 중 찬
위 원	이 학 박사	고 성 철
위 원	농 학 박사	안 중 응



2010년 11월

한국해양대학교 대학원

목 차

List of tables	I
List of figures	II
List of schemes	III
List of abbreviations	IV
List of symbols	V
Abstract	1
I. 서론	3
II. 실험재료 및 방법	9
1. 실험기기 및 시약	9
1.1. 실험기기	9
1.2. 물리화학적 특성 측정	11
1.3. 용매	13
1.4. 시약 및 충전제	14
1.5. TLC(Thin layer chromatography)	16
2. 시험균	18
3. 배지조제	19
3.1. 항균활성 및 먹이균 배양을 위한 배지	19

3.2. <i>Sorangium</i> 균주의 분리 및 동정을 위한 배지	-----	21
3.3. <i>Sorangium</i> 균주의 보관 및 액체배양을 위한 배지	-----	27
4. 떡이균의 배양	-----	29
5. <i>Sorangium</i> 균주의 분리 및 동정	-----	30
5.1. 토양시료의 채집 및 처리	-----	30
5.2. <i>Sorangium</i> 균주의 분리 및 순화	-----	30
5.3. <i>Sorangium</i> 균주의 동정	-----	34
6. <i>Sorangium</i> 균주의 배양	-----	38
6.1. 고체배양	-----	38
6.2. 액체배양	-----	38
7. 대사산물의 추출 및 분획	-----	40
7.1. 대사산물의 추출	-----	40
7.2. 대사산물의 분획	-----	40
8. 균주 KM0141이 생산하는 새로운 대사산물의 분리	-----	42
9. 생물 활성 측정	-----	45
9.1. 항균활성	-----	45
9.2. 세포독성	-----	46
III. 실험결과 및 고찰	-----	48
1. 분리된 <i>Sorangium</i> 균주의 동정 및 특성	-----	48

1.1. <i>Sorangium</i> 균주의 분리 및 특성	-----	48
1.2. 균주 KM0141의 특성 및 동정	-----	53
2. <i>Sorangium</i> 균주들이 생산하는 대사산물의 스크리닝	-----	59
3. KM0141이 생산하는 새로운 대사산물의 구조결정	-----	64
4. 생물활성	-----	75
4.1. 항균활성	-----	75
4.2. 세포독성	-----	76
IV. 결 론	-----	78
참고문헌	-----	81
부 록	-----	86
감사의 글	-----	96



List of tables

Table 1. Test organisms for microbiological assay. -----	18
Table 2. Composition of Nutrient agar.-----	19
Table 3. Composition of YM agar medium.-----	20
Table 4. Composition of Nutrient broth.-----	21
Table 5. Composition of ST21CX agar medium.-----	22
Table 6. Composition of KAN4 agar medium.-----	23
Table 7. Composition of Vy/2 agar medium.-----	24
Table 8. Composition of Nitrate broth.-----	24
Table 9. Composition of Starch agar.-----	25
Table 10. Composition of Christensen urea agar medium.-----	26
Table 11. Composition of CAS liquid medium.-----	27
Table 12. Composition of S.C liquid medium.-----	28
Table 13. Nitrate reduction reagents.-----	36
Table 14. Morphological and physiological characteristics of strain KM0141.-----	57
Table 15. Screening of <i>S. cellulosum</i> for antimicrobial activity.-----	60
Table 16. Physico-chemical properties of Spirodienal D.-----	64
Table 17. ¹³ C and ¹ H NMR chemical shifts of Spirodienal D.(C ₆ D ₆ , 900MHz) -----	73
Table 18. Cytotoxicities of Spirodienals A-D. -----	77

List of figures

Figure 1. Fruiting bodies of myxobacteria. -----	5
Figure 2. Structures of secondary metabolites from <i>S. cellulosum</i> .-----	6
Figure 3. UV spectrum and HPLC profile of Spirodienals. -----	8
Figure 4. Isolation of <i>Sorangium cellulosum</i> from soil. -----	32
Figure 5. Purification of <i>Sorangium cellulosum</i> . -----	33
Figure 6. <i>S. cellulosum</i> on a filter paper on top of a ST21CX agar plate. -----	49
Figure 7. <i>S. cellulosum</i> on a KAN4 agar plate. -----	50
Figure 8. <i>S. cellulosum</i> on Vy/2 agar plate. -----	51
Figure 9. Cultural characteristics of <i>S. cellulosum</i> KM0141. -----	55
Figure 10. Shaker cultures of <i>S. cellulosum</i> KM0141. -----	56
Figure 11. UV spectrum and HPLC profile of spirodienal D. -----	65
Figure 12. DEPT spectrum of Spirodienal D.(C ₆ D ₆ , 200MHz) -----	66
Figure 13. Partial structures of Spirodienal D. -----	68
Figure 14. HMBC correlations for spiroketal core. -----	68
Figure 15. 2D NMR correlations for Spirodienal D. -----	70
Figure 16. Key NOESY correlations for spiroketal moiety. -----	71
Figure 17. The structure of Spirodienal D. -----	72

List of schemes

Scheme 1. Gram stain procedure. -----	34
Scheme 2. Myxobacteria classification by Congo red staining. -----	35
Scheme 3. Work-up procedure of <i>Sorangium cellulosum</i> isolates. -----	41
Scheme 4. Isolation of Spirodienal D. -----	44
Scheme 5. Key to the fruiting body type of myxobacteria. -----	58



List of abbreviations

$[\alpha]_D$: specific optical rotation
^{13}C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
^1H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DMSO	: dimethylsulfoxide
EtOAc	: ethyl acetate
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HPLC	: high performance liquid chromatography
HRESI	: high resolution electrospray ionization
Hz	: hertz
IHD	: index of hydrogen deficiency
IR	: infrared spectroscopy
Kbp	: kilo base pair
MeOH	: methyl alcohol
MS	: mass spectroscopy
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
rpm	: rounds per minute
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet spectroscopy

List of symbols

- J : coupling constant (Hz)
- δ : chemical shift
- ε : the molar extinction coefficient
- λ_{\max} : the wavelength of maximum absorption
- ν_{\max} : maximum frequency in wavenumbers (cm^{-1})
- m/z : mass to charge
- M^+ : molecular ion
- t_R : retention time
- R_f : retention factor for TLC



Structure and Biological Activity of Spirodienal D,
A New Spiroketal from the Myxobacterium
Sorangium cellulosum.

Hwa-Sun Lee

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



Abstract

Myxobacteria are a rich source of natural products with biological activity. In particular, strains belong to the genus *Sorangium* proved to be unusually rich in secondary metabolites. So far, about 100 different core structures and 500 variants have been characterized. The search for novel compounds strongly depends on the availability of novel strains.

During the last 3 years, we have isolated 96 strains of *Sorangium cellulosum* from soil samples collected at different areas in Korea. The strains were all used in our screening for secondary metabolites. We looked for biological effects as well as for new signals in the HPLC-

diode array analysis of the culture extracts.

Previous studies in our lab have demonstrated that a newly isolated strain KM0141 produced three new antibiotics, each containing a spiroketal moiety.

In our search for additional antibiotics from the strain, a co-metabolite named Spirodienal D(1) was observed in very low yield.

Pooled wet cell mass and adsorbent Amberlite XAD-16 from several fermentations (about 350L) of *S. cellulosum* KM0141, were extracted with acetone. Spirodienal D(1) was isolated as colorless oil after extraction, solvent partitioning, and silica gel chromatography. The crude product was further purified by HPLC to give 3.9mg of 1.

The structure of 1 was elucidated by 2D-NMR and mass spectroscopy. The relative stereochemistry of the spiroketal ring was determined on the basis of ^1H - ^1H coupling constants and NOE correlations.

Spirodienals A-D were evaluated for cytotoxic activity against several human cancer lines using doxorubicin as a reference by SRB method. All these compounds demonstrated potent cytotoxicities against human cancer cells, having IC_{50} values ranging from 0.053 μM to 0.878 μM .

Interestingly, the cytotoxic activities of Spirodienals A-D against human colon cancer cells (HCT-15) were 2 to 7 times stronger than that of doxorubicin in terms of IC_{50} .

I. 서 론

생리활성 물질을 발견하기 위한 노력은 현재까지 꾸준히 진행 중이며, 그 중 천연물에서의 생리활성 물질의 탐색은 연구되어오고 있다.² 천연물 기원의 약품들은 주로 천연물에서 분리된 물질이거나, 규명된 물질을 화학적으로 합성하는 것, 그리고 천연물에서 분리된 물질의 화학적 구조를 바탕으로 합성하는 물질 등으로 나누어진다.³ 유기합성을 통해 우수한 의약품들이 개발되고 있으나, 이런 연구에 기본이 되는 선도물질은 천연물에서 유래된 유기화합물들이 주를 이루고 있다.⁴⁻⁵

천연물의 source로써 동·식물 및 미생물 등에서 많이 이용되어 왔으며, 미생물에서는 Actinomycetes에서 가장 많은 생리활성물질을 분리 하였다.³ 그러나 기존 미생물들로부터 신규물질을 찾아내는 빈도는 계속 줄어들고 있어, 특이적인 미생물로부터 신규물질을 탐색하는데 관심을 가지게 되었다. 이런 가운데 생활사가 복잡하고, 분리 및 배양이 까다로운 Myxobacteria가 관심을 받게 되었다.⁶⁻⁷

Myxobacteria는 세균 중에서 세 번째로 가장 많은 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 다른 분리된 미생물들의 수에 비교하면 더 많은 생리활성물질이 발견될 것이라 예상하고 있다.⁸ 뿐만 아니라, 이들이 생산한 이차대사산물에서 기존에는 전혀 없던 새로운 화합물들이 발견되었고, 그 중 일부는 약물후보로 주목 받고 있다.^{5,9}

Myxobacteria는 토양에서 분리된 그람음성 세균으로 간균의 형태를 띠며, 호

기성으로 5과 16속 50여종이 존재하는 것으로 알려져 있다. Proteobacteria δ 그룹에 속해 있으며, 두께는 0.6~1.2 μm 이고, 길이는 약 3~5 μm 이며, 유전체의 크기는 약 9,500~10,000kbp로 세균 중에서 가장 큰 것으로 알려져 있다.^{6,10,11}

주로 토양, 초식동물의 분변, 식물의 고사부위, 껍질 등에서 분리되어 왔고, 최근에는 사막, 고산, 고염지대 및 바다에서도 발견되는 등 다양한 서식범위를 나타낸다.¹²⁻¹⁵

단세포 생물인 Myxobacteria는 다른 세균과는 달리 군집생활을 하며 활주운동(gliding motility)을 하며 먹이를 찾아 이동하며 점액을 분비한다. 또한 영양분이 부족해지면, 자실체(fruiting body)를(Figure 1.) 형성하여 외부환경에 저항성을 가지며, 이를 육안으로 관찰할 수 있을 정도로 분명한 형태를 가진다.¹⁶⁻¹⁸ 이들은 여러 가수분해효소와 이차대사산물들을 분비하여 영양분을 얻는데, 다른 미생물들을 용균시켜 영양분으로 이용하는 Bacteriolytic myxobacteria와 cellulose를 용해하여 영양분으로 이용하는 Cellulolytic myxobacteria로 분류된다.¹⁹

독일의 GBF연구소의 연구에 의하면 이들이 생산하는 이차대사산물에는 항균, 항진균, 항암 등 다양한 범위에서 효능이 있었고, 다른 미생물들에서는 찾기 힘든 독특한 작용기작을 가지는 물질들이 많이 존재하였다. 다른 미생물에서는 발견되지 않은 새로운 기본구조도 50가지 이상 발견되었으며, 생리활성물질의 대부분은 소수성이며 선형 또는 환형의 polyketide 및 peptide이다.⁶⁻⁸ 이 중에서 전자전달계 저해물질인 Myxothiazole²⁰, Stigmatellin²¹, Myxalamid²²와 DNA 중합효소 저해 물질인 Disorazole²³ 혈관 신생 억제물질인 Epothilone A²⁴, 그

리고 actin cytoskeleton을 교란시켜 항암 효과를 보이는 Apiculan A²⁵, Chondramide²⁶ 등이 있다.(Figure 2.)

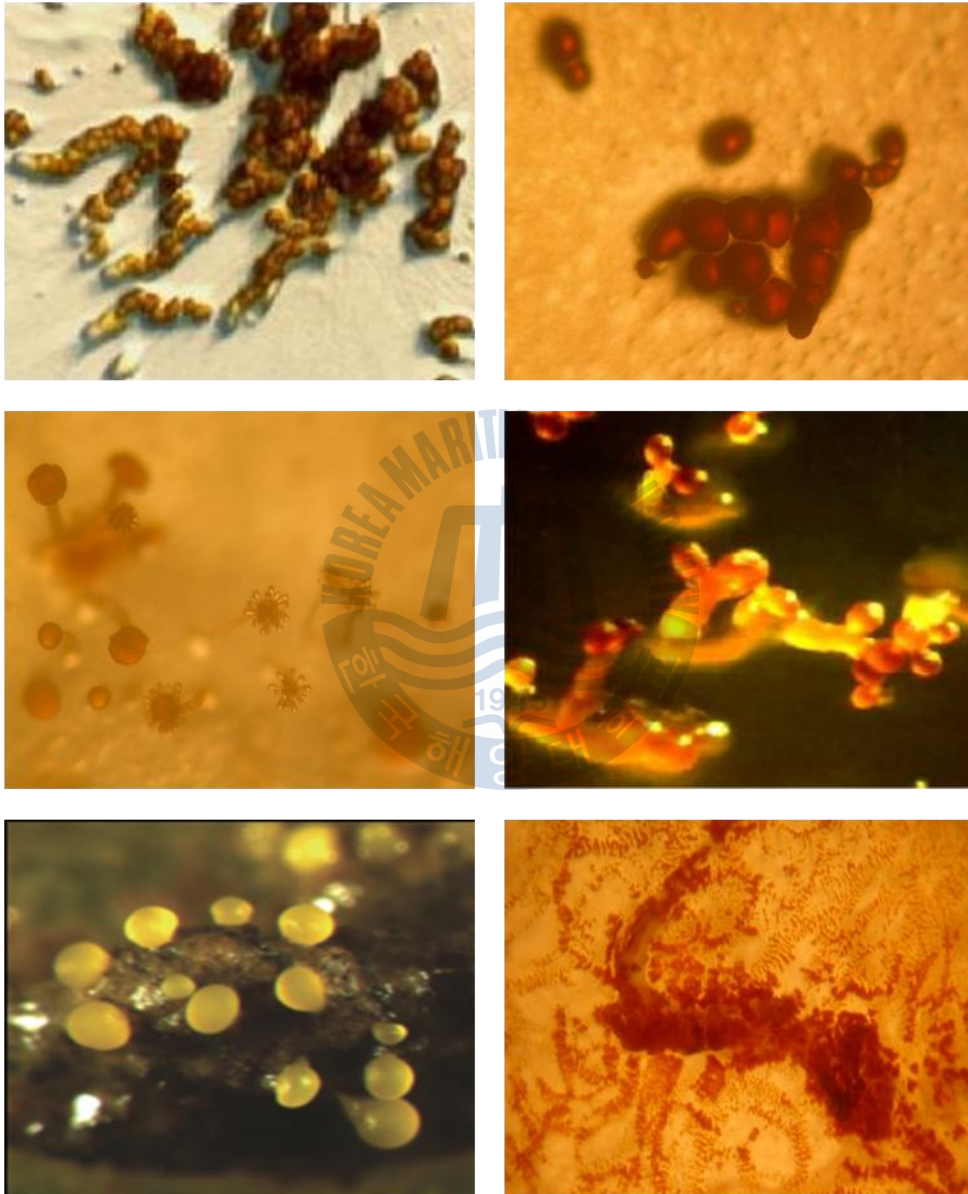


Figure 1. Fruiting bodies of myxobacteria.

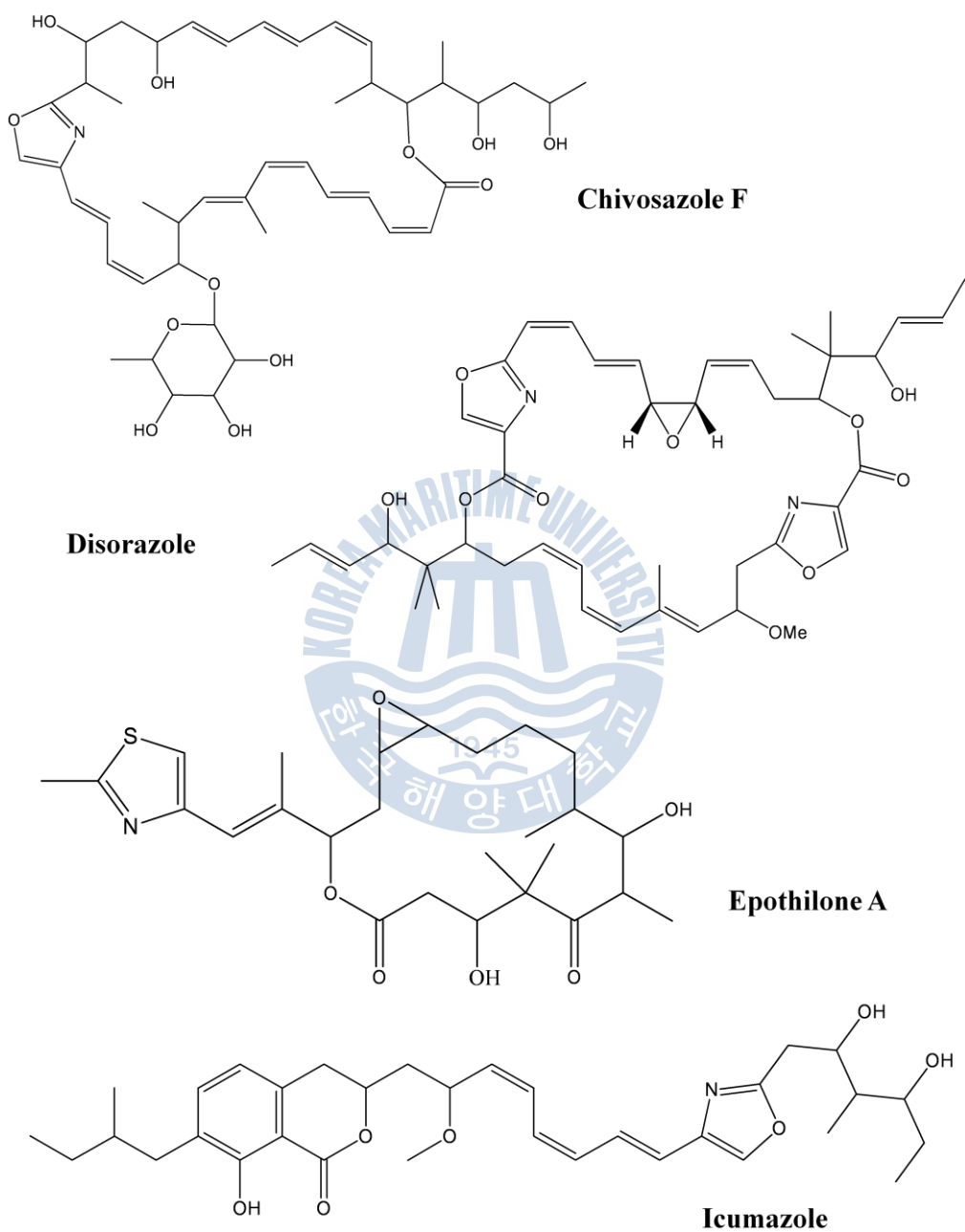


Figure 2. Structures of secondary metabolites from *S. cellulosum*.

최근 Myxobacteria의 염기서열이 완전히 해석되었다. 문헌에서는 Cellulolytic myxobacteria인 *Sorangium cellulosum*에서 독특한 이차대사산물들을 많이 생산하는 것으로 조사되었고, 실제로 Chivosazole, Disorazole, Epothilone, Icumazole, Sorangicin, Soraphen등 많은 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져 있다.^{5,27} 이중에서도 자궁암치료제로 현재 시판중인 Epothilone은 Taxol의 효능을 증가하며, 유용한 선도물질로 주목 받으면서 myxobacteria도 같이 관심 받고 있다.²⁸

선행연구에서 국내 토양에서 Cellulolytic myxobacteria인 *S. cellulosum*을 분리 및 동정하여 스크리닝을 수행하였다. 그 결과로, *Staphylococcus aureus*에서 가장 뛰어난 활성을 보인 균주 KM0141의 이차대사산물을 분리하던 중 활성이 가장 뛰어난 fraction의 HPLC profile에서 유사한 UV 패턴을 보이는 화합물군을 발견하였다. 이 화합물군은 280nm 부근과 320nm 부근에서 UV 최대흡수를 보였으며, 확인 결과 320nm에서 UV 최대흡수를 보이는 화합물들은 독일에서 분리되어 구조 결정된 Spirangien계열의 화합물임을 확인하였고, 본 연구실에서는 280nm에서 UV 최대흡수를 보이는 화합물군을 분리 정제하여 구조결정 한 결과, 기존에는 알려져 있지 않던 새로운 화합물로 밝혀져 Spirodienal A, B, C라고 명명하였다.

