

이학석사 학위논문

*Archangium gephyra*가 생산하는
Diketopiperazine 화합물

Diketopiperazine compounds produced by
Archangium gephyra

2008년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

김 민 선

이학석사 학위논문

*Archangium gephyra*가 생산하는
Diketopiperazine 화합물

Diketopiperazine compounds produced by
Archangium gephyra

지도교수 안 종 응

2008년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

김 민 선

본 논문을 김민선의 이학석사 학위논문으로 인준함.

위원장 공학박사 손 병 일 인

위 원 이학박사 김 영 섭 인

위 원 농학박사 안 중 응 인

2007년 11월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

목 차

	page
LIST OF TABLES.....	i
LIST OF FIGURES.....	ii
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	v
ABSTRACT	1
I. 서론.....	3
II. 실험 재료 및 방법	9
1. 실험 재료.....	9
1.1 시약.....	9
1.2 기기.....	10
1.3 용매.....	11
1.4 시험균.....	11
1.5 배지조성.....	11
2. 실험 방법.....	13
2.1 용균성 점액세균의 분리 및 배양.....	13
2.2 대사산물의 추출 및 분리 정제.....	17
2.3 생물활성측정.....	21
III. 결과 및 고찰.....	24
1. 점액세균의 분리.....	24

1.1 점액세균의 배양과 대사산물의 스크리닝.....	28
2. 균주 KM593의 분류와 동정	32
3. <i>Archangium gephyra</i> KM593이 생산하는 활성물질의 분리	35
3.1 활성물질의 구조결정	38
3.2 분리된 화합물(1~5)의 생리활성	64
IV. 결론.....	67
V. 참고문헌.....	69
부록	76
감사의 글	

LIST OF TABLES

	page
Table 1. Composition of media.....	12
Table 2. Myxobacteria classification by Congo red staining	24
Table 3. Myxobacterial strains isolated from soil samples....	27
Table 4. Screening of myxobacteria for antimicrobial substance.....	29
Table 5. Physico-chemical properties of compound 1.....	38
Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 1	39
Table 7. Physico-chemical properties of compound 2.....	44
Table 8. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 2	45
Table 9. Physico-chemical properties of compound 3.....	49
Table 10. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 3	50
Table 11. Physico-chemical properties of compound 4.....	55
Table 12. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 4	56
Table 13. Physico-chemical properties of compound 5.....	60
Table 14. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 5	61
Table 15. Antioxidant activities of compounds 1 ~ 5	66

LIST OF FIGURES

	page
Fig. 1 Lifecycle of Myxobacteria.....	5
Fig. 2 Fruiting bodies of Myxobacteria.....	6
Fig. 3 Selected structure of secondary metabolites from <i>Archangium gephyra</i>	7
Fig. 4 Procedure of Gram stain	15
Fig. 5 Work-up procedure of strain KM593	18
Fig. 6 Morphological classification of myxobacteria	25
Fig. 7 Fruiting body and swarm of strain KM593 on WCX agar	33
Fig. 8 Fruiting body and swarm of strain KM593 on Vy2 agar.....	34
Fig. 9 Isolation of bioactive compounds from strain KM593	37
Fig. 10 ¹ H NMR spectrum of compound 1.....	40
Fig. 11 ¹³ C NMR spectrum of compound 1	41
Fig. 12 ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 1	42
Fig. 13 Chemical structure of compound 1	43
Fig. 14 ¹ H NMR spectrum of compound 2.....	46
Fig. 15 ¹³ C NMR spectrum of compound 2	47
Fig. 16 Chemical structure of compound 2	48

Fig. 17	^1H NMR spectrum of compound 3.....	51
Fig. 18	^{13}C NMR spectrum of compound 3	52
Fig. 19	HMBC spectrum of compound 3	53
Fig. 20	Chemical structure of compound 3	54
Fig. 21	^1H NMR spectrum of compound 4.....	58
Fig. 22	Chemical structure of compound 4	59
Fig. 23	^1H NMR spectrum of compound 5.....	62
Fig. 24	Chemical structure of compound 5	63
Fig. 25	ESIMS of compound 1	77
Fig. 26	HR-ESIMS of compound 1	78
Fig. 27	HMQC spectrum of compound 1	79
Fig. 28	EIMS of compound 2	80
Fig. 29	ESIMS of compound 3	81
Fig. 30	HR-ESIMS of compound 3	82
Fig. 31	IR Spectrum of compound 3	83
Fig. 32	^1H - ^1H COSY spectrum of compound 3	84
Fig. 33	ESIMS of compound 4	85
Fig. 34	HR-ESIMS of compound 4	86
Fig. 35	IR Spectrum of compound 4	87
Fig. 36	DEPT spectrum of compound 4.....	88

Fig. 37 ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 4	89
Fig. 38 ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 5	90

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

$[a]_D$	specific optical rotation
br	broad
c	Concentration
CH_2Cl_2	Dichloromethane
cm^{-1}	Wave number
^{13}C -NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	Correlated spectroscopy
d	doublet
dd	double doublet
δ	Chemical shift
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethylsulfoxide
ESI-MS	Electron spray ionization mass spectrometry
EtOAc	Ethyl Acetate
Ext.	Extract
Fr.	Fraction
Hept.	Heptane
^1H -NMR	Proton nuclear magnetic resonance
HMBC	Heteronuclear multi-bond connectivity
HMQC	Heteronuclear multi-quantum connectivity
HPLC	High pressure liquid chromatography
HR-ESI-MS	High resolution electron spray ionization mass spectrometry
IR	Infra-red spectroscopy
m	multiplet
MeOH	Methyl Alcohol
m/z	Mass-to-charge-ratio
q	quartet
RP-18	Reverse-phased C-18
RPM	revolution per minute
s	singlet
t	triplet
TLC	Thin layer chromatography
R_f	Retention factor
ν_{max}	Maximum frequency

Diketopiperazine compounds produced by *Archangium gephyra*

Min-Sun Kim

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

(Advisor : Professor Jong-Woong Ahn)

ABSTRACT

Myxobacteria are very remarkable microorganisms which are usually not obtained by standard isolation technique. These organisms form characteristic fruiting bodies which are not produced by other bacteria. Although not much is known about the basic physiology and biochemistry of these bacteria. They have proved to produce a variety of bioactive substances. A great portion of these substances inhibit antifungal or cytotoxic properties.