본 연구에서는 Spirodienal계열의 화합물과 유사한 UV패턴을 가졌으나 극미량 존재하여 그동안 분리하기 어려웠던 화합물 D를 장기간의 대량배양을 통해 분리 정제에 성공하였고, 분광학적 연구를 바탕으로 화합물의 구조결정과 본 연구실에서 새롭게 분리하여 구조 결정된 Spirodienal A, B, C와 함께 생물학적

활성을 조사하였다.

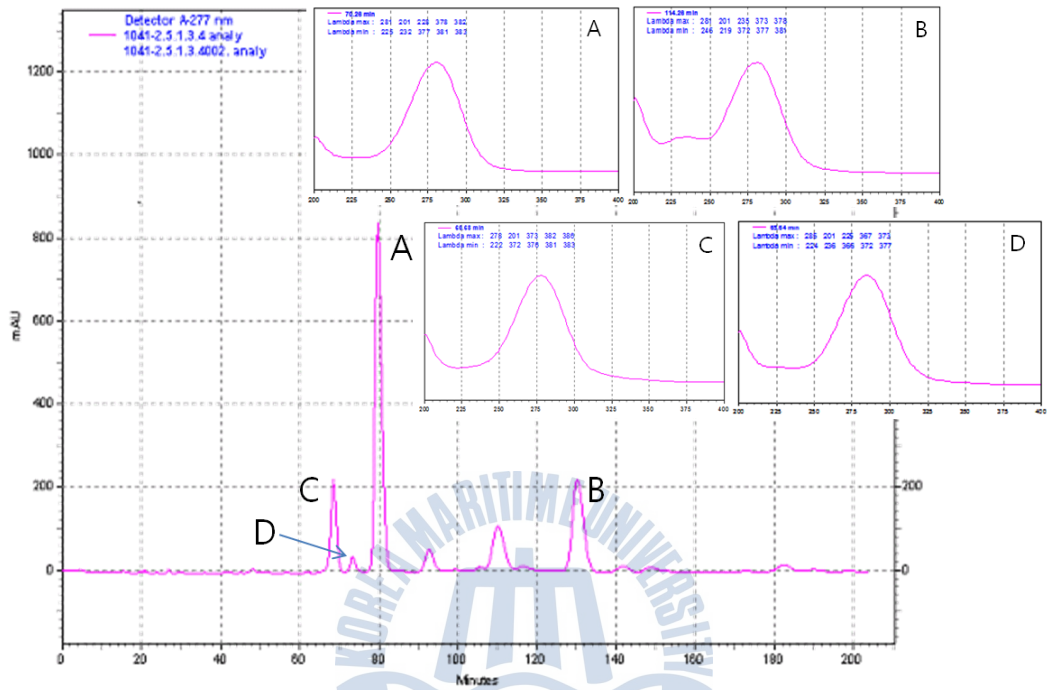


Figure 3. UV spectrum and HPLC profile of Spirodienals.

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 (SUPRA 22K, HANIL)
- Clean bench (SJ-701S2, SEJONG)
- Deep freezer (NF-300SF, NIHON FREEZER)
- Digital polarimeter (341, PERKIN ELMER, U.S.A)
- Drying oven (SSI-601, SHIN SAENG)
- Electronic balance (BL220H, SHIMADZU)
- FT-IR-4100 (JASCO, JAPAN)
- FUME HOOD (有一科學機械製作所)
- HEAT GUN (VT-752C, MASTER APPLIANCE CORP.)
- HEATING MENTLE (MS-DM607, MTOPS)
- High Performance Liquid Chromatography (LC-6AD, SHIMADZU)
Diode array detector (SPD-M10Avp, SHIMADZU)

Degasser (DGV-14A, SHIMADZU)

Program (CLASS-VP ver. 6.14 sp1)

Analytical column

CAPCELL PAK C18 (UG120Å, 5 μ m; 4.6mm, I.D.x250mm, SHISEIDO)

YMC-Pack Silica (5 μ m; 4.6mm, I.D.x250mm)

Preparative column

CAPCELL PAK C18 (UG120Å, 5 μ m; 10mm, I.D.x250mm, SHISEIDO)

YMC-Pack Silica (5 μ m; 10mm, I.D.x250mm)

- High Resolution ESI-MS (Mariner, Applied Biosystems, U.S.A)
- Refrigerator (FR-B522EQ, DAEWOO)
- Micropipette (GILSON, FRANCE)
- Microscope (SZ11, OLUMPUS)
- Microwave (RE-652N, SAMSUNG)
- pH meter (Orion 3 STAR pH Benchtop, Thermo electron coporation)
- Rotary evaporator (R-200, BUCHI)
- Shephadex (Universail system)

Fraction collector (Pharmacia Biotech)

Detector (280nm)

Recorder (Pharmacia Biotech)

- 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 hand lamp (ENF-240C, SPECTROLINE, 254nm, 365nm)
- UV/Vis/NIR spectrophotometer (V-670, JASCO, Japan)
- Vacuum liquid chromatography
(PERISTALTIC PUMP P-1, PHARMACIA FINE CHEMICALS, Sweden)
- Vacuum pump (ULVAC G-50SA)
- Vernier caliper (MITUTOYO COPORATION)
- Vortex mixer (BARNSTEAD/THERMOLYNE)
- 900 MHz NMR Spectroscopy (AVANCE II 900, BRUKER, Germany)
- 증류기 (WATER STILL ELECTRICALLY HEATED, CHANG SHIN)

1.2. 물리화학적 특성 측정

① Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry

화합물의 분석을 위해 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-NMR 실험은 한국기초과학지원연구원 오창센터에 의뢰하여 900MHz NMR Spectroscopy로 측정하였다. NMR 측정에 사용한 용매는 C_6D_6 를 사용하였다.

② Mass Spectrometry

분자식 결정을 위한 Mass 실험은 한국기초과학지원연구원 오창센터에 의뢰하

여 HR-ESI-MS로 측정하였다.

③ Infrared Spectrometry

적외선 분광분석은 FT-IR-4100을 사용하였다. 시료를 CH_2Cl_2 에 녹여, KBr cell을 사용하여 측정하였다.

④ Ultraviolet Spectrometry

자외선 분광분석은 V-670 Spectrophotometer를 사용하여 수행하였다. 시료를 MeOH에 녹여 optical path length가 1cm인 cell을 사용하여 측정하였다.

흡수된 UV의 몰 흡광계수(ϵ)는 다음 식으로 정의된다.

$$\text{UV: } \epsilon = \frac{\text{OD} \times \text{M.W}}{\text{Optical path length (cm)} \times \text{concentration (mg/mL)}}$$

⑤ Optical rotation

Optical rotation은 1cm의 시료 관을 사용하여 Digital polarimeter로 측정하였다.

$[\alpha]_D$ 는 다음 식으로 정의된다.

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times (\text{시료용액의 선광도} - \text{용매의 선광도})}{\text{Optical path length (dm)} \times \text{concentration (g/mL)}}$$

1.3. 용매

추출 및 분획에 사용된 용매는 시약급을 사용하였고, 용매 중에서 ethyl acetate, *n*-hexane, methyl alcohol, methylene chloride는 재증류하여 TLC 및 chromatography column용으로 사용하였다.

- Acetone, Extra pure (DUKSAN)
- Acetonitrile, HPLC grade (DUKSAN)
- Butyl Alcohol, Extra pure (DUKSAN)
- Ethyl Acetate, Extra Pure (DUKSAN)
- Ethyl Alcohol, Extra pure (DUKSAN)
- *n*-Heptane, Extra pure (DUKSAN)
- *n*-Hexane, Extra pure (DUKSAN)
- Methyl Alcohol, Extra pure (DUKSAN)
- Methylene Chloride, Extra pure (DUKSAN)
- Sulfuric Acid, Extra pure (DUKSAN)
- Tetrahydrofuran, Extra pure (DUKSAN)
- Benzene-d₆ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)
- Water, HPLC Grade (DUKSAN)

1.4. 시약 및 충전제

실험에 사용된 시약 및 충전제는 다음과 같다.

- Agar, Extra pure (JUNSEI)
- Amberlite XAD-16 (SIGMA)
- Antifoam B (SIGMA)
- Baker's Yeast, CP (BRUGGEMAN)
- Beef Extract, Extra pure (DIFCO)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Guaranteed reagent (JUNSEI)
- Casitone, Extra pure (DIFCO)
- Ciprofloxacin (한국화학연구원으로부터 분양)
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Guaranteed reagent (SHINYO)
- Congo-red, Extra pure (SIGMA)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Extra pure (YAKUI)
- Cyanocobalamin, Extra pure (SIGMA)
- Cycloheximide, Extra pure (ACROS)
- Dimethyl sulfoxide, Guaranteed reagent (JUNSEI)
- EDTA Na- Fe^{3+} Salt, Guaranteed reagent (JUNSEI)
- Glucose, Guaranteed reagent (JUNSEI)
- Gram reagent (MERCK)

Crystal violet solution

Lugol's solution stabilized

Safranin solution

- H_3BO_3 , Extra pure (YAKURI)
- HEPES, Extra pure (J.T.BAKER)
- KBr, Extra pure (YAKURI)
- KI, Extra pure (JUNSEI)
- LiCl, Extra pure (YAKURI)
- LiChroprep RP-18(40-63 μm) (MERCK)
- Malt Extract, Extra pure (DIFCO)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Guaranteed reagent (JUNSEI)
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Guaranteed reagent (SHINYO)
- NaCl, Extra pure (JUNSEI)
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Extra pure (YAKURI)
- NaOH, Extra pure (ORIENTAL)
- Peptone, Extra pure (MERCK)
- Sephadex[®] LH-20(25-100 μm) (FLUKA)
- Silica gel 60(40-63 μm) (MERCK)
- $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Extra pure (YAKURI)
- Sodium sulfate anhydrous, granular, Extra pure (JUNSEI)
- Soluble starch, Extra pure (DIFCO)
- Soybean flour, Type I (SIGMA)
- Tryptone, Extra pure (DIFCO)

- Vanillin, Guaranteed reagent (JUNSEI)
- Yeast Extract, Extra pure (DIFCO)
- $ZnCl_2$, Extra pure (YAKURI)
- TLC Silica gel 60 F₂₅₄, 20×20cm, 0.25mm (MERCK)
- TLC Silica gel 60 RP-18 F_{254s}, 20×20cm, 0.25mm (MERCK)

1.5. TLC (Thin layer chromatography)

TLC는 Silica gel plate와 RP-18 plate를 사용하였고, 유리 칼을 사용하여 높이를 8cm 기준으로 절단하여 사용하였다. 전개용매로는 acetone, CH_2Cl_2 , MeOH, EtOAc, *n*-hexane, H_2O 등을 사용하였다. 전개된 TLC plate는 완전히 건조시킨 후, UV hand lamp로 254nm 와 365nm에서 흡수여부를 관찰하였다. 그 다음 발색시약을 분무하고 heat gun으로 가열하여 나타내는 색들을 관찰하였다. 발색시약으로는 Vanillin-sulfuric acid reagent를 주로 사용하였고, Dragendorff reagent, Ninhydrin reagent, Iron(III) chloride reagent, Anisaldehyde-sulphuric acid reagent도 함께 사용하였다.

① Vanillin-sulfuric acid reagent

EtOH 300mL에 황산 3mL, vanillin 9g을 넣어 시약을 제조하였다. 전개시킨 TLC plate에 분무한 후에 120°C로 가열하였다.

② Dragendorff reagent

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.

③ Ninhydrin reagent

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

④ Iron(III) chloride reagent

증류수 100mL에 FeCl₃을 10g 첨가하여 제조한 10% aq. Solution을 분무하여 사용하였다.

⑤ Anisaldehyde-sulphuric acid reagent

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

2. 시험균

항균활성 측정 및 먹이균으로 사용된 bacteria와 fungi는 아래에 나타내었고, 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받아 사용하였다.(Table 1.)

Table 1. Test organisms for microbiological assay.

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 분말 상태의 ample에 담겨진 상태로 분양된 각 균주를 활성화시키기 위해 줄칼을 이용하여 ample의 중간부분에 금을 긋고 70% EtOH을 적신 거즈로 잘 닦은 뒤, 가볍게 화염 멸균하였다. 이를 clean bench안에서 절단하고 멸균 증류수를 첨가한 후, 그 현탁액을 평판배지 위에 소량 옮겨 도말한 후 30°C B.O.D incubator에서 배양하였다. 순수한 colony를 떼어 사면배양 후 냉장 보관하였다. 실험 시, 사면배지에서 일부 colony를 떼어 평판배지에 streak culture 하여 활성화된 균주를 본 실험에 사용하였다.

3. 배지조제

3.1. 항균활성 및 먹이균 배양을 위한 배지

① Nutrient agar 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 다음(Table 2.) 조성의 시약을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, NaOH수용액으로 pH 7.2로 맞추었다. 그 다음 agar를 미리 넣어둔 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후에 다시 stirrer를 사용하여 약 60°C 정도까지 식힌 후, clean bench에서 petri-dish의 1/2~2/3 정도 분주 한 다음 건조시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 2. Composition of Nutrient agar.

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

② YM agar 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 다음(Table 3.) 조성의 시약을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, agar를 미리 넣어둔 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후에 다시 stirrer를 사용하여 약 60°C정도로 식힌 후, clean bench에서 petri-dish의 1/2~2/3 정도 분주한 다음 건조시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 3. Composition of YM agar medium.

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

③ Nutrient broth 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 다음(Table 4.) 조성의 시약을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, NaOH수용액으로 pH 7.2로 맞추었다. 그 다음 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서

121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 충분히 식힌 후 사용하였다.

Table 4. Composition of Nutrient broth.

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

3.2. *Sorangium* 균주의 분리 및 동정을 위한 배지

① ST21CX agar 배지

Magnetic bar를 넣은 각각의 plastic beaker에 증류수 700mL와 Solution A, 증류수 300mL와 Solution B를 각각 Table 5.와 같은 조성으로 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, agar가 들어있는 2L 삼각플라스크와 500mL 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다.

멸균 후에 stirrer를 이용하여 식힌 뒤 clean bench안에서 Solution A와 Solution B를 섞고, Cycloheximide 10mL/L, TES 1mL/L를 syringe filter하여 혼합하였다. 혼합한 배지를 petri-dish의 1/2정도로 분주 한 다음 건조시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 5. Composition of ST21CX agar medium.

Solution A : K_2HPO_4 1%
Yeast 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) : $MnCl \cdot 4H_2O$ 0.01%, $CoCl \cdot 6H_2O$ 0.002%, $CuSO_4$ 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%, $EDTA \cdot Na-Fe^{3+}$ salt 0.16%

② KAN4 agar 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 다음(Table 6.) 조성의 시약을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, NaOH수용액으로 pH 7.2로 맞추었다. 그 다음 agar를 미리 넣어둔 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후에 다시 stirrer를 사용하여 약 60°C까지 식힌 후, clean bench에서 Cycloheximide 50mg/10mL와 Kanamycin 250mg/10mL를 각각 syringe filter하여 혼합하고 petri-dish의 1/2

~2/3 정도로 분주 한 다음 건조시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 6. Composition of KAN4 agar medium.

-
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1%
 - Cycloheximide 50mg/L
 - Kanamycin 250mg/L
 - Agar 1.5%
-

③ VY/2 agar 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, NaOH수용액으로 pH 7.2로 맞추었다. 그 다음 용액 300mL에 Baker's yeast를 넣어 가열하여 녹였다. 나머지 700mL용액도 가열하여 agar를 미리 넣어둔 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 stirrer를 사용하여 균일하게 혼합하였다. 그리고 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후에 다시 stirrer를 사용하여 약 60°C 정도가 될 때까지 식힌 후, clean bench에서 cyanocobalamin 500 μL 를 syringe filter하여 혼합해서 petri-dish의 1/2~2/3 정도로 분주 한 다음 건조시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 7. Composition of Vy/2 agar medium.

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

④ Nitrate broth 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 다음 Table 8.과 같은 조성의 시약을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, NaOH 수용액으로 pH 7.2로 맞추었다. 그 다음 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후에 충분히 식힌 후 사용하였다.

Table 8. Composition of Nitrate broth.

-
- Peptone 1%
 - Sodium nitrate 0.1%
-

⑤ Starch agar 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 다음(Table 9.) 조성의 시약을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, agar를 미리 넣어둔 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후에 다시 stirrer를 사용하여 약 60°C까지 식힌 후, clean bench에서 petri-dish의 1/2~2/3 정도 분주 한 다음 건조시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 9. Composition of Starch agar.

-
- Peptone 1%
 - Sodium nitrate 0.1%
 - Soluble starch 0.2%
 - Agar 1.5%
-

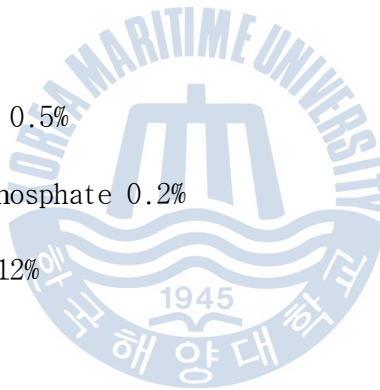
⑥ Christensen urea agar 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수 1L와 Table 10.에서 agar와 urea를 제외한 성분을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, NaOH 수용액으로 pH 6.8로 맞추었다. Agar를 미리 넣어둔 2L 삼각플라스크에 옮겨 담은 뒤에 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균 후에 다시

stirrer를 사용하여 약 60°C 정도가 될 때까지 식힌 후, clean bench에서 urea를 syringe filter하여 혼합해서 petri-dish의 1/2~2/3 정도로 분주 한 다음 건조시켰다. 건조시킨 배지는 날짜와 이름을 적어 건조하고 서늘한 곳에 보관하였다가 사용하였다.

Table 10. 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%
-



3.3. *Sorangium* 균주의 보관 및 액체배양을 위한 배지

① CAS liquid 배지

Magnetic bar를 넣은 beaker에 증류수 100mL와 다음(Table 11.)과 같은 조성의 시약을 순서대로 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시켰다. 그 다음에 nunc tube에 1mL씩 넣어 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균한 후에 식힌 다음 사용하였다.

Table 11. Composition of CAS liquid medium.

-
- Casitone 1%
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%
 - DMSO 5mL
-



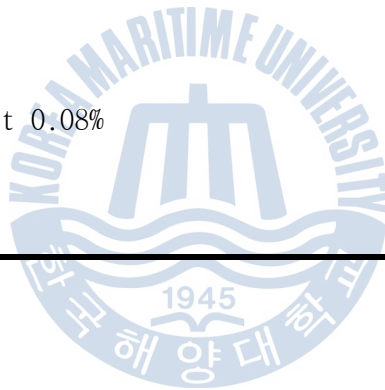
② S.C liquid 배지

Magnetic bar를 넣은 plastic beaker에 증류수에 HEPES를 넣고 stirrer에서 교반하여 용해시킨 후, NaOH수용액으로 pH 7.4로 맞추었다. HEPES가 첨가된 용액에 potato starch와 antifoam B를 첨가한 soymeal을 삼각플라스크에 넣어 autoclave에서 121°C, 5분간 고온 멸균하였다. 멸균된 배지에 yeast extract, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, EDTA Na- Fe^{3+} salt를 첨가하여 autoclave에서 121°C, 15분간 고온 멸균하였다. 멸균한 배지가 식으면 clean bench에서 따로 멸균한

glucose를 첨가하여 사용하였다.

Table 12. Composition of S.C liquid medium.

-
- HEPES 5mM
 - Potato starch 0.08%
 - Soymeal 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%
 - Glucose 0.2%
-



4. 떡이균의 배양

떡이균으로는 *Escherichia coli*를 액체배양하여 사용하였다. 냉장보관 되어 있던 *E. coli*를 nutrient agar배지에 streak culture 한 후, 30°C B.O.D incubator에서 24시간 동안 활성화시켰다. nutrient broth배지 1L를 121°C에서 15분간 고온 멸균한 뒤 충분히 식힌 다음, 앞서 활성화 시킨 *E. coli* 한 백금이 접종하고, shaking incubator에서 30°C, 160rpm, 36시간 동안 배양 후 수확하였다. 수확한 배양액을 각각 양팔저울을 이용하여 동일한 무게로 tube에 각각 나눠 담은 후에 centrifuge를 사용하여, 4°C, 10,000 g , 20분 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고 멸균증류수를 이용하여 균체를 하나의 tube에 모은 다음 원심분리 하였다. 그 다음 멸균증류수로 두 번 더 세척하여 원심분리 한 뒤, 상층액을 버리고 물기를 제거하여 균체의 무게를 측정하고, 냉장보관 하였다.

5. *Sorangium* 균주의 분리 및 동정

5.1. 토양시료의 채집 및 처리

토양 시료는 경기도 안산, 용인, 충청남도 부여, 대전, 경상북도 김천, 제주도 서귀포시에 위치한 밭 및 과수원 토양의 흙을 채집하였다. 시료 채집 시, 지표면의 흙을 걷어낸 다음 일정한 간격으로 이동하면서 채집하였다. 채집한 토양시료는 곰팡이의 증식을 억제하기 위하여 서늘한 곳에서 일주일 간 충분히 건조시킨 뒤 실험에 사용하였다.

5.2. *Sorangium* 균주의 분리 및 순화

Clean bench에서 멸균한 여과지를 화염 멸균한 핀셋으로 ST21CX agar배지 위에 올려놓았다. 토양시료에 멸균증류수를 1~2방울 떨어뜨려 시료가 분산되지 않도록 하였다. 시약 스포를 이용하여 시료를 직경 0.3cm~0.5cm 정도로 만들어 여과지 중앙에 한 점씩 올린 후, 30°C B.O.D incubator에서 배양하였다.(Figure 4.)

처음 loading 후 일주일에서 2달 동안 쌍안 실체 현미경으로 여과지의 용해 여부 및 자실체 형성여부를 확인하였다. 자실체가 형성되면 일부분을 떼어 새로운 여과지를 올린 ST21CX agar배지로 옮겨 다시 B.O.D incubator에서 배양하였다.

Sorangium 균주가 다른 오염원 없이 ST21CX agar배지에서 성장하면, 다시 KAN4 agar배지로 옮겨 순화하였다.

미리 배양하였던 *E. coli*는 증류수에 5배 희석하여 autoclave에서 121°C, 15분 간 고온 멸균하였다. Clean bench에서 KAN4 agar배지 위에 200µL-micropipette를 사용하여 멸균한 *E. coli*희석액을 100µL씩 loading하여 circular patch를 만든 다음, 완전히 건조시켰다. 건조된 circular patch의 가장자리 부분에 앞서 분리한 *Sorangium* 균주를 옮겨 B.O.D incubator에서 배양하였다. Swarm과 자실체의 형성여부 및 오염여부를 쌍안 실체 현미경으로 관찰하여, 더 이상 다른 오염이 관찰되지 않았을 때, clean bench에서 swarm이나 자실체 일부를 떼어 Vy/2 agar배지에 옮겨 B.O.D incubator에서 배양하였다.(Figure 5.)

Vy/2 agar배지에서 성장속도가 우수하고, 자실체의 형태가 뚜렷한 균체를 백금이를 사용하여 CAS liquid 배지를 넣은 nunc tube에 옮겨 액체질소 탱크 또는 -80°C deep freezer에 보관하였다.

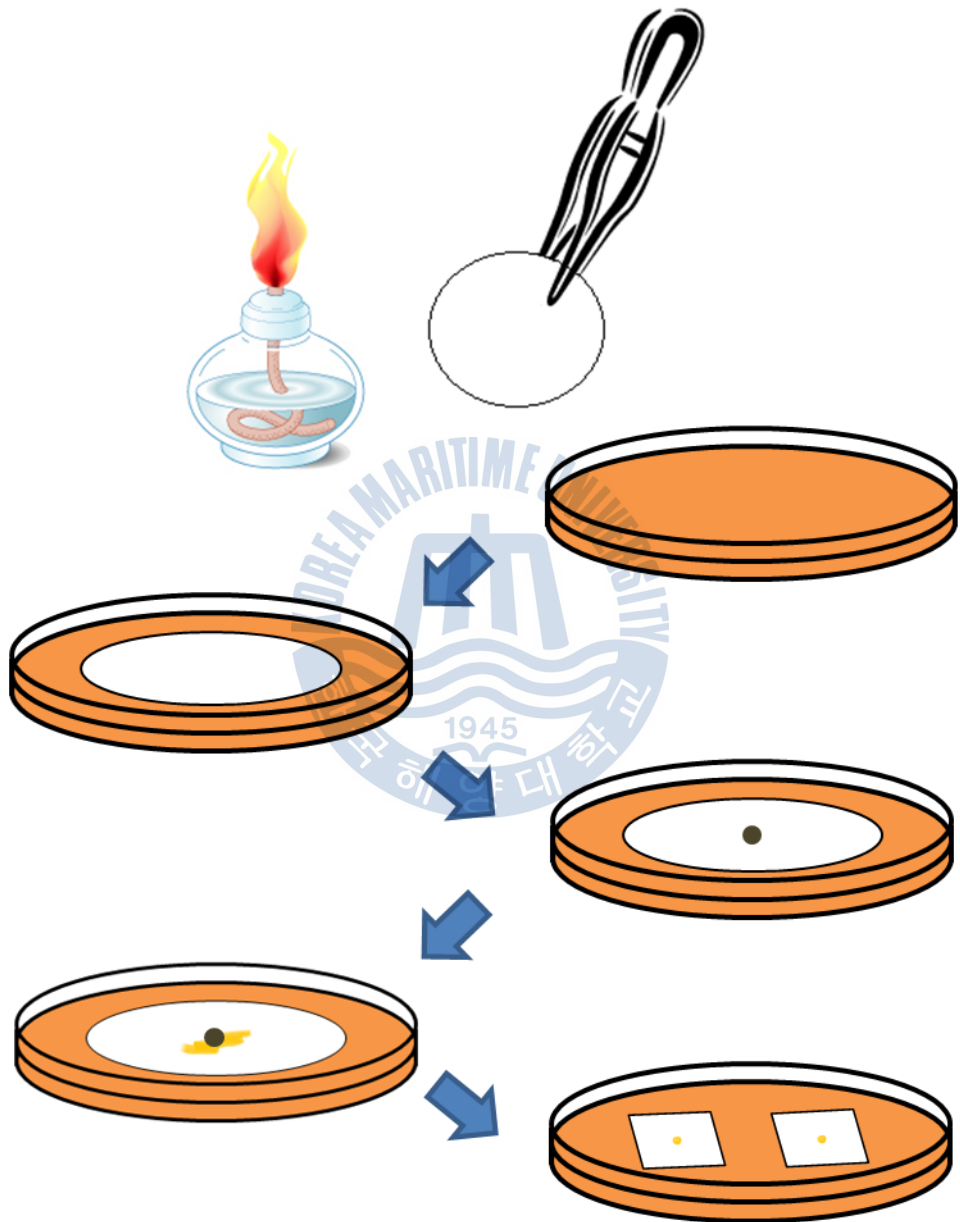


Figure 4. Isolation of *Sorangium cellulosum* from soil.

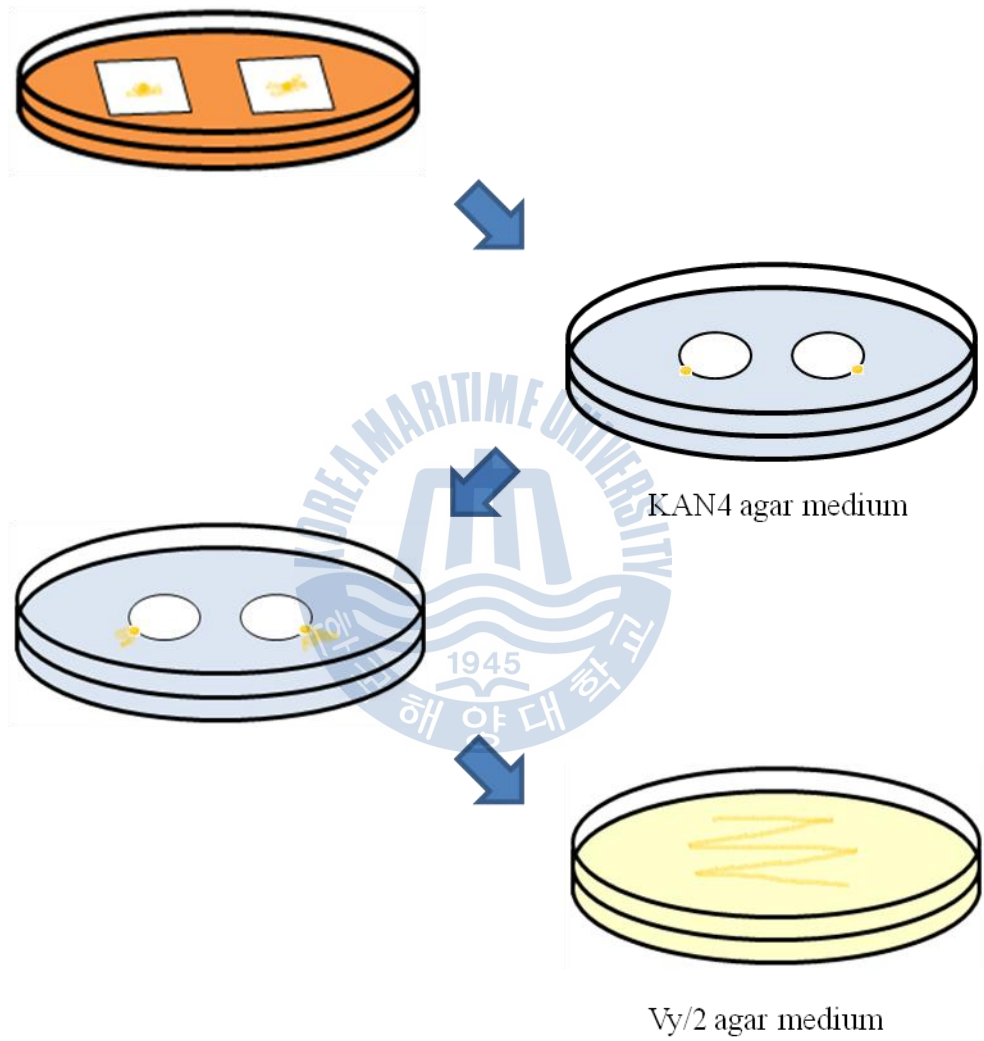


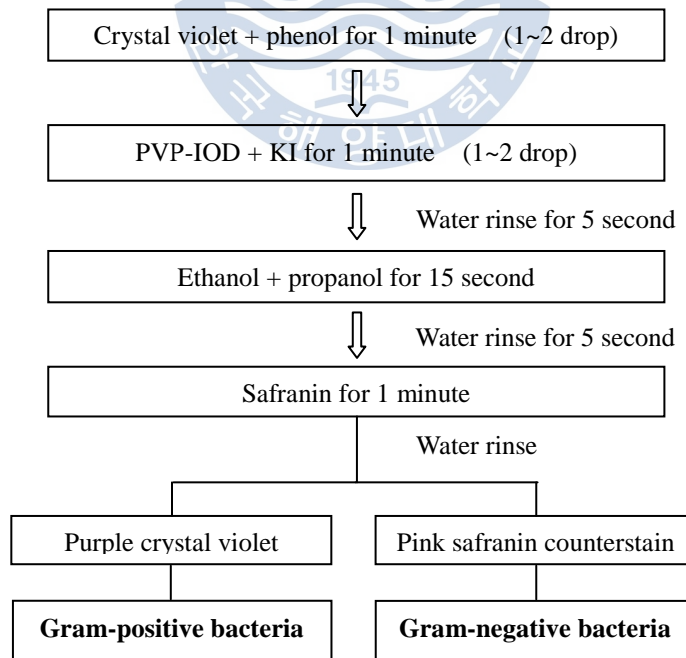
Figure 5. Purification of *Sorangium cellulosum*.

5.3. *Sorangium* 균주의 동정

① Gram 염색

순화를 마친 균주를 증류수에 희석하여 슬라이드 글라스에 화염고정 하였다. 화염 고정된 균체 위에 crystal violet과 phenol이 함유된 염색제 용매를 1~2방울 떨어뜨려 1분간 염색하였다. 여기에 PVP-IOD+KI 매염제 용액을 1~2방울 떨어뜨려 1분간 반응시킨 후, 증류수로 5초간 간접세척 하였다. 세척한 슬라이드 글라스는 ethanol+propanol용액으로 15초간 탈색시킨 후, 다시 증류수로 5초간 간접세척 하였다. 그 다음 대조염색제인 safranin 용액을 1~2방울 떨어뜨려 1분간 염색한 후, 다시 증류수로 5초간 간접세척하고 물기를 제거한 다음, 현미경으로 세포의 형태와 염색 상태를 관찰하였다.

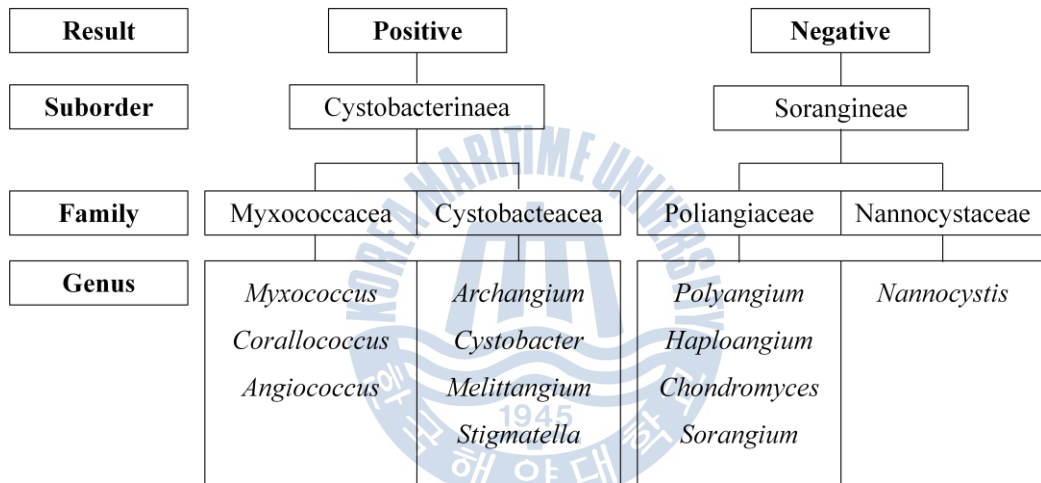
염색된 세포가 푸른색이면 양성, 붉은색이면 음성으로 판정하였다.(Scheme 1.)



Scheme 1. Gram stain procedure.

② Congo red 염색

Congo red 시약을 증류수에 녹여 0.01% solution을 만들어 사용하였다. Swarm이 뿔어있는 agar plate배지에 미리 만들어 둔 congo red 용액을 swarm이 잠길 때까지 부은 다음, 10분 경과 후, 용액을 제거하였을 때, swarm의 염색여부를 관찰하였다. Swarm의 색이 붉은색으로 나타나면 양성으로, 색의 변화가 없을 때에는 음성으로 판정하였다.(Scheme 2.)



Scheme 2. Myxobacteria classification by Congo red staining. ¹

③ Oxidase test

90% ethanol로 제조한 1% α -naphthol용액과 1% dimethyl-p-phenyl enedi-amine oxalate solution을 1:1로 혼합한 용액을 몇 방울 떨어뜨린 후 10~30초 이내에 균체의 색의 변화를 관찰하였다. 이때, 혼합액에 의해 균체의 색이 짙은 청색으로 나타나면 양성, 색의 변화가 없으면 음성으로 판정하였다.

④ Urease test

Christensen urea agar배지(Table 10.)에 균을 접종한 후, 37°C B.O.D incubator에서 3~12시간 배양 후 배지의 색을 관찰하였다. 본래 노란색인 배지의 색이 분홍색으로 변하면 암모니아가 생성된 것으로 간주하여 양성으로, 배지의 색에 변화가 없으면 음성으로 판정하였다.

⑤ Nitrate reduction test

Nitrate broth배지(Table 8.)에 균주를 접종하여 1~2일 동안 배양하여 detection solution(Table 13.)을 넣어 색의 변화를 관찰하였다. 배양액의 색이 붉은색으로 변하면 양성으로, 색의 변화가 없으면 음성으로 판정하였다.

Table 13. Nitrate reduction reagents.

Solution A	Sulfanilic acid 0.8%
	5N acetic acid 300mL
	Total 1L
Solution B	Dimethyl-naphtylamine 0.5%
	5N acetic acid 300mL
	Total 1L

⑥ Starch hydrolysis test

Starch agar배지(Table 9.)에 접종하여 48시간 동안 배양 후, 그람 염색에 사용되는 Lugol's solution을 소량 떨어뜨려 투명환의 형성유무를 관찰하였다.

투명환이 관찰되면 양성으로, 관찰되지 않으면 음성으로 판정하였다.



6. *Sorangium* 균주의 배양

6.1. 고체배양

순화가 끝난 균주는 clean bench에서 Vy/2 agar 배지에 선 도말하여 30℃ B.O.D incubator에서 배양하여 증식시켰다.

6.2. 액체배양

고체배양에서 다른 오염이 없고, 성장속도가 우수하며 자실체의 형태가 균일한 균주를 선발하여 액체배양을 하였다. 액체배양은 seed culture와 production culture 두 단계로 나누어 배양하였으며, 두 배양에 사용된 액체배지의 성분은 동일하였다.

1차 seed culture는 S.C liquid 배지(Table 12.) 50mL가 담긴 300mL 삼각 플라스크에 고체배지에서 배양한 균체를 접종하여 30℃, 160rpm인 shaking incubator에서 5일간 배양하였다.

2차 seed culture는 1차 seed culture와 동일한 S.C liquid 배지 50mL가 포함된 300mL 삼각플라스크에 10mL-micropipette를 사용하여 1차로 배양된 균체를 위주로 5mL씩 접종하여 30℃, 160rpm인 shaking incubator에서 5일간 배양하였다.

마지막으로 대사산물을 얻기 위한 production culture 배양에서는 S.C liquid 배지 400mL가 포함된 2L 삼각플라스크에 흡착제 XAD-16을 1.5%(w/v)

첨가하였다. Production 배지에 10mL-micropipette를 사용하여 2차로 배양된 균체 위주로 8mL씩 접종하여 30℃, 160rpm shaking incubator에서 10일간 배양하였다.

본 실험에 사용된 균주 KM0141은 15개월 동안 16L씩 총 20회의 대량배양을 통하여 배양액 320L를 얻었다.



7. 대사산물의 추출 및 분획

7.1. 대사산물의 추출

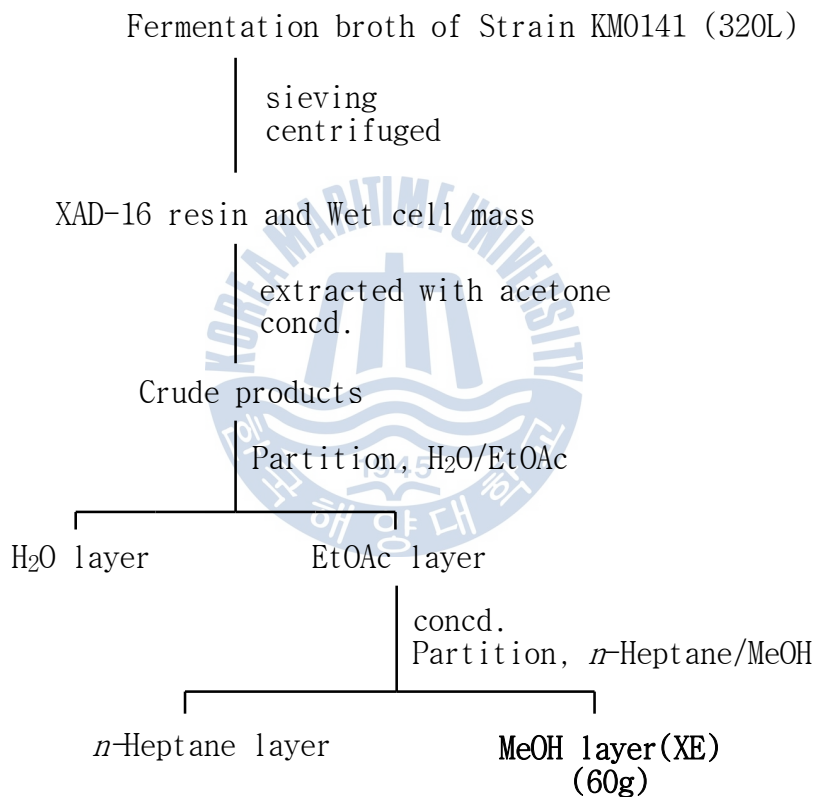
총 20일 동안 배양된 배양액의 pH를 측정하고, 100mesh 채에 걸러 균체와 XAD-16 수지를 배양액과 분리하였다. 채에 거른 균체와 XAD-16 수지를 증류수로 세척한 뒤 물기를 제거하여 수확하였고, 나머지 배양액은 centrifuge를 사용하여 4°C, 10,000 g , 20분 동안 원심분리하여 상등액은 제거하고, 남아있는 균체를 수확하였다.

수확한 균체와 XAD-16 수지는 MeOH과 acetone을 1:1의 비율로 용매를 첨가하고 magnetic bar를 넣어, stirrer로 실온에서 6시간 동안 추출하였다. 추출액은 거름종이를 이용하여 균체와 XAD-16 수지를 따로 분리하였다. 그 다음부터는 acetone을 사용하여 실온에서 6시간 동안 같은 방법으로 추출하였고, XAD-16 수지에 흡착되어 있던 대사산물들이 완전히 추출될 때까지 여러 차례 반복하여 추출하였다. 추출액은 rotary evaporator와 vacuum pump로 농축하였다.

7.2. 대사산물의 분획

농축한 추출액은 H₂O와 EtOAc로 분획하여, 배지성분을 H₂O층으로 옮겨 제거하고, EtOAc층에 sodium sulfate anhydrous를 첨가하여 overnight하였다. 수분을 제거한 EtOAc층을 농축하여 MeOH과 *n*-heptane으로 재분획하였다.

이로써 무극성의 세포성분들이 *n*-heptane층으로 이동하여 제거되고, MeOH층을 농축하였다. 이렇게 얻은 추출물을 XAD extract, 즉 'XE'라 명명 하고, 이것을 스크리닝과 항균활성실험의 탐색시료로 사용하였다.(scheme 3.)



Scheme 3. Work-up procedure of *Sorangium cellulosum* isolates.

8. 균주 KM0141이 생산하는 새로운 대사산물의 분리

대량배양을 통하여 얻은 균주 KM0141의 XE는 TLC 분석결과를 바탕으로 chemical screening을 하여 normal-phase chromatography를 하였다.

3×30cm 크기의 column을 사용하였고, stationary phase는 silica gel, mobile phase는 CH₂Cl₂, MeOH을 사용하였다. 용매조건은 CH₂Cl₂ 100%(fr. 1), 95:5의 CH₂Cl₂와 MeOH(fr. 2), 90:10의 CH₂Cl₂와 MeOH(fr. 3), MeOH 100%(fr. 4)의 비율을 사용하여 단계적으로 혼합물을 분리하였다. 95:5비율의 CH₂Cl₂와 MeOH로 분리된 fr. 2를 CH₂Cl₂와 acetone으로 CH₂Cl₂ 100%(fr. 2.1), CH₂Cl₂와 acetone 95:5(fr. 2.2), 90:10(fr. 2.3), 80:20(fr. 2.4), 100% acetone(fr. 2.5)의 비율로 silica gel column chromatography하였다. 이렇게 분리한 fr. 2.3을 reversed-phase chromatography 하였다. Stationary phase는 RP-18을 사용하였고, 2×30cm크기의 column을 사용하였다. Mobile phase는 MeOH과 H₂O를 사용하였다. 용매조건은 60:40의 MeOH과 H₂O(fr. 2.3.1), 70:30의 MeOH과 H₂O(fr. 2.3.2), 80:20의 MeOH과 H₂O(fr. 2.3.3), 90:10의 MeOH과 H₂O(fr. 2.3.4), 100% MeOH(fr. 2.3.5)의 비율로 RP-18 column chromatography를 하였다.

그 중, fr. 2.3.3을 normal-phase chromatography하였다. 2×30cm크기의 column을 사용하였고, mobile phase는 *n*-hexane과 EtOAc를 40:60(fr. 2.3.3.1), 30:70(fr. 2.3.3.2), 20:80(fr. 2.3.3.3), 10:90(fr. 2.3.3.4), 100% EtOAc(fr. 2.3.3.5)의 비율로 silica gel column chromatography하였다.

특정 시료의 분석, 화합물의 분리조건 선정 및 순도 평가를 위하여 analytical HPLC를 먼저 수행하였다.

Reversed-phase chromatography는 CAPCELL PAK C18 column을 사용하였고, mobile phase는 MeOH, H₂O, MeCN로 gradient mode와 isocratic mode를 이용하여 분석하였다. Normal-phase chromatography는 YMC-Pack SIL을 사용하였고, mobile phase는 *n*-hexane, CH₂Cl₂, MeOH을 사용하여 gradient mode와 isocratic mode로 분석하였다.

분석으로 정해진 조건으로 순수한 화합물을 얻기 위해, fr. 2.3.3.2를 semi-preparative HPLC를 수행하였다. CAPCELL PAK C18 column을 사용하였고, mobile phase는 63% aq. MeOH, 유속 4mL/min, UV 280nm에서 isocratic mode로 분취하였다. Run time이 160min 일 때, 285nm에서 최대흡수를 보이는 화합물 3.9mg을 분리하였다.(Scheme 4.)

KM0141 XE (60g)

Silica gel c.c
CH₂Cl₂:MeOH

(CH₂Cl₂:MeOH = 95:5)

Silica gel c.c
CH₂Cl₂:Acetone

(CH₂Cl₂:Acetone = 90:10)

RP-18 c.c
MeOH:H₂O

(MeOH:H₂O = 80:20)

Silica gel c.c
n-hexane:EtOAc

(*n*-hexane:EtOAc = 30:70)

RP-18 semi-prep HPLC
(Shiseido, 10mmX250mm,
63% aq. MeOH, 4ml/min)

Spirodienal D 3.9mg
(R_t = 160 min)

Scheme 4. Isolation of Spirodienal D.

9. 생물 활성 측정

9.1. 항균활성

항균활성 실험은 paper disc 확산법을 사용하였으며, 실험에 사용된 균주는 그람양성 세균인 *Staphylococcus aureus*, 그람음성 세균인 *Escherichia coli*, 그리고 효모인 *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* 등을 사용하였다. 배지는 *E. coli*는 Nutrient agar 배지(Table 2.)를, *S. aureus*는 Micrococcus agar 배지를, *C. albicans*와 *R. rubra*는 YM agar 배지(Table 3.)를 각각 사용하였다. 각각의 배지에 맞는 균주를 streak culture하여 30°C B.O.D incubator에서 활성화시켰다. Clean bench에서 활성화 시킨 세균 및 효모의 colony를 멸균 증류수에 각각 희석하여, 그 중 200 μ L씩 각각의 배지에 loading 한 후, 화염 멸균한 도말 봉으로 고르게 도말 하였다. 멸균한 직경 6mm의 항생물질 검정용 paper disc(ADVANTEC, Japan)에 MeOH:CH₂Cl₂=1:1 비율의 용매로 희석한 시료를 20 μ L씩 loading하고, 대조구는 MeOH:CH₂Cl₂=1:1 비율인 용매를 20 μ L씩 loading 하였다. Loading한 paper disc가 완전히 건조시킨 뒤, 약 3cm 정도의 간격이 유지되게끔 올렸고, 시험균주는 2반복으로 수행하였다. 각각의 배지는 30°C B.O.D incubator에서 48시간 동안 배양 후, inhibition zone의 크기를 vernier caliper로 측정하였다.

9.2. 세포독성

본 연구에서 새롭게 분리된 Spirodienal D와 선행연구에서 분리되어 구조결정된 Spirodienal A, B, C에 대한 세포독성 실험은 한국화학연구소에 의뢰하여 수행하였다.

① 암세포의 배양

A-549(Lung carcinoma), SK-OV-3(Ovary carcinoma), SK-MEL-2(Melanoma), HCT-15(Colon carcinoma)에 대한 세포독성을 관찰하였다.

ATCC(American Type Culture Collection)사로부터 실험 세포주를 분양 받아 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), penicillin(100units/mL), streptomycin(100 μ g/mL)을 첨가한 DMEM을 배양액으로 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포밀도가 높아지면 수 분 동안 trypsin처리(0.05% trypsin, 0.02% EDTA in Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium)하여 세포를 떼어내어 사용하였다. 실험 시 세포가 지수기(logarithmic phase)에 있도록 배양하였고, 모든 실험에는 15번 이내의 계대 배양한 세포를 사용하였다.

② 세포독성 측정 (SRB assay)

세포독성은 SRB assay를 통하여 측정하였다. 세포를 trypsin-CDTA용액으로 용기 부착면을 분리시키고, 96 well flat bottom microplate(Falcon)에 분주하였다. 분주된 세포들은 CO₂ incubator 내에서 24시간 동안 배양하여

바닥에 부착시킨 후, aspirator로 배지를 제거하였다. Log dose로 시료를 희석하고 milipore filter로 여과하여 세포가 들어있는 well에 각각 3배수(triplicate)로 넣어주고, 48시간 동안 더 배양하였다. DMSO(Dimethyl sulfoxide)로 희석하였으며, 이때 세포에 가해지는 DMSO의 농도는 0.5%이하가 되도록 하였다. 세포를 시료와 48시간 배양한 후 각 well의 배지를 제거하고 10% trichloro-acetic acid(TCA)를 100 μ L씩 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥 면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 실온에서 남아있는 TCA용액을 완전히 제거하고 건조시켰다. 그 다음 1% 초산용액으로 녹인 0.4% sulforhodamine B 0.25mL를 처리하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% 초산용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과잉의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조시킨 후, well당 100 μ L의 10mM trisma base (unbuffered)용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 염색액을 용출시킨 후, microplate reader를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로는 Doxorubicin을 사용하였다.

Control과의 흡광도 차이로 세포증식 저해율(Inhibition rate, %)을 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = 100 - \frac{(\text{Sample OD} - \text{Blank OD}) \times 100}{\text{Negative Control} - \text{Blank OD}}$$

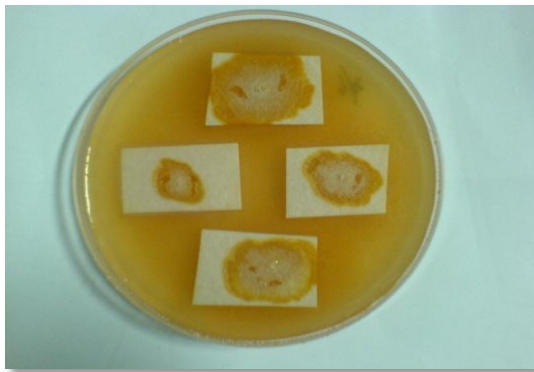
Ⅲ. 실험결과 및 고찰

1. 분리된 *Sorangium* 균주의 동정 및 특성

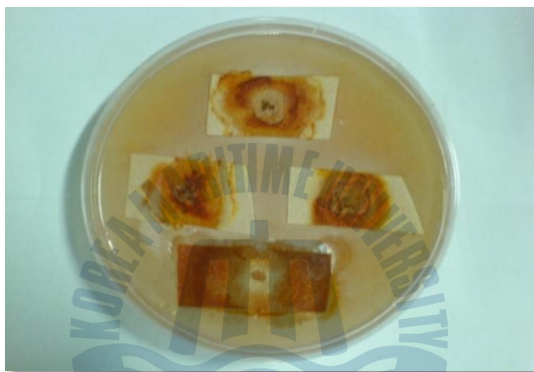
1.1. *Sorangium* 균주의 분리 및 특성

국내 토양으로부터 채집한 샘플을 통해 Cellulolytic myxobacteria 96 균주를 순수하게 분리하였다. 멸균된 여과지를 올린 ST21CX agar배지에 토양시료를 loading하고 약 7~14일 이후부터 여과지가 용해되기 시작하였으며 다른 오염원들과 함께 yellow, orange, black color의 자실체가 관찰되었다. 관찰된 자실체를 새로운 여과지를 올린 ST21CX agar배지에 옮겨 순화과정을 거친 뒤, 자실체를 *E. coli*로 circular patch를 만든 KAN4 agar배지 위에 옮겼다. Swarm이 퍼져나가면 그 일부를 떼어 Vy/2 agar 배지에 옮긴 뒤, 3~7일 경과 후, 배지 표면으로 swarm과 자실체가 형성되었다. 그리고 배지 위에 swarm과 자실체가 모여 둔덕을 형성하거나, swarm과 자실체가 모여 배지 아래로 파고 들었다. 자실체의 색은 yellow type, orange type, black type으로 관찰되었다.

영양세포는 자실체를 형성하지 않는 활주세균의 영양세포와 비슷하여 자실체의 관찰에 의해서만 구별이 가능하였다. 그래서 각각의 배지에서 배양하였을 때, 자실체를 형성하는 능력을 이용하여 균주를 분리할 수 있었다.



Yellow type

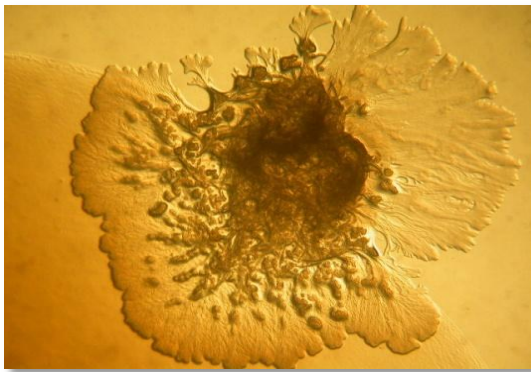


Red type

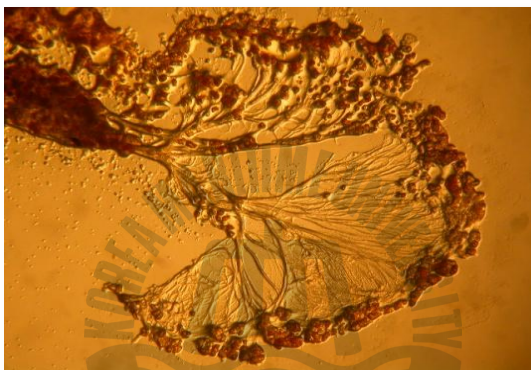


Black type

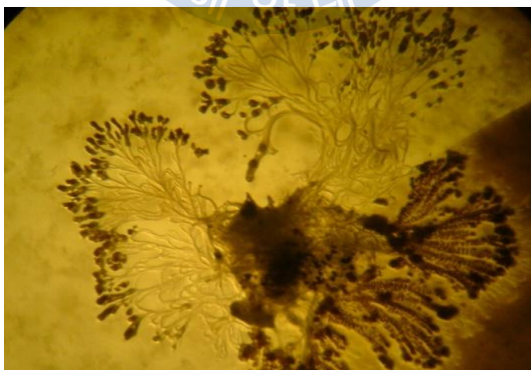
Figure 6. *S. cellulosum* on a filter paper on top of a ST21CX agar plate.



Yellow type

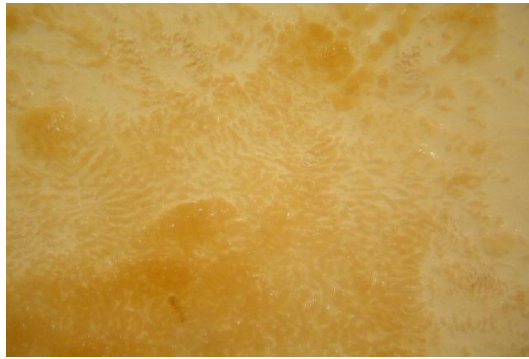


Red type

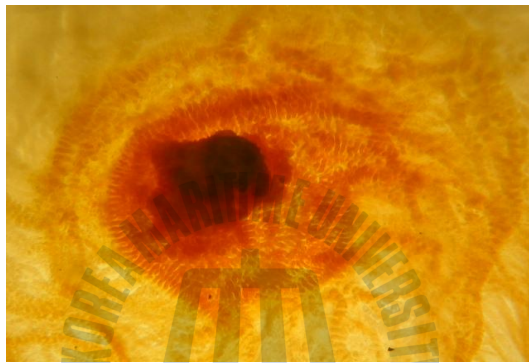


Black type

Figure 7. *S. cellulosum* on a KAN4 agar plate.



Yellow type



Red type



Black type

Figure 8. *S. cellulosum* on Vy/2 agar plate.

분리된 균주들 중에서 yellow type이 70% 정도로 가장 많이 분리 되었으며, black type이 20%, orange type이 10% 정도 되었다.

액체배양 시, 접종 후 2~3일이 경과되면 Myxobacteria의 특징인 플라스크의 벽면에 균체가 띠를 두른 듯한 형태로 달라붙는 현상이 관찰되었고, 30°C, pH 7.4 부근에서 성장이 좋았다. 대부분의 분리된 균주는 배지성분인 potato starch와 soymeal등에 의해 혼탁하였던 배양액이 맑아졌으나, pH 5 이하 또는 pH 9 이상에서는 균체의 양이 증가되지 않았고, 배양액도 맑아지지 않았다.

분리된 모든 균주는 여과지를 용해하였고, 멸균 *E. coli*는 먹이로 이용할 수 있었으나, 살아있는 *E. coli*는 먹이로 이용할 수 없었다. 균주를 그람 염색 하였을 때 붉은 색으로 염색이 되어 그람음성 세균임을 알 수 있었고, congo red 시약에 swarm이 염색되지 않아 음성임을 알 수 있었다. Oxidase test 에서는 균체의 색이 변하지 않아 음성임을 알 수 있었고, urease test에서도 배지의 색에 변화가 없어 음성임을 알 수 있었다. Nitrate reduction test에서는 detection solution(Table 13.)을 첨가하였더니 붉은색으로 변하여 양성임을 알 수 있었고, starch hydrolysis test에서도 Lugol's solution을 떨어뜨렸을 때, 투명환이 관찰되어 양성임을 알 수 있었다.

위의 특성들을 바탕으로 Bergey's manual(2005)³⁰에 따라 분리한 96 균주 들을 *Sorangium cellulosum* 으로 동정하였다.

그런데 최근 선행연구에서 Cellulolytic myxobacteria의 전형적인 특성인 cellulose를 용해시키는 능력과 함께 Bacteriolytic myxobacteria의 전형적인 특성인 용균하는 능력을 가진 Polyangiaceae과의 *Byssovorax cruenta*가 발견

되었다.³¹⁻³²

또한 Cellulolytic myxobacteria는 1속 1종으로 *Sorangium cellulosum*만 인정되어왔으나, 일부 연구에서는 자실체들의 색을 고려하여 적어도 2종 이상이 있다고 제안되어왔고,³³⁻³⁴ 이번 실험 결과에서도 적어도 세가지 이상의 다양한 자실체의 색을 관찰되었다.

Myxobacteria는 계통분류학적인 연관관계에 근거하여 분류하기 보다는 형태적 특성이나, 배양상의 특성, 그리고 생리화학적 특성을 기준으로 하여 분류하고 있으므로, 앞으로 Cellulolytic myxobacteria의 분류에 대한 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

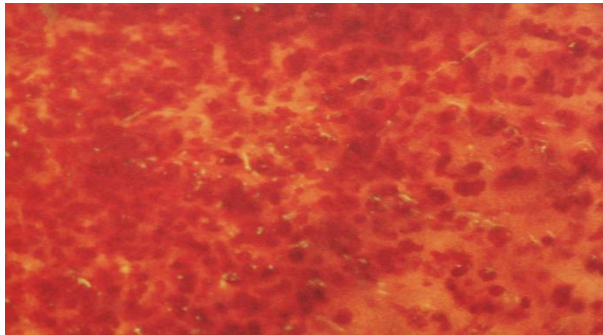
1.2. 균주 KM0141의 특성 및 동정

실험에 사용한 균주 KM0141은 경기도 용인지역에서 채집한 토양샘플에서 분리되었다. 30°C, pH 7.4일 때 성장이 좋았으며, 쌍안 실체 현미경으로 자실체의 형태를 관찰할 수 있었다. ST21CX agar plate에 놓인 여과지를 용해하여 붉은색 자실체를 형성하였고, KAN4 agar plate에서는 멸균한 *E. coli* 희석액을 micropipet으로 만든 circular patch를 따라 나뭇가지 형태의 swarm과 자실체를 형성하였다. 그러나 멸균하지 않은 *E. coli* 희석액을 사용하여 circular patch를 만든 KAN4 agar plate에서는 성장하지 못하였다. 그리고 Vy/2 agar plate에서는 두꺼운 swarm과 함께 붉은색 자실체를 형성하였다. 또한 다른 분리된 균주들에 비해서 성장이 빠르고, 일정기간 이상

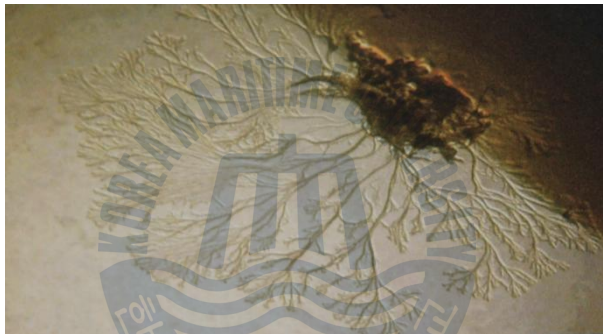
고체배양을 하게 되면 배지의 표면에 강하게 붙는 특성을 보였다.(Figure 9.)

순화가 끝난 균주 KM0141을 그람 염색에서 붉은색으로 염색이 되어 그람음성 세균임을 확인하였고, congo red 염색 결과 swarm이 염색되지 않아 음성임을 확인하였다. Oxidase test에서는 균체의 색이 변하지 않아 음성으로 확인하였고, urease test에서도 배지의 색에 변화가 없어 음성임을 확인하였다. Nitrate reduction test에서는 detection solution(Table 13.)을 첨가하였더니 붉은색으로 변하여 양성으로 확인하였고, starch hydrolysis test에서도 Lugol's solution을 떨어뜨렸을 때, 투명환이 관찰되어 양성임을 확인하였다.

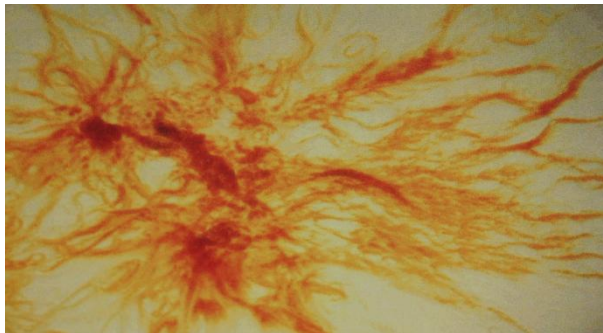




ST21CX agar plate



KAN4 agar plate



Vy/2 agar plate

Figure 9. Cultural characteristics of *S. cellulosum* KM0141.

액체배양에서도 다른 균주들에 비해 성장속도가 빨랐으며, 플라스크의 벽면에 점액질의 띠를 형성하였고, 배지성분인 potato starch와 soymeal등에 의해 혼탁하였던 배양액도 맑아졌다.

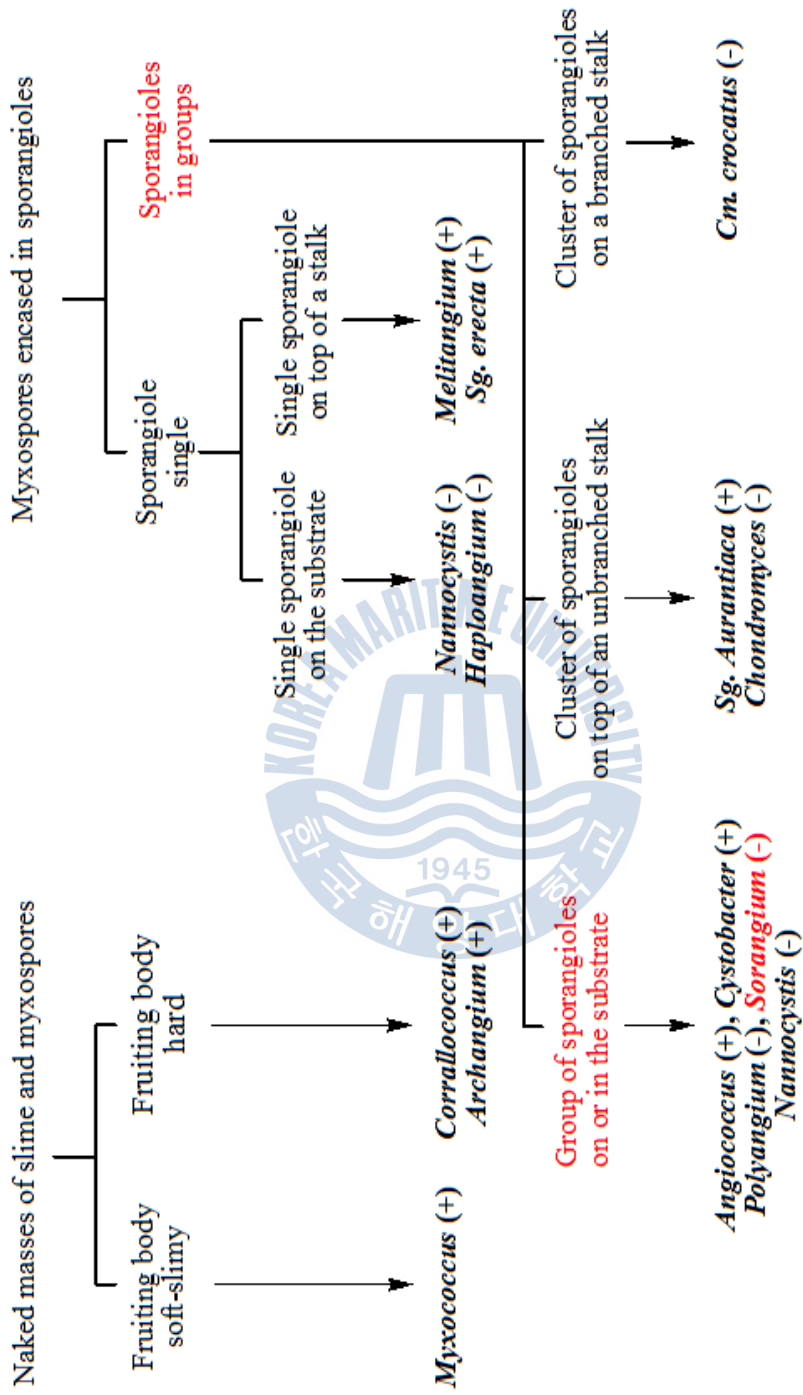
이렇게 분리 및 동정된 균주 KM0141은 한국 미생물 보존센터에 의뢰하여 16s rRNA 염기서열 비교분석을 수행하였다. 이 실험을 통하여 균주 KM0141이 *S. cellulosum*에 속한다는 사실을 재확인하였고, 한국생명공학연구원 생물자원 센터에 기탁하였다.(기탁번호: KCTC11426BP)



Figure 10. Shaker cultures of *S. cellulosum* KM0141.

Table 14. Morphological and physiological characteristics of strain KM0141.

Spore dimensions(μm)	(0.6~1.2) \times (3~15)
Optimal temperature for growth	30°C
Gram staining	-
Fruiting bodies on Vy/2 agar	
deliquescent	-
consist of sporangioles	+
Myxospores	
cylindrical rods	+
optically refractile	+
Swarm	
Stained with Congo red	-
Enzyme activity of	
oxidase	-
urease	-
Production of pigment	-
Reduction of nitrate	+
Hydrolysis of starch	+
Digestion of cellulose	+



* (+) : Congo red positive, (-) : Congo red negative

Scheme 5. Key to the fruiting body type of myxobacteria.

2. *Sorangium* 균주들이 생산하는 대사산물의 스크리닝

국내에서 채집한 토양시료로부터 분리된 총 96균주의 *S. cellulosum* 중 77균주를 스크리닝 배양하여 균체와 XAD-16 수지에서 물질을 추출하였다. XAD-16은 균체가 생산하는 유기화합물들을 흡착하여 최종 생성물의 생성을 유지시켜주고, 화합물의 변형 및 분해를 예방하여 지속적인 화합물의 생산을 가능하게 하는 역할을 한다.⁵ 추출물은 분획을 통해 배지성분과 세포벽성분을 제거하였고, 나머지 추출물을 이용하여 TLC분석 및 항균활성 실험을 통하여 시험균주를 선발하였다.

항균활성에 대한 결과는 활성이 없는 경우에는 -, inhibition zone이 불투명하게 약한 활성을 나타내는 경우에는 ±로 표기하였고, 활성이 있는 경우엔 inhibition zone의 직경을 vernier caliper로 측정하여 Table 15.에 나타내었다.

스크리닝을 통해 얻은 추출물을 사용하여 항균활성 실험을 한 결과, 총 77 균주 중 그람음성 세균인 *E. coli*에 대하여 14 균주(18%), 그람양성 세균인 *S. aureus*에 대하여 42 균주(54%), 효모인 *R. rubra*와 *C. albicans*에 대하여 각각 6 균주(8%) 와 26 균주(33%)에 활성이 있음을 확인하였다.

다른 연구결과에 의하면 Myxobacteria가 세균 중에서 *Actinomycetes*와 *Bacillus*에 이어 세 번째로 많은 생리활성물질을 생산해 내는 것으로 알려져 있으며, 배양액으로부터 분리된 대사산물의 약 95%이상이 생물학적 활성이 있다는 보고가 있었다.⁶⁻⁷ 본 실험에서도 분리된 균주들의 대사산물들이

그람음성 세균과 그람양성 세균, 효모 등에 대한 활성을 나타내었으며, 전체 균주의 약 90%가 항균활성이 있는 것으로 나타났다. 그 중에서도 균주 KM1028은 *E. coli*에 대해서 가장 좋은 활성을 나타내었으며, 균주 KM0141은 *S. aureus*에 대하여 가장 좋은 활성을 나타내었고, 그 다음으로 균주 KM1052과 균주 KM1093이 활성이 나타났다. 그리고 균주 KM1033은 *C. albicans*에 대해 강한 활성을 나타내었다.

선행연구에서 균주 KM0141 배양액으로부터 항암제로 이용되고 있는 Epothilone 및 Spirodienals계열의 흥미로운 이차대사산물들을 생산하는 것으로 보고되었다. 그 중에서도 UV 흡수패턴이 Spirodienal계열이나, 극미량 생산되는 화합물을 연구대상으로 선정하였다.

Table 15. Screening of *S. cellulosum* for antimicrobial activity.

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	50,000	—	—	—	7.4
KM1002	10,000	—	—	—	11.1
KM1003	10,000	—	±	—	—
KM1004	10,000	—	8.9	—	—
KM1006	10,000	±	—	—	—
KM1007	10,000	—	—	—	9.1
KM1008	10,000	—	—	—	11.2
KM1010	50,000	9.8	—	—	8.8

KM1011	50,000	±	±	-	10.1
KM1013	50,000	-	±	-	-
KM1014	50,000	-	-	-	14.0
KM1015	40,000	-	-	-	8.5
KM1016	10,000	-	13.6	-	-
KM1017	10,000	-	-	-	-
KM1018	10,000	-	10.5	-	-
KM1019	10,000	-	8.6	-	-
KM1020	10,000	-	±	-	-
KM1021	50,000	-	-	-	12.7
KM1022	50,000	-	-	-	14.9
KM1023	50,000	-	±	-	-
KM1024	10,000	-	-	8.8	-
KM1025	50,000	-	-	-	13.4
KM1027	20,000	-	±	-	-
KM1028	40,000	15.5	-	±	-
KM1029	10,000	±	-	-	-
KM1031	10,000	-	-	-	±
KM1032	10,000	-	11.9	-	-
KM1033	50,000	-	12.1	-	27.3
KM1034	50,000	-	11.2	-	-
KM1035	50,000	±	-	-	-
KM1036	50,000	-	±	-	-
KM1037	50,000	-	-	-	-

KM1040	50,000	±	-	-	-
KM0141	50,000	-	27.2	-	-
KM1042	50,000	-	-	±	-
KM1043	50,000	-	12.8	-	-
KM1044	50,000	-	±	-	-
KM1045	10,000	-	±	-	-
KM1049	50,000	11.0	9.5	-	-
KM1050	50,000	±	-	-	9.7
KM1051	50,000	-	9.8	-	12.5
KM1052	50,000	-	21.4		13.6
KM1054	10,000	-	-	15.9	-
KM1055	10,000	-	-	-	-
KM1056	10,000	-	-	-	-
KM1057	10,000	-	-	-	-
KM1059	10,000	-	-	±	-
KM1060	50,000	-	8.7	-	-
KM1063	10,000	-	14.1	-	-
KM1064	50,000	-	-	-	-
KM1065	10,000	-	-	11.0	-
KM1066	10,000	-	7.0	-	-
KM1067	50,000	-	9.1	-	-
KM1068	50,000	-	9.5	-	-
KM1071	50,000	-	11.4	-	-
KM1072	50,000	-	9.3	-	-

KM1073	50,000	—	11.5	—	—
KM1074	50,000	—	—	—	15.1
KM1075	50,000	—	6.8	—	9.9
KM1076	50,000	10.5	±	—	—
KM1077	50,000	8.0	—	—	—
KM1078	50,000	—	17.0	—	10.8
KM1080	50,000	—	±	—	10.6
KM1082	50,000	—	11.9	—	7.5
KM1083	50,000	—	7.6	—	—
KM1084	50,000	—	8.1	—	—
KM1085	50,000	—	12.8	—	—
KM1086	50,000	—	—	—	—
KM1087	50,000	—	—	—	16.2
KM1088	50,000	—	8.8	—	14.8
KM1089	50,000	—	14.8	—	9.6
KM1090	50,000	—	9.5	—	8.9
KM1092	50,000	—	—	—	15.2
KM1093	50,000	—	19.5	—	—
KM1094	50,000	—	—	—	—
KM1095	50,000	—	—	—	—
KM1096	50,000	±	8.4	—	—

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

3. KM0141이 생산하는 새로운 대사산물의 구조결정

Spirodienal의 물리화학적 특성은 Table 16.에 나타내었다. 무색의 오일 형태로 분리되었고, 285nm에서 UV의 최대 흡수를 보였다. ^{13}C NMR과 DEPT data를 통하여 탄소, 수소, 산소로만 구성된 화합물임을 알 수 있었고, High resolution ESI-MS data결과를 통해 분자식을 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$ (분자량: 506)으로 결정하였다. IR data는 NMR data와 함께 비교하여 3473cm^{-1} 의 흡수는 hydroxyl group(-OH), 1671cm^{-1} 의 흡수는 carbonyl group 중 aldehyde(-CHO)에 해당함을 알 수 있었다.

Table 16. Physico-chemical properties of Spirodienal D.

Spirodienal D	
Appearance	Colorless oil
Molecular formula	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$
Molecular weight	506
HR-ESI-MS m/z	
Found	529.3504 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
Calcd.	529.3500
UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ)	277 (4.27)
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1}	3473, 1671
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$	+30° (c.0.10, MeOH)
TLC (Rf value) ^a	0.63
Soluble	MeOH, EtOAc, CH_2Cl_2 , MeCN
Insoluble	H_2O , <i>n</i> -hexane, <i>n</i> -heptane

^a Silica gel plate, EtOAc-Hexane (1:1)

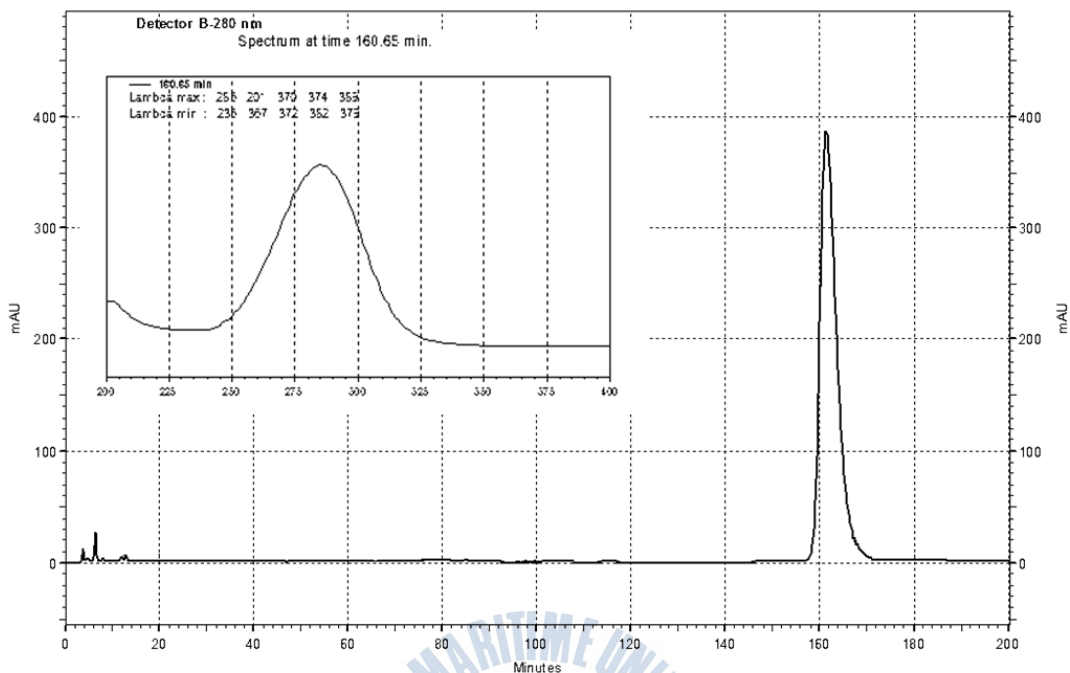


Figure 11. UV spectrum and HPLC profile of spirodienal D.

^{13}C NMR과 DEPT data를 통하여 3개의 quaternary carbon(δ 136.8, δ 132.4, δ 99.1), 5개의 oxymethine(δ 77.7, δ 77.3, δ 75.7, δ 72.1, δ 70.4)과 10개의 methane(δ 193.1, δ 156.9, δ 147.7, δ 128.3, δ 120.9, δ 36.8, δ 35.4, δ 35.2, δ 33.05, δ 26.0), 3개의 methylene(δ 47.1, δ 36.83, δ 33.37), 1개의 methoxy group($-\text{OCH}_3$, δ 55.4), 8개의 methyl(δ 17.9, δ 16.7, δ 16.2, δ 13.8, δ 13.5, δ 12.6, δ 8.12, δ 4.6)이 존재하는 것을 알 수 있었다. 따라서 ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT data를 통하여 30개의 carbon과 48개의 proton을 알 수 있었다.(Figure 12.)

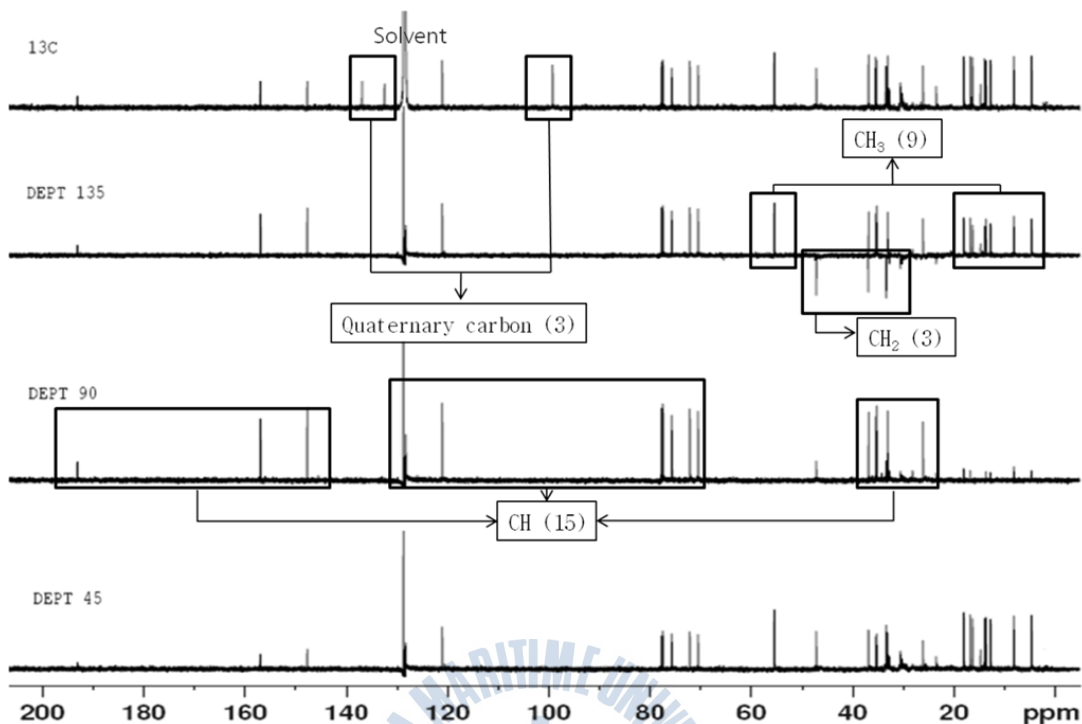


Figure 12. DEPT spectrum of Spirodienal D. (C_6D_6 , 200MHz)

HMQC data 를 통하여 각각의 carbon 과 proton 을 연결관계를 확인하였다. Data 에서 용매피크 부근에 가려져있던 carbon(δ 128.3)의 존재와 이와 연결되어 있는 proton(δ 6.10)을 확인할 수 있었다. 또한 carbon 과 proton 의 chemical shift 를 통하여 확인한 aldehyde group(δ 193.1 의 C, δ 9.3 의 H)과 methoxy group(δ 55.4 의 C, δ 3.5~ δ 3.12 의 H), δ 70 부근의 carbon 과 δ 3 부근의 proton 으로 알 수 있는 oxymethine, 그리고 chemical shift 로 예상한 δ 99.1 carbon 의 ketal carbon 으로부터 oxygen 수를 분자식 $C_{30}H_{50}O_6$ 과 대조하여 ketal 결합(-O-C-O-)과 2 개의 hydroxyl group(-OH)이 존재함을 추정 하였다.

IHD 값이 6 이므로, carbonyl group과 3개의 이중결합을 가지고 있음을

고려하여 2개의 ring이 존재함을 예상하였다.

부분구조 및 평면구조는 ^1H - ^1H COSY, long-range ^1H - ^{13}C HMBC correlation spectroscopy의 분석으로 결정되었다.

^1H - ^1H COSY data를 통해 aldehyde C-1(δ 193.1)의 proton δ 9.3부터 C-3(δ 156.9)의 δ 6.8까지의 연결로 부분구조 I을 알 수 있었고, C-5(δ 147.7)의 proton δ 6.13부터 C-29(δ 13.8)의 proton δ 1.53까지의 연결로 부분구조 II를 알 수 있었다. 또한, C-7(δ 77.3)의 proton δ 3.53부터 C-9(δ 36.83)의 proton δ 1.82과 δ 1.86까지의 연결로 부분구조 III을 알 수 있었고, C-12(δ 33.3)의 proton δ 2.36과 δ 1.5부터 C-26(δ 4.6)의 proton δ 0.96까지의 연결로 부분구조 VI를 알 수 있었다. 그리고 C-16(δ 36.8)의 proton δ 1.60 에서부터 C-25(δ 8.12)의 proton δ 0.67까지의 연결로 부분구조 V와 C-21(δ 120.9)의 proton(δ 5.29)와 C-22(δ 13.8)의 proton δ 1.53 사이의 연결로 부분구조 VI를 알 수 있었다.(Figure 13.)

그리고 H-11, H-13, H-14, H-16에서 C-12로의 Long-range ^1H - ^{13}C HMBC correlation을 통해 예상하였던 두 개의 ring의 구조를 알 수 있었고, 이는 문헌조사로 spiroketal ring임을 확인하였다.(Figure 14.)

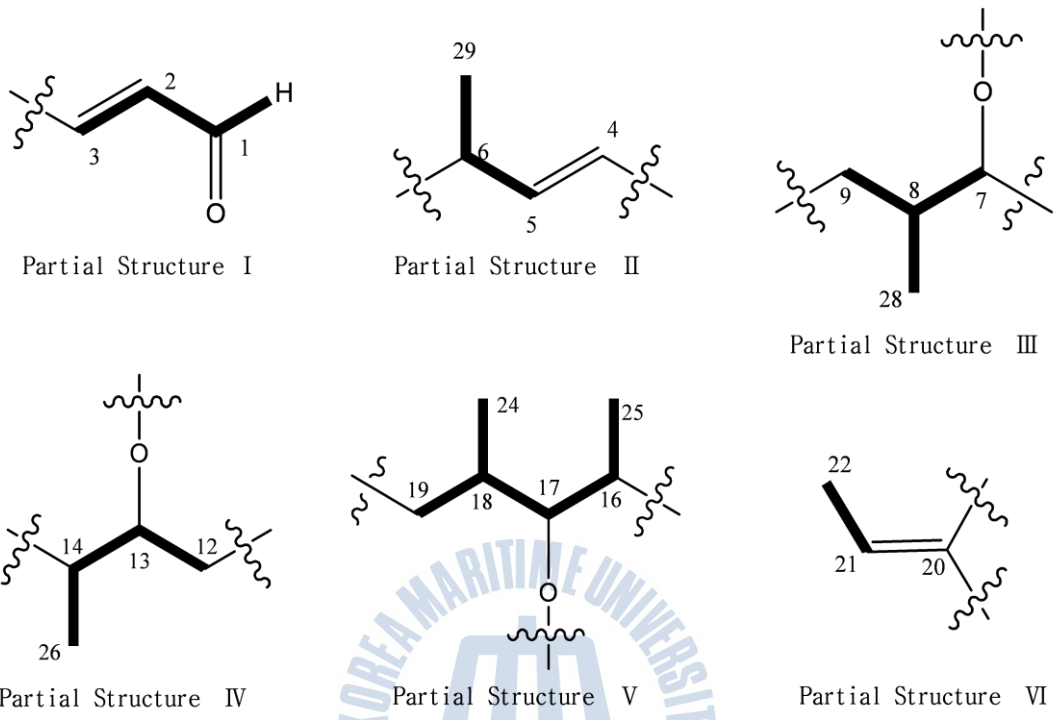


Figure 13. Partial structures of Spirodienal D.

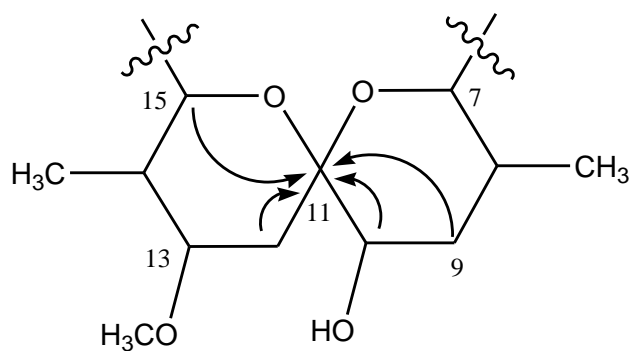


Figure 14. HMBC correlations for spiroketal core.

Long-range ^1H - ^{13}C HMBC correlation을 통하여 I에서 VI까지의 부분 구조들의 연결관계를 밝혔다. C-30의 proton δ 1.52와 C-3, C-4, C-5간의 연결신호와 C-3의 proton δ 6.80과 C-5간의 연결신호를 통해 부분구조 I과 II이 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 또한 C-29의 proton δ 1.06과 C-7사이의 연결신호와, C-5의 proton δ 6.13과 C-7사이의 연결신호를 통하여 부분구조II와 III이 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 또한 부분구조III의 C-8의 proton δ 1.81과 C-10사이에서의 연결신호와 C-10의 proton δ 3.36과 C-11사이의 연결 신호, C-12의 proton δ 2.37과 δ 1.52와 C-11사이의 연결신호와 C-15의 proton δ 3.67과 C-11사이의 연결신호를 통해 두 개의 ring구조로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 게다가 C-27의 proton δ 3.5와 C-15사이의 연결신호를 통해 서로 연결되어 있음을 알 수 있었고, C-15의 proton δ 3.67이 C-11과 C-13사이에서 연결신호가 확인되어 C-15가 부분구조IV와 연결되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 C-25의 proton δ 0.67과 C-16의 proton δ 1.6은 C-15사이에 연결신호가 확인되어 서로 연결되어 있음을 알 수 있었고, C-23의 proton δ 1.58이 C-19와 C-21사이에 연결신호가 확인되었고, C-21의 proton δ 5.29와 C-19사이에 연결신호가 확인되어 부분구조V와 VI이 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다.

이로써 6개의 부분구조와 spiroketal ring의 결합으로 Spirodienal D의 평면구조를 밝혔다.(Figure 15.)

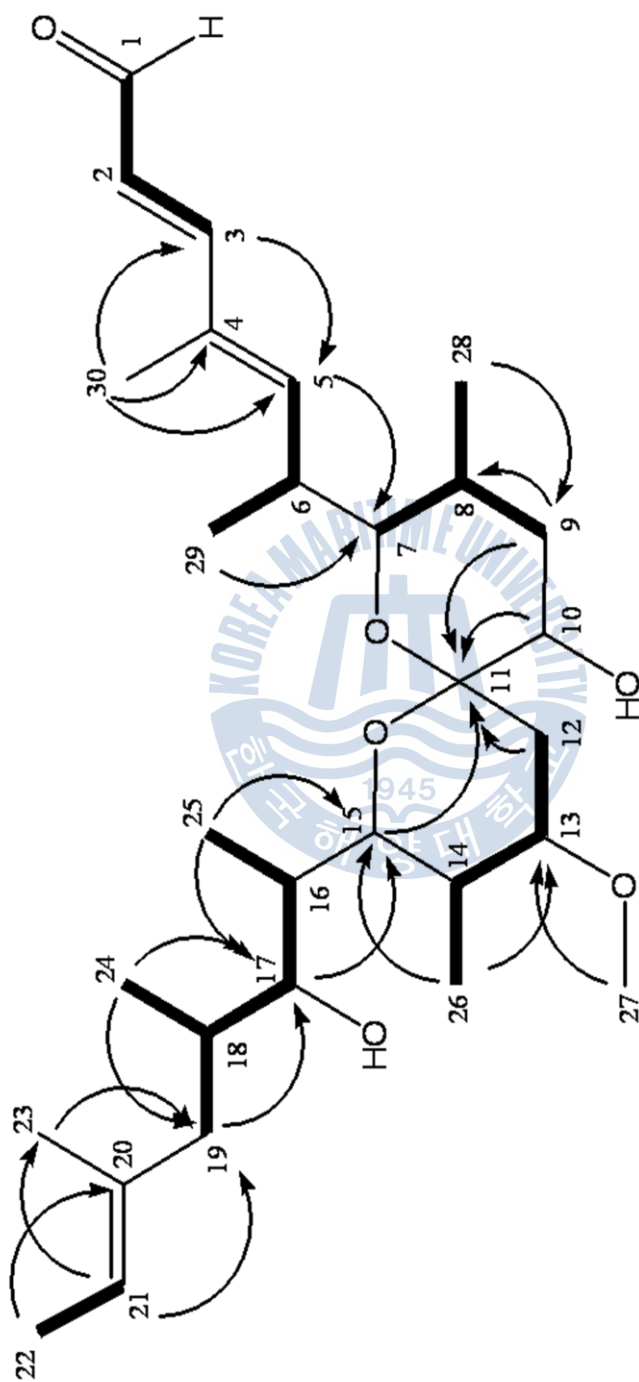


Figure 15. 2D NMR correlations for Spirodienal D.

- Bold lines show ^1H - ^1H COSY correlations, and arrows show HMBC correlations.

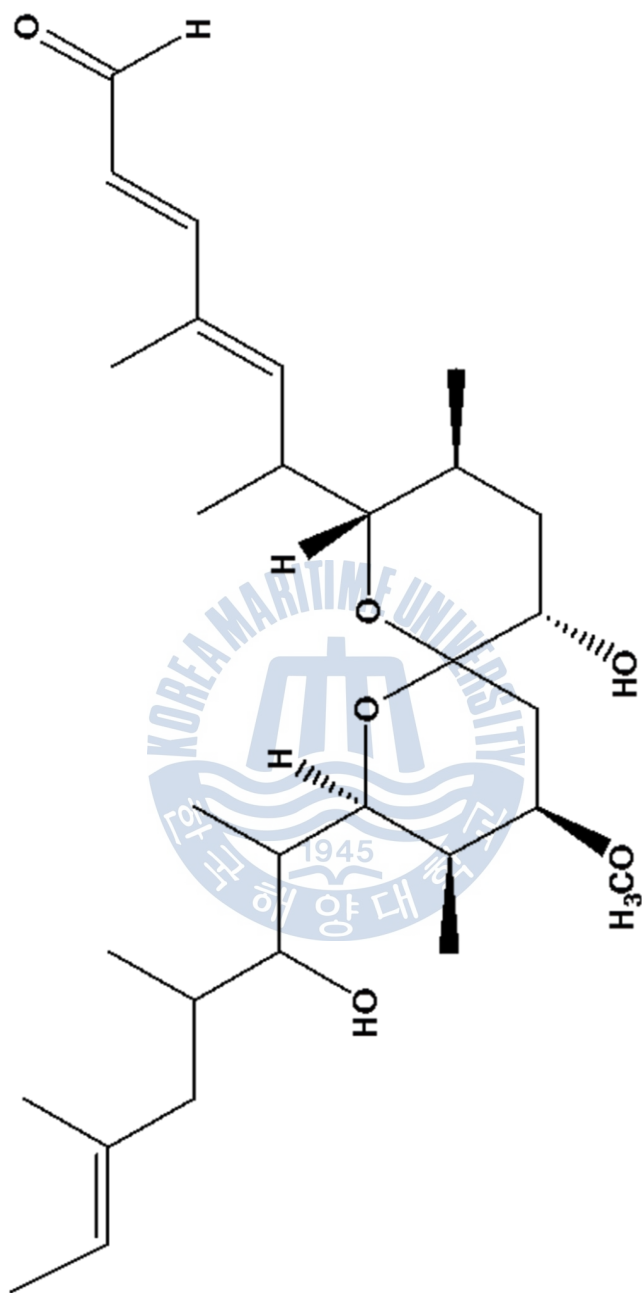


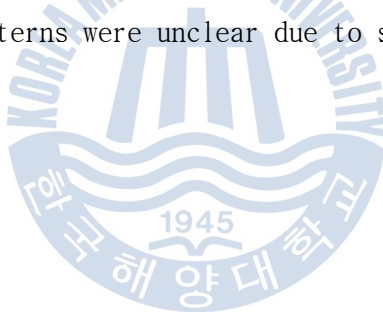
Figure 17. The structure of Spirodienal D.

Table 17. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of Spirodienal D (C_6D_6 , 900MHz)

	$\delta \text{C}^{\text{a)}$	$\delta \text{H}^{\text{b)}$	Multiplicity	J [Hz]	HMBC
1	193.1 d	9.3	d	7.2	C-2, C-3
2	128.3 d	6.10	m	7.2, 15.3	C-1, C-3, C-5
3	156.9 d	6.80	d	15.3	C-1, C-5, C-30
4	132.4 s	-			
5	147.7 d	6.13	m	11.7	C-3, C-30
6	35.2 d	2.7	m		C-30
7	77.3 d	3.53	m	6.3	C-29
8	26.0 d	1.81			C-7, C-10
9	36.83 t	1.82		7.2	C-7, C-8, C-10, C-30
		1.86			
10	70.4 d	3.36			C-11
11	99.1 s	-			
12	33.37 t	2.37	dd	9.0, 12.6,	C-11, C-13, C-14
		1.52	s	15.36	
13	77.7 d	3.82	m		
14	33.05 d	2.14	m		C-12
15	72.1 d	3.67			C-7, C-11, C-13
16	36.80 d	1.6			C-17
17	75.7 d	3.7			C-16, C-18, C-19
18	35.4 d	1.7	m		C-17, C-19
19	47.1 t	2.4		5.4, 11.7,	C-17, C-18, C-20
		1.87		7.2, 7.6	
20	136.8 s	-			
21	120.9 d	5.29			C-19, C-23

22	13.8	q	1.53	d	6.3	C-20, C-23
23	16.2	q	1.58	s	8.1	C-19, C-20, C-22
24	16.7	q	0.71	d	7.2	C-15, C-17, C-18, C-19
25	8.12	q	0.67	d	7.2, 6.3	C-15, C-16, C-17
26	4.6	q	0.96		6.3	C-13, C-14, C-15
27	55.4	q	3.5		8.1	C-13
28	17.9	q	0.72	d	4.5	C-7, C-15
29	13.5	q	1.06	d	6.3	C-6, C-7
30	12.6	q	1.52	s		C-3, C-5, C-29

- a) Chemical shifts are shown with reference to C_6D_6 as 128.3ppm.
 b) Chemical shifts are shown with reference to C_6D_6 as 7.1ppm.
 c) Multiplicity patterns were unclear due to signals overlapping.



4. 생물활성

4.1. 항균활성

항균활성 측정은 paper disc 확산법을 사용하여, *S. aureus*, *E. coli*, *R. rubra*, *C. albicans*를 대상으로 실험하였다. 새로운 화합물 Spirodienal D는 spiroketal core에 두 개의 긴 side chain이 존재하는데, 한쪽은 dienal의 configuration과 하나의 methylene의 결합이 다른 유도체이다. 독일에서 연구된 문헌에 따르면 구조가 spiroketal core에 두 개의 긴 side chain이 존재하는 구조적으로 매우 유사한 화합물 Spirangien A, B가 *S. cellulorum* (strain So ce90)에서 분리된 것으로 조사되었다. 또한 Spirodienal D의 관계처럼 methylene의 결합만 다른 유도체이지만 Spirangien A가 yeast와 fungi에 대한 강한 활성을 나타내는 것으로 보고되었다.³⁵

그러나 Spirodienal D에 대한 항균활성 실험에서 시험균주에 대하여 활성이 없는 것으로 확인되었다. 본 연구실의 선행연구에서 분리되었던 Spirodienal A, B, C에서도 시험 균주에 대해 활성이 없었던 것으로 확인되었고, 이는 추출물 XE에서 보였던 *S. aureus*에 대한 활성물질이 Spirodienals이 아닌 다른 화합물에 의한 것으로 보인다.

4.2. 세포독성

Spiroketal ring을 포함하는 새로운 화합물을 SRB assay방법으로 세포 생존율을 측정하여 세포독성에 대한 실험을 한국화학연구소에 의뢰하여 수행하였다.

문헌조사에 따르면 spiroketal ring을 포함한 천연물의 예로 해양 해면에서 분리된 Althoyrtin A³⁶는 KB cell과 L1210 cell에 강한 세포독성을 보이는 화합물이며, Spongistatin 1³⁷은 melanoma, lung, colon cancer cell에 세포독성을 나타낼 뿐만 아니라 A-549 cell과 leukemic cell에 대해 apoptosis유발 효과가 있는 것으로 보고된다. 또한 *S. cellulosum*에서 분리된 Spirangien A, B는 항진균 활성 뿐만 아니라, L929 mouse fibroblast cell에 대해 매우 높은 세포독성 효과를 가지는 것으로 독일의 GBF에서 보고되었다.^{35,38}

이러한 구조적으로 매우 유사한 화합물들의 세포독성 실험결과를 바탕으로 앞서 연구된 Spirodienal계열과 새롭게 분리된 Spirodienal D를 HCT-15 인간 결장암 세포 외 3종의 인간 암 세포에 대하여 세포독성 실험을 하였다. 그 결과, Spirodienal D는 A-549 cell에 대하여 IC₅₀ 0.604 μ M, SK-OV-3 cell에서의 IC₅₀ 0.722 μ M, SK-MEL-2 cell에서 IC₅₀ 0.491 μ M, HCT-15 cell에서 IC₅₀ 0.182 μ M의 세포독성을 나타내었다.(Table 18.) 이는 항종양제로서 광범위하게 사용되는 anthracycline계 항생제 Doxorubicin이 HCT-15 cell에 대하여 IC₅₀ 0.38 μ M인 것보다 약 2배 강한 활성을 보였다. 문헌조사에 따르면 구조적으로 유사한 화합물 Spirangien A, B 구조는 methyl기 또는 ethyl기 결합만 다른 동족체 관계나 항진균과 세포독성 실험에서 활성의 차이가 있었다. 또한 선행연구에 의해 분리된 Spirodienal A와 Spirodienal C는 geometrical isomer의 차이지만

적게는 2배에서 많게는 10배 이상의 활성의 차이를 보였으며, Spirodienal A, B, C, D는 reference인 Doxorubicin보다 HCT-15 cell에 대해 약 1.5배에서 7배 정도 더 높은 활성을 보였다. 또한 이 네 개의 화합물들은 서로 구조적으로 유사하였으나, 같은 cancer cell line에서도 적게는 2배에서 많게는 10배에 가까운 활성의 차이를 보였다. 따라서 작은 구조적 차이임에도 불구하고 생물학적 작용이 다르게 나타난다는 것을 의미한다.

Spirangien A, B의 생산균주 So ce90은 Epothilone을 생산하는 것으로 보고 되었으며³⁹, 본 연구에 이용된 균주 KM0141에서도 Epothilone을 생산하는 것으로 앞선 연구에서 발표된 바 있다. 이는 Epothilone이 생산되는 균주로부터 강한 세포독성을 나타내는 spiroketals 화합물이 분리되고 있음을 나타낸다.

Table 18. Cytotoxicities of Spirodienals A-D.

compound	IC ₅₀ (μM)			
	A-549	SK-OV-3	SK-MEL-2	HCT-15
Spirodienal A	0.091	0.224	0.095	0.053
Spirodienal B	0.562	0.837	0.364	0.261
Spirodienal C	0.878	1.284	0.826	0.144
Spirodienal D	0.604	0.722	0.491	0.182
Doxorubicin	0.029	0.067	0.006	0.380

IV. 결 론

Myxobacteria는 그람음성 세균으로 다양한 서식지에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이들은 다른 세균들과 달리 군집생활을 하며 활주운동을 하여 원핵생물 중 가장 복잡한 생활사를 가진다. 게다가 여러 가수분해 효소와 항생물질들을 세포 밖으로 배출함으로써 영양분을 분해하여 이용하고, 외부의 환경으로부터 자신을 보호하는데 이용한다. 그러나 순수하게 분리하고 배양하기가 매우 까다로워 다른 미생물에 비해 선행연구나 국제 미생물 보존기구에 보관된 종이 매우 적다. 그럼에도 불구하고 다양한 기본골격과 작용기작을 가진 생리활성물질들을 생산하는 것으로 알려져 주목 받고 있다.

지난 3년 동안 국내토양으로부터 Myxobacteria인 *Sorangium cellulorum* 96균주를 순수하게 분리하였다. 분리된 균주는 모두 cellulose를 용해하고 특징적인 자실체를 형성하였다. 분리된 균주의 자실체의 색은 yellow, orange, black color의 자실체와 swarm을 나타내었다. 따라서 이들 Myxobacteria가 주요 형태적 특성에 의해 분류됨을 고려하면 *S. cellulorum* 1종만 인정하고 있는 현재 Cellulolytic myxobacteria의 분류체계는 좀 더 세분화되어야 할 것으로 생각된다.

분리된 총 96균주 중 77균주의 배양 추출물에 대한 항균활성의 결과, 그람음성 세균인 *E. coli*에 대하여 14균주(18%), 그람양성 세균인 *S. aureus*에 대하여 42균주(54%), 효모에서는 *R. rubra*에 대하여 6균주(8%), *C. albicans*에 대

하여 26균주(33%)가 활성이 있음을 확인하였다. 이중에서도 균주 KM0141은 그람양성 세균인 *Staphylococcus aureus*에 대한 inhibition zone이 27.2mm로 가장 큰 활성을 보였다.

선행연구에서 균주 KM0141로부터 새로운 생리활성물질을 탐색하던 중 HPLC profile 상에서 유사한 UV패턴을 가진 화합물균을 발견하였다. 이중에서 3개의 생리활성물질을 분리하였고, 이를 Spirodienal A, B, C라고 명명하였다.

본 연구에서는 선행연구를 통해 앞서 분리되었던 Spirodienal 계열임을 확인하였으나 극미량 존재하여 그동안 분리하기 어려웠던 화합물을 15개월 동안 대량배양을 통해 얻은 배양액 320L에서 분리 정제하여 3.9mg을 분리하는데 성공하였다. 대량배양을 통해 얻은 균주 KM0141 배양액은 용매추출, 분획, 크로마토그래피 및 HPLC등을 통해 분리 정제하였다. 분리된 화합물의 구조는 ^1H NMR, ^{13}C NMR, gHSQC-DEPT, gHMOC, ^1H - ^1H gCOSY, gHMBC, gNOESY data, UV, IR 그리고 HR-ESI-MS data를 기초로 결정하여 Spirodienal D라 명명하였다. 앞서 본 연구실에서 앞서 분리하였던 Spirodienal A, B, C는 독일의 연구진에 의해 2005년에 이미 보고되어 있는 Spirangien의 분해산물로 추정되는 구조였으나, 이번에 새롭게 분리된 Spirodienal D는 앞서 분리된 Spirodienal 화합물과 비슷한 구조를 가지고 있으나, 분해산물로 보기에는 어려운 형태를 보였다. 따라서 side chain의 생합성과정에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

새로 분리된 Spirodienal D와 앞서 분리된 Spirodienal A, B, C는 인간 암세포(A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, HCT-15)에 대하여 세포독성 실험을 SRB method로 수행하였고, reference는 doxorubicin을 사용하였다. 그 결과, 4개의 화합

물들은 0.053~0.878 μ M 범위의 IC₅₀ 값을 나타내었다. 그중에서도 HCT-15에 대한 세포독성은 Spirodienal A, B, C, D 모두에서 reference로 사용되었던 doxorubicin 보다 2~7배 가량 더 강력한 세포독성을 나타내었다.

*Sorangium cellulosum*에서 생산하는 것으로 알려진 Epothilone은 본 연구에서 사용된 균주 KM0141에서도 생산하는 것으로 선행연구결과를 통해 알려져 있으며, 이는 기존의 난소암 치료제인 Taxol에 비해 물에 용해도가 뛰어나며, 효과도 약 2.5배 높은 것으로 알려져 있다.²⁸ 독일의 GBF의 연구에 따르면 *S. cellulosum*의 배양액으로부터 분리한 대사물질의 약 95%가 생물학적 활성이 있었고, 그 중, 46%는 천연물에서 새롭게 분리된 화합물이라고 보고되었다.⁴⁰

본 연구를 통해서도 다양한 생리활성물질들을 생산하고 있음을 확인할 수 있었고, 신규 선도물질을 확보하기 위한 미생물 유래의 신규 생리활성물질들을 탐색하는데 *S. cellulosum*의 역할이 기대된다.

참고 문헌

- 1 Reichenbach, A., Dworkin, M., Balows, A. & Truper, H. 「The myxobacteria, The prokaryotes(2nd ed)」 . 3416-3487, (1992).
- 2 교재편찬위원회, 천. 「天然物化學」 . (2006).
- 3 Demain, A. L. & Sanchez, S. 「Microbial drug discovery: 80 years of progress」 . *J Antibiot (Tokyo)* **62**, 5-16, (2009).
- 4 Cragg, G. M., Newman, D. J. & Snader, K. M. 「Natural products in drug discovery and development」 . *J Nat Prod* **60**, 52-60, (1997).
- 5 Berdy, J. 「Bioactive microbial metabolites」 . *J Antibiot (Tokyo)* **58**, 1-26, (2005).
- 6 Reichenbach, H. 「Myxobacteria, producers of novel bioactive substances」 . *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**, 149-156, (2001).
- 7 김용석, 배우철 & 백성진. 「Myxobacteria의 생리활성 물질」 . *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1-12, (2003).
- 8 조경연. 「Myxobacteria의 군집생활, 자실체형성 및 생리활성물질의 생산」 . **14**, 11-16, (2001).
- 9 Altmann, K. H. 「Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs」 . *Curr Opin Chem Biol* **5**, 424-431, (2001).

- 10 SHIMKETS, L. & WOESE, C. R. 「A phylogenetic analysis of the myxobacteria: Basis for their classification (16S rRNA/8 purple bacteria/rRNA gnatWe/r d evolution)」 . *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9459-9463, (1992).
- 11 Gao, F. & Zhang, C. T. 「Origins of replication in *Sorangium cellulosum* and *Microcystis aeruginosa*」 . *DNA Res* **15**, 169-171, (2008).
- 12 Bode, H. B. & Muller, R. 「Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular」 . *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 577-588, (2006).
- 13 Dawid, W. 「Biology and global distribution of myxobacteria in soils」 . *FEMS Microbiol Rev* **24**, 403-427, (2000).
- 14 Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R. & Yamanaka, S. 「Isolation of myxobacteria from the marine environment」 . *FEMS Microbiol Lett* **169**, 317-322, (1998).
- 15 Reichenbach, H. 「The ecology of the myxobacteria」 . *Environ Microbiol* **1**, 15-21, (1999).
- 16 Shimkets, L. J. 「Social and developmental biology of the myxobacteria」 . *Microbiol Rev* **54**, 473-501, (1990).
- 17 조경연. 「박테리아의 활주운동」 . *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 199-205, (2002).
- 18 Koch, A. L. & White, D. 「The social lifestyle of myxobacteria」 . *BioEssays* **20**, (1998).
- 19 Sproer, C., Reichenbach, H. & Stackebrandt, E. 「The correlation between

- morphological and phylogenetic classification of myxobacteria」. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 3**, 1255-1262, (1999).
- 20 Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. & Trowitzsch, W. 「Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties」. *J Antibiot (Tokyo)* **33**, 1474-1479, (1980).
- 21 Kunze, B., Kemmer, T., Hofle, G. & Reichenbach, H. 「Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties」. *J Antibiot (Tokyo)* **37**, 454-461, (1984).
- 22 Gerth, K. *et al.* 「The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action」. *J Antibiot (Tokyo)* **36**, 1150-1156, (1983).
- 23 Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Hofle, G. & Reichenbach, H. 「Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria」. *J Antibiot (Tokyo)* **48**, 31-35, (1995).
- 24 Gerth, K., Bedorf, N., Hofle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. 「Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties」. *J Antibiot (Tokyo)* **49**, 560-563, (1996).
- 25 Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Hofle, G. & Reichenbach, H. 「Apicularens A and B, new cytostatic macrolides from *Chondromyces* species (myxobacteria): production, physico-chemical and biological

- properties」. *J Antibiot (Tokyo)* **51**, 1075-1080, (1998).
- 26 Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Hofle, G. & Reichenbach, H. 「Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties」. *J Antibiot (Tokyo)* **48**, 1262-1266, (1995).
- 27 Julien, B. & Fehd, R. 「Development of a mariner-based transposon for use in *Sorangium cellulosum*」. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6299-6301, (2003).
- 28 Bollag, D. M. *et al.* 「Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action」. *Cancer Res* **55**, 2325-2333, (1995).
- 29 Kwak, J. H. & Ahn, J. W. 「A new cytotoxic spiroketal from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*」. *Arch Pharm Res* **32**, 841-844, (2009).
- 30 Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M. 《*Bergey's manual of systematic bacteriology* / George M. Garrity, editor-in-chief》. 2nd edn, (Springer, 2001).
- 31 Kunze, B. *et al.* 「Cruentaren, a new antifungal salicylate-type macrolide from *Byssovorax cruenta* (myxobacteria) with inhibitory effect on mitochondrial ATPase activity. Fermentation and biological properties」. *J Antibiot (Tokyo)* **59**, 664-668, (2006).
- 32 Reichenbach, H., Lang, E., Schumann, P. & Sproer, C. 「*Byssovorax cruenta* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium:

- rediscovery of 'Myxococcus cruentus' Thaxter 1897」. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2357-2363, (2006).
- 33 Yan, Z. C. *et al.* 「Morphologies and phylogenetic classification of cellulolytic myxobacteria」. *Syst Appl Microbiol* **26**, 104-109, (2003).
- 34 Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M. 《*Bergey's manual of systematic bacteriology* / George M. Garrity, editor-in-chief》. 2nd edn, (Springer, 2005).
- 35 Niggemann, J. *et al.* 「Spirangien A and B, Highly Cytotoxic and Antifungal Spiroketal from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum*: Isolation, Structure Elucidation and Chemical Modifications」. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5013-5018, (2005).
- 36 Kobayashi, M. *et al.* 「Altohyrtin A, a potent anti-tumor macrolide from the Okinawan marine sponge *Hyrtios altum*」. *Tetrahedron Letters* **34**, 2795-2798, (1993).
- 37 Uckun, F. M., Mao, C., Vassilev, A. O., Huang, H. & Jan, S. T. 「Structure-based design of a novel synthetic spiroketal pyran as a pharmacophore for the marine natural product spongistatin 1」. *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 541-545, (2000).
- 38 Frank, B. *et al.* 「Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes」. *Chem Biol* **14**, 221-233, (2007).
- 39 Jundt, L. *et al.* 「Isolation and Structure Elucidation of *Cruentarens A*

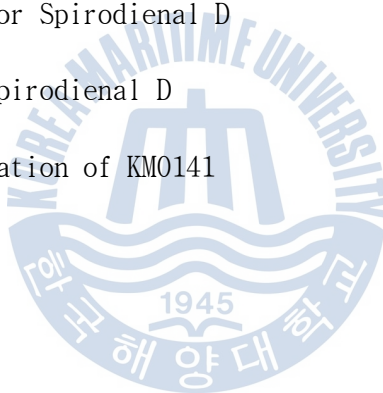
and B – Novel Members of the Benzolactone Class of ATPase Inhibitors from the Myxobacterium *Byssovorax cruenta*」. 5036-5044, (2006).

- 40 Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. & Muller, R. 「Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities--past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*」. *J Biotechnol* **106**, 233-253, (2003).



부 록

1. ^1H NMR spectrum of Spirodienal D (900MHz, C_6D_6)
2. ^{13}C NMR spectrum of Spirodienal D (200MHz, C_6D_6)
3. gHMQC spectrum of Spirodienal D (C_6D_6)
4. ^1H - ^1H COSY spectrum of Spirodienal D (C_6D_6)
5. gHMBC spectrum of Spirodienal D (C_6D_6)
6. NOESY spectrum of Spirodienal D (C_6D_6)
7. HR-ESI-MS data for Spirodienal D
8. IR spectrum of Spirodienal D
9. Deposit certification of KM0141

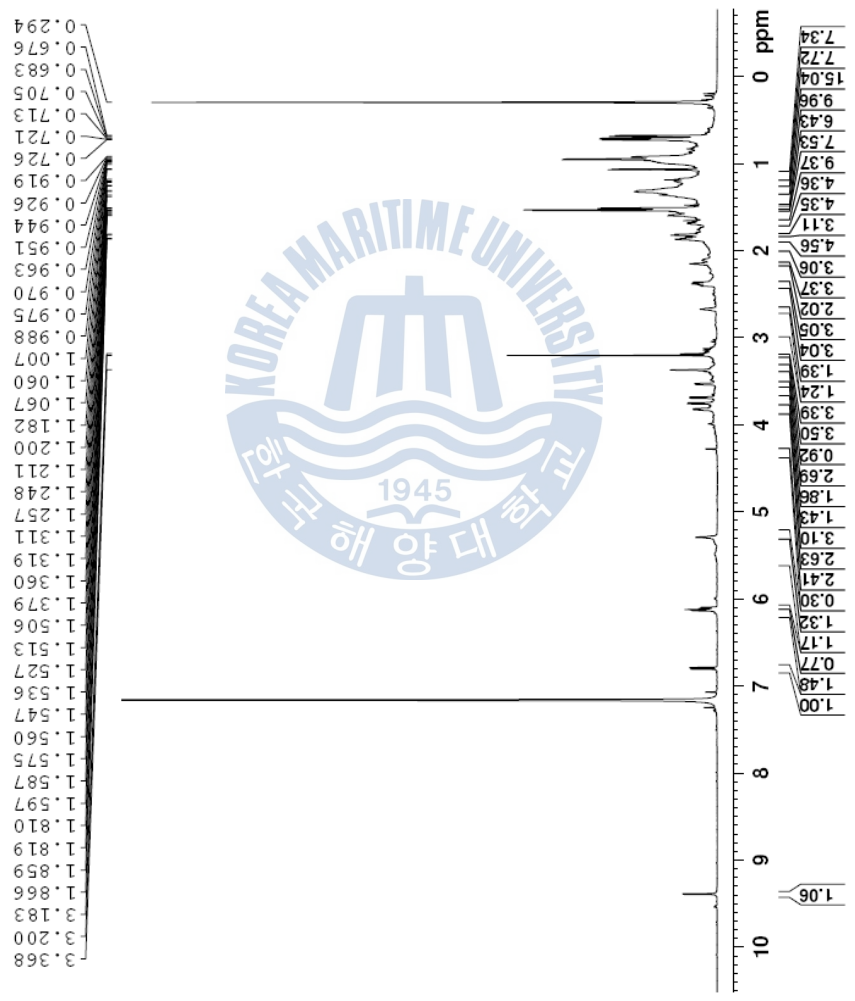


1H of KMU-LH-1 in C6D6

```

NAME      0713_kmu_ajw
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20100713
Time      16.45
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPTCI LH-
PULPROG   zg30
TD         65536
SOLVENT   C6D6
NS         16
DS         4
SWH        10162.602 Hz
FIDRES     0.1155069 Hz
AQ         3.2244213 sec
RG         327.5
DM         49.200 usec
DE         65.00
TE         283.0 K
D1         1.00000000 Sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         9.00 usec
PL1        -1.60 dB
PL1W       13.43388844 W
SFO1       900.2344866 MHz
SI         32768
SF         900.2301014 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
  
```



¹H NMR spectrum of Spirodienal D (900MHz, C₆D₆)

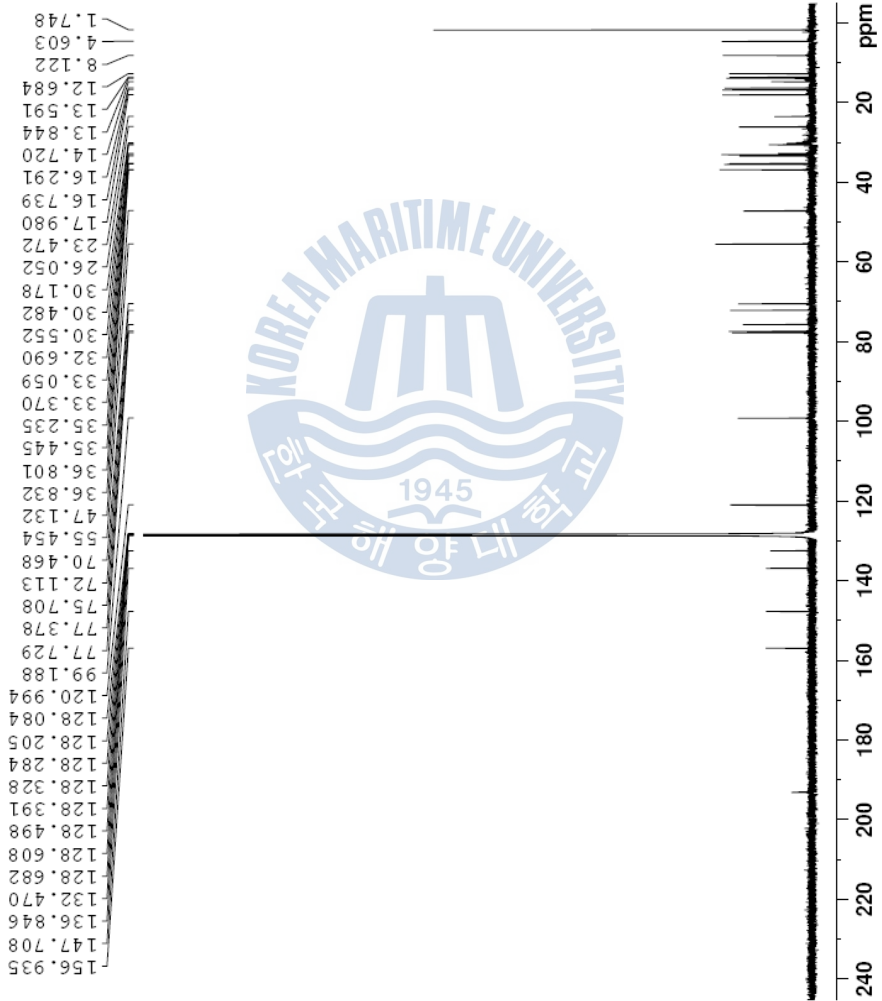
¹³C of KMU-LH-1 in C6D6

```

NAME          0713_kmu_a_jw
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20100713
Time          17.01
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm CPIC1 LH-
PULPROG       zgpg30
TD            65536
SOLVENT       C6D6
NS            872
DS            4
SWH           56818.184 Hz
FIDRES        0.966377 Hz
AQ            0.5767868 sec
RG            2050
DW            8.800 usec
DE            20.00 usec
TE            300.2K
D1            3.0000000 sec
D11           0.05000000 sec
TD0           1

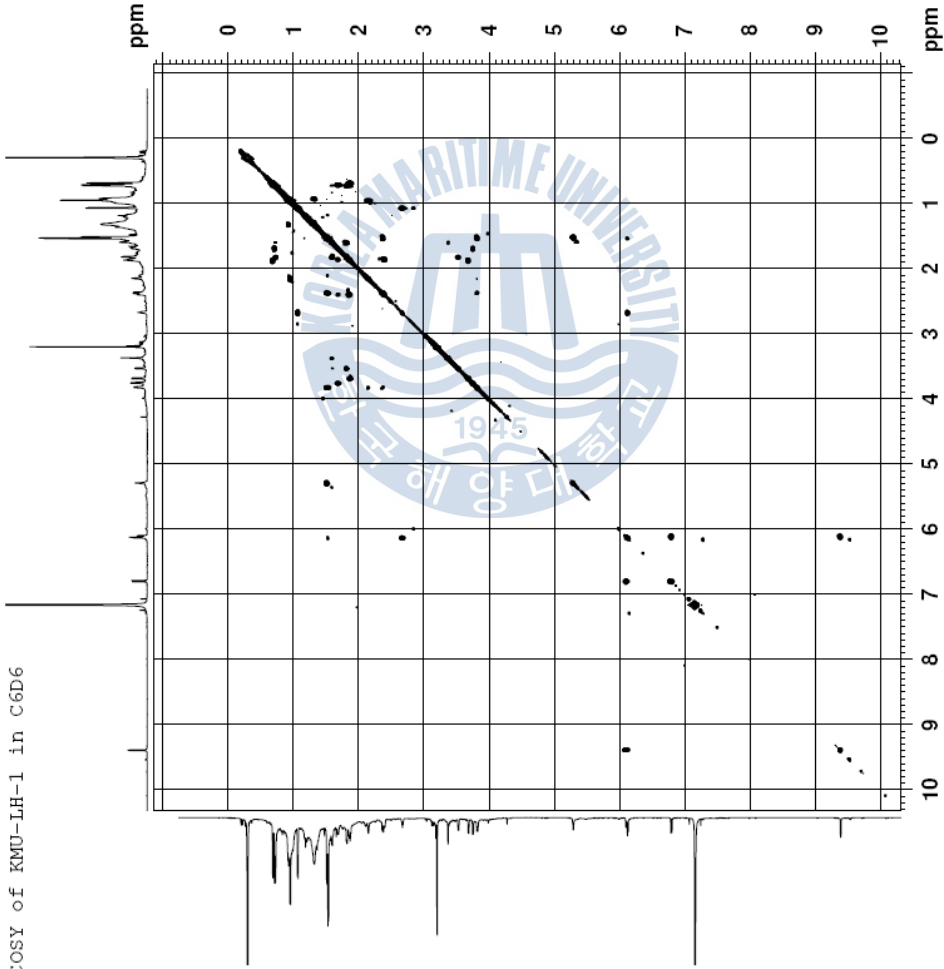
===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            11.60 usec
PL1          -1.40 dB
PL1W         110.95579529 W
SFO1         226.3901776 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2       waltz16
NUC2          1H
PCPD2        80.00 usec
PL2          -1.60 dB
PL12         17.38 dB
PL13         17.00 dB
PL2W         13.43388844 W
PL12W        0.17002265 W
PL13W        0.18543927 W
SFO2         900.2336009 MHz
SI           65536
SF           226.3628824 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40
  
```



¹³C NMR spectrum of Spirodienal D (200MHz, C₆D₆)

COSY of KMU-LH-1 in C6D6



```

NAME          0713_kmu_a1w
EXPNO         11
PROCNO        1
F2 -         20110711
F3 -         1713
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm CPTCI-LH-
PULPROG       cosygpscf
TD            2048
SOLVENT       C6D6
NS            2
DS            16
SWH           10330.578 Hz
AQ           0.094173 Hz
RG           64
DW           48.400 usec
DE           6.00 usec
TE           298.0 K
D0           0.00000300 sec
D1           1.50000000 sec
D13          0.00000400 sec
D18          0.00020000 sec
IR0          0.00009680 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P0           9.00 usec
P1           9.00 usec
PL1          -1.60 dB
PL1W         13.43388844 W
SFO1         900.2342311 MHz

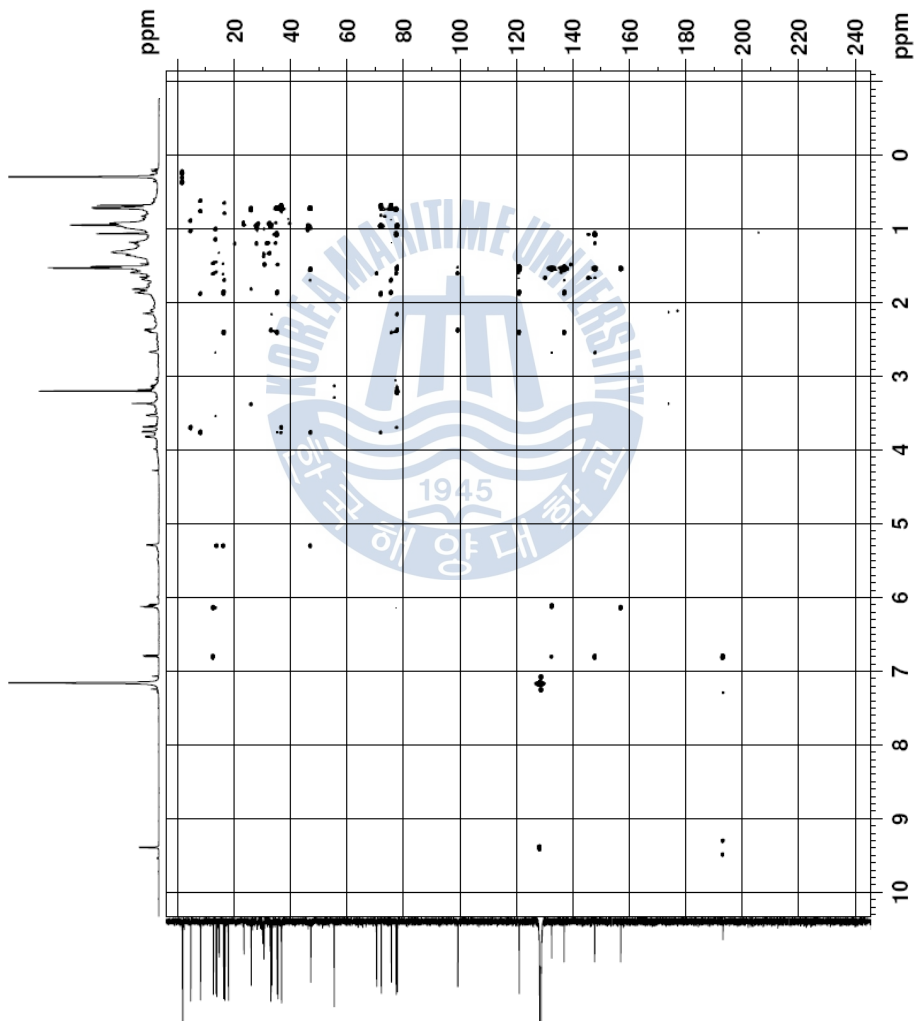
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNM1        SINE 10.00
GZL1         1000.00 usec
ND0          1
TD           400
SFO1         900.2342 MHz
FIDRES       25.826370 Hz
SW           11.475 ppm
F2MODE       2D
SF           900.2301034 MHz
RG           64
KRMW         QSINE
LB           0.00 Hz
GB           0
PC           1.00
SI           1024
MC2          CF
SFO1         900.2301034 MHz
RG           64
KRMW         QSINE
LB           0.00 Hz
GB           0
  
```

¹H-¹H COSY spectrum of Spirodienal D (C₆D₆)

HMBC of KMU-LH-1 in C₆D₆

```

NAME      0713_kmu_lh1
PROBHD    1H
Date_     20100713
Time      20:55
PROCPRG   smc_CFGI_1H
PROGRAM    smc_CFGI_1H
PULPROG    hmczgpg1dmgf
TD         2048
SOLVENT    CDCl3
NS         6804
DS         16
SWH        1030.578 Hz
AQ         0.0993132 sec
RG         2050
DQ         48.00 usec
TE         298.0 K
TE         298.0 K
CNS12     145.000000
CNS13     0.000000
D1         2.1000000 sec
D2         0.0034828 sec
D3         0.0020000 sec
D4         0.0020000 sec
D5         0.0020000 sec
D6         0.0020000 sec
D7         0.0020000 sec
D8         0.0020000 sec
D9         0.0020000 sec
D10        0.0020000 sec
D11        0.0020000 sec
D12        0.0020000 sec
D13        0.0020000 sec
D14        0.0020000 sec
D15        0.0020000 sec
D16        0.0020000 sec
D17        0.0020000 sec
D18        0.0020000 sec
D19        0.0020000 sec
D20        0.0020000 sec
D21        0.0020000 sec
D22        0.0020000 sec
D23        0.0020000 sec
D24        0.0020000 sec
D25        0.0020000 sec
D26        0.0020000 sec
D27        0.0020000 sec
D28        0.0020000 sec
D29        0.0020000 sec
D30        0.0020000 sec
D31        0.0020000 sec
D32        0.0020000 sec
D33        0.0020000 sec
D34        0.0020000 sec
D35        0.0020000 sec
D36        0.0020000 sec
D37        0.0020000 sec
D38        0.0020000 sec
D39        0.0020000 sec
D40        0.0020000 sec
D41        0.0020000 sec
D42        0.0020000 sec
D43        0.0020000 sec
D44        0.0020000 sec
D45        0.0020000 sec
D46        0.0020000 sec
D47        0.0020000 sec
D48        0.0020000 sec
D49        0.0020000 sec
D50        0.0020000 sec
D51        0.0020000 sec
D52        0.0020000 sec
D53        0.0020000 sec
D54        0.0020000 sec
D55        0.0020000 sec
D56        0.0020000 sec
D57        0.0020000 sec
D58        0.0020000 sec
D59        0.0020000 sec
D60        0.0020000 sec
D61        0.0020000 sec
D62        0.0020000 sec
D63        0.0020000 sec
D64        0.0020000 sec
D65        0.0020000 sec
D66        0.0020000 sec
D67        0.0020000 sec
D68        0.0020000 sec
D69        0.0020000 sec
D70        0.0020000 sec
D71        0.0020000 sec
D72        0.0020000 sec
D73        0.0020000 sec
D74        0.0020000 sec
D75        0.0020000 sec
D76        0.0020000 sec
D77        0.0020000 sec
D78        0.0020000 sec
D79        0.0020000 sec
D80        0.0020000 sec
D81        0.0020000 sec
D82        0.0020000 sec
D83        0.0020000 sec
D84        0.0020000 sec
D85        0.0020000 sec
D86        0.0020000 sec
D87        0.0020000 sec
D88        0.0020000 sec
D89        0.0020000 sec
D90        0.0020000 sec
D91        0.0020000 sec
D92        0.0020000 sec
D93        0.0020000 sec
D94        0.0020000 sec
D95        0.0020000 sec
D96        0.0020000 sec
D97        0.0020000 sec
D98        0.0020000 sec
D99        0.0020000 sec
D100       0.0020000 sec
  
```



gHMBC spectrum of Spirodienal D (C₆D₆)

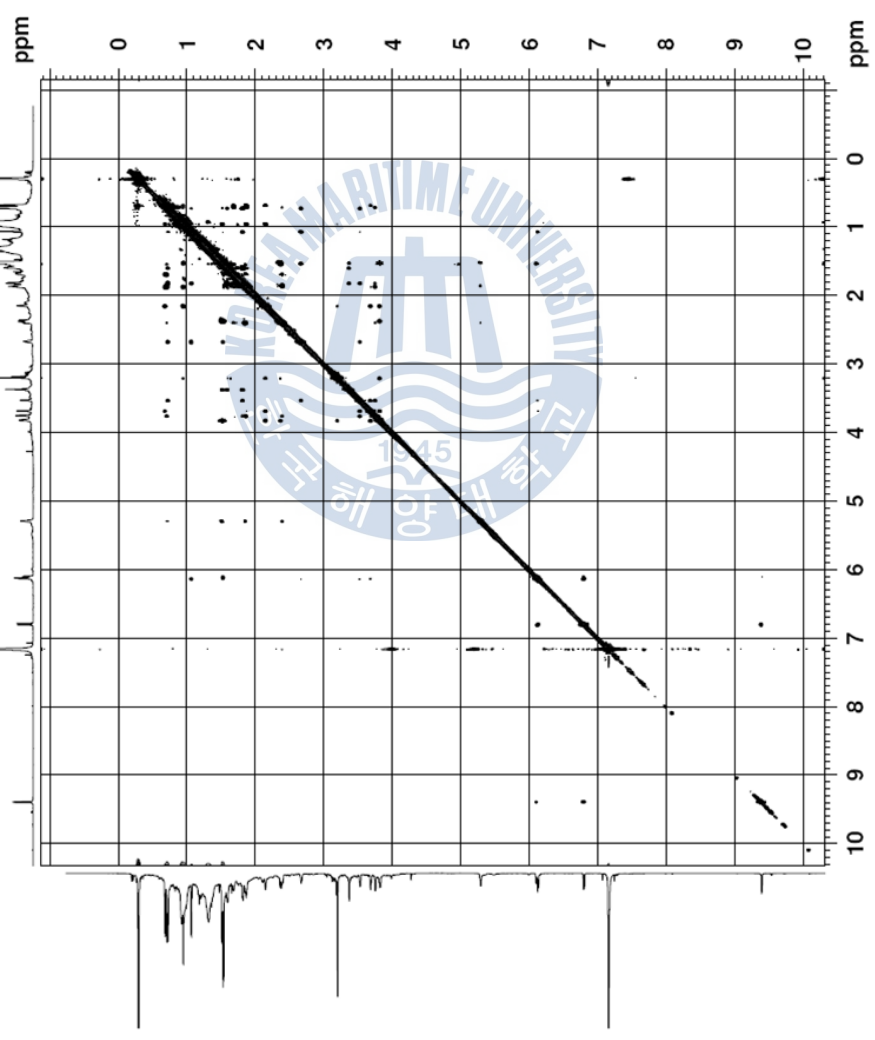
NOESY of KMU-LH-1 in C6D6

```

NAME      0713_kmu_ajw
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20100713
Time      17.54
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPIC1 IH
PULPROG   noesy3g
TD         65536
SOLVENT   C6D6
NS         8
DS         32
SWH        10330.578 HZ
FIDRES     5.044228 HZ
AQ         0.10991732 sec
RG         64
DE         48.400 usec
TE         300.2
DE         2.50 usec
RG         64
D0         0.00003604 sec
D1         2.00000000 sec
D8         0.349999999 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00009680 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         9.00 usec
P2         18.00 usec
PL1        13.4330500 dB
PL2        19.00 dB
SFO1       900.2301014 MHZ

===== CHANNEL f2 =====
GPNAM1     SINE.100
GPNAM2     SINE.100
GFZ1       40.00 %
GFZ2       -40.00 %
P16        1000.00 usec
NU0         1
ID         40
TD         65536
SFO2       900.2301014 MHZ
FIDRES     25.826370 HZ
SN         11.475 dBm
FMODE      States-IPFI
SI         2048
SF         900.2301014 MHZ
WDW        QSINE
SSB         2
LB         0.00 HZ
GB         0
PC         1.00
MC2        States-IPFI
SF         900.2301014 MHZ
WDW        QSINE
SSB         2
LB         0.00 HZ
GB         0
    
```



NOESY spectrum of Spirodienal D (C₆D₆)

Data File: D:\WESI 기기지원 Data\20101119\WKMU_LH_1.lcd

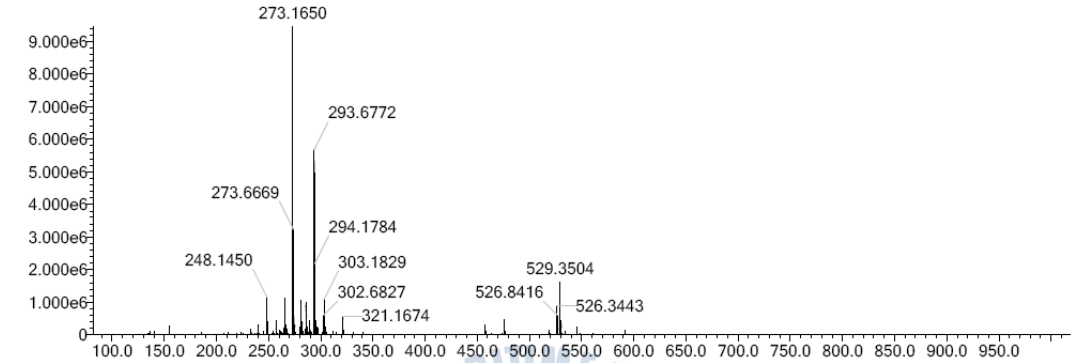
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	300	O	2	0	12	Na
C	4	0	150					
N	3	0	0					

Error Margin (ppm): 10
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: all
 MSn Iso RI (%): 75.00

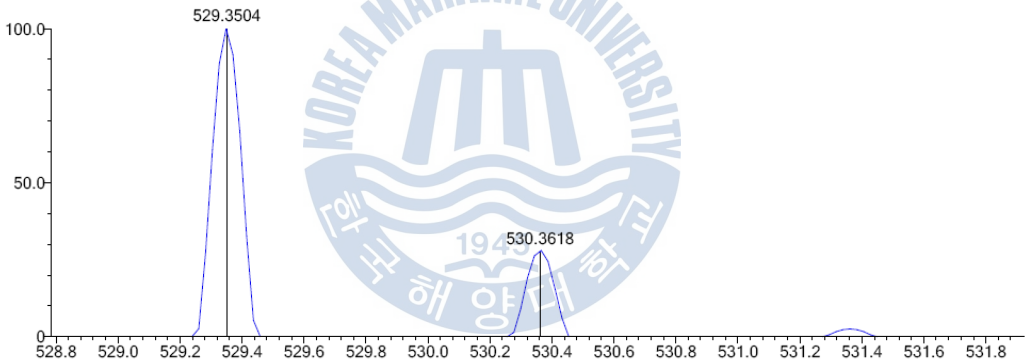
DBE Range: not fixed
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: no
 Isotope Res: 10000
 Max Results: 10

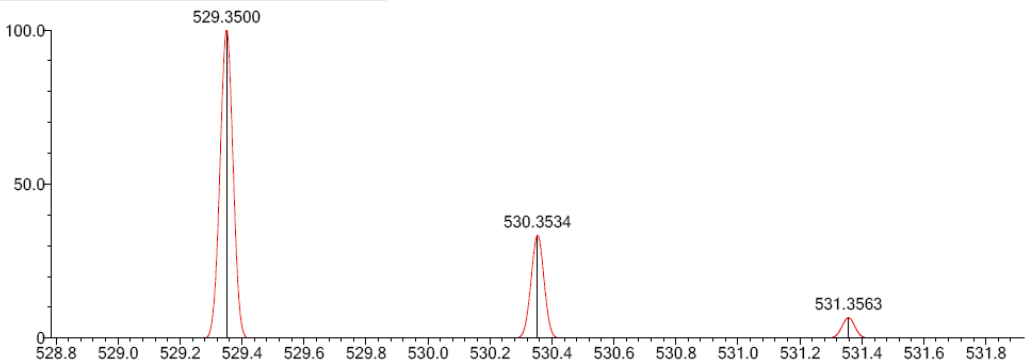
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 1.855 Scan# : 191



Measured region for 529.3504 m/z

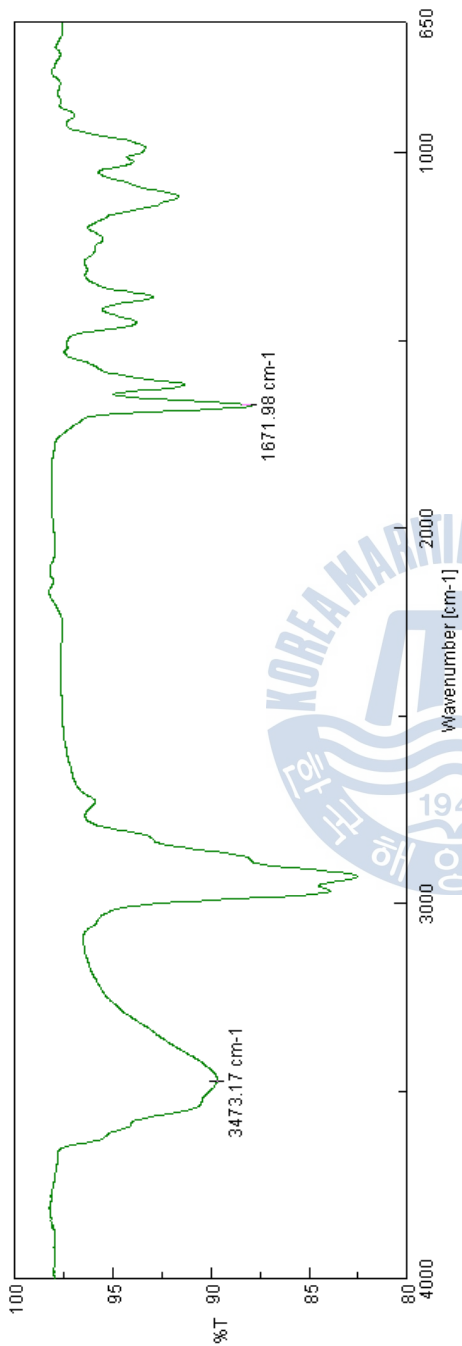


C30 H50 O6 [M+Na]⁺ : Predicted region for 529.3500 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	66.11	C30 H50 O6	[M+Na] ⁺	529.3504	529.3500	0.4	0.76	66.11	6.0

HR-ESI-MS data of Spirodienal D



[Comments]

Sample name

Comment

User

Division 한국해양대학교

Company

[Detailed Information]

Creation date 2010-11-03 오후 10:54

Data array type Linear data array

Horizontal axis Wavenumber [cm-1]

Vertical axis %T

Start 599.753 cm-1

End 4000.6 cm-1

Data interval 0.964233 cm-1

Data points 3528

[Measurement Information]

Model Name FT/IR-4100typeA

Serial Number B136961016

Light Source Standard

Detector TCS

Accumulation 16

Resolution 4 cm-1

Zero Filling On

Apodization Cosine

Gain Auto (1)

Aperture Auto (7.1 mm)

Scanning Speed Auto (2 mm/sec)

Filter Auto (30000 Hz)

[spi D 0]화신.ims


IR spectrum of Spirodienal D

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : AHN, Jong-Woong
Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University
1 Dongsam-dong, Youngdo-gu, Busan 606-791
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Sorangium cellulosum</i> KM0141	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: KCTC 11426BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: [x] a scientific description [] a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on November 18, 2008.	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority of authorized official(s):  OH, Hee-Mock, Director Date: November 21, 2008

Deposit certification of KM0141

감사의 글

어느새 시간이 흘러 벌써 저도 졸업을 하게 되었습니다. 아쉬움도 많이 남지만 배운 것도 많기에 앞으로 더 나아가려 합니다.

항상 가족처럼 해주시고, 많은 가르침을 주신 안종웅 교수님께 감사드립니다. 그리고 이번 심사위원을 맡아주신 한국화학연구원의 손종찬 박사님과 공과대학의 고성철 교수님께 감사드리고, 지난 6년 동안 많은 가르침을 주신 해양환경·생명과학부 교수님들께도 감사드립니다. 응용미생물학연구실에 있으면서 항상 든든했던 선배님들과 친구들, 그리고 후배들에게도 감사의 인사를 전합니다. 항상 묵묵히 저를 응원해주셨던 부모님과 가족들에게도 감사합니다.

아직도 많이 부족하지만, 그동안 느꼈던 고마운 마음 잊지 않고 살아가도록 하겠습니다. 좀 더 넓은 세상으로 나간다는 마음에 조금은 걱정스럽기도 하지만 꾸준히 노력하여 부끄럽지 않은 사람이 되겠습니다.