In the course of screening for new bioactive substances from myxobacteria, strain KM593 was found to produce closely related

diketopiperazines(cyclic dipeptides). The strain was identified as *Archangium gephyra* by morphological characteristics and staining with Congo red.

The isolation of diketopiperazines was performed through several steps including silica gel, RP 18, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC. The chemical structures of these compounds were established on basis of their 1-D and 2-D NMR spectroscopic analyses and by comparison with reference data from literature. They were assigned as Cyclo(L-Pro-L-Tyr), Cyclo(L-Pro-L-Phe), Cyclo(D-Pro-L-Tyr), Cyclo(L-Pro-L-Leu), Cyclo(L-Pro-D-Val), respectively.

Antioxidant activities of these compounds were investigated. In particular, Cyclo(L-Pro-L-Tyr) showed higher antioxidant activity than Trolox in terms of ORAC values.

Diketopiperazines are most commonly isolated from terrestrial yeasts, lichens and fungal culture filtrates and are also observed in the culture broth of marine bacteria and marine actinomycetes. This is the first report that diketopiperazines were produced by myxobacteria.

Keywords : Myxobacteria, diketopiperazines, *Archangium gephyra*, antioxidant activity

I. 서 론

예로부터 천연물의 탐색과 이용은 식물·미생물이 그 주를 이루었다. 특히 미생물은 종 다양성과 독특하고 흥미로운 생리활성물질의 생산, 세대기간이 짧고 대량생산이 용이하다는 이점으로 많은 과학자들의 연구 대상이 되어왔다.

미생물 기원의 항생물질은 15,000여종의 방선균이 70%, 진균류 20%, 나머지가 *Bacillus* 및 *Pseudomonas* 등의 세균류에서 분리되었고 의약품이나 동물용 약품으로 실용화 된 경우가 다수 보고되고 있다. 미생물을 이용한 신물질 탐색연구는 현재에도 활발히 수행되고 있으며 새로운 구조의 화합물이 아직도 보고되고 있다. 그러나 대부분의 경우는 이미 알려진(known)물질의 재발견에 그치는 예가 많아 새로운 생리활성물질의 발견 가능성을 높이기 위해 신물질의 탐색과 더불어 아직 활성이 충분히 밝혀지지 않고 있는 새로운 organism의 도입이 요구되고 있다. 이런 관점에서 최근 주목받고 있는 특이적인 미생물인 Myxobacteria로부터 신규 물질을 탐색하게 되었다.¹⁾

점액세균(Myxobacteria)은 일반적으로 활주운동(gliding behavior)과 자실체 형성(fruiting body formation)의 세균과 진균의 독특한 특징을 모두 지닌 절대 호기성인 Gram 음성의 세균으로 폭은 0.6~1.2 μ m, 길이는 대략 3~15 μ m의 간균이다. 절대 호기성균이지만 성장속도가 느려서 산소 요구량이 많지 않다. 서식처는 토양(약간의 알칼리, pH 5~8사이), 초식동물의 분변과 식물의 고사부위나 껍질 등에서 발견 가능하다. 최적생육온도는 30 $^{\circ}$ C이고 사막, 남극해, 고산지대, 고염지대 및 바다에서도 발견되는 등 다양한 서식 범위를 나타내고 있다. Proteobacteria δ 그룹에 속하며 현재 12속 40여종이 알려져 있다.²⁾

이들의 특징에 대해 살펴보면 첫째, 세균들이 붙을 수 있는 고체의 표면,

일정 이상의 세균의 밀도($10^5 \sim 10^7$), 이용 가능한 영양분의 결핍 이 3가지 조건이 충족 되었을 때 자실체를 형성한다. 각각의 세포들은 이 자실체 구조물 안에서 구형 또는 타원형의 포자로 변형된다. 자실체의 크기는 10~1,000 μm 로 가끔 육안으로도 확인 가능한 색과 모양을 갖는다.

둘째, 군집생활을 영위한다. 점액세균이 개별적으로 생활할 경우에는 각 개체가 분비하는 가수분해효소와 항생물질들이 큰 효과를 나타내지 못하지만 군집으로 존재할 경우, 군집 주변에 이들이 내어놓는 가수분해효소 및 항생물질의 농도가 높아져, 접근하는 다른 미생물들을 죽이거나 주변에 존재하는 유기물질을 쉽게 녹여 그 영양분을 섭취할 수 있기 때문에 군집을 유지하는 것으로 추정되고 있다.

셋째, 활주운동을 한다. 활주운동은 얇은 세균의 막이 고체표면에 넓게 퍼진 특유의 형태를 보여준다. 이와 같은 행동으로 먹이를 찾아 이동하면서 여러 가수 분해 효소들과 이차대사산물을 분비하며 또한 이 특징 때문에 점액세균은 일반적인 세균 배양법으로는 분리되지 않는다.

이런 여러 가지의 특징으로 점액세균은 그들만의 독특한 생활사(lifecycle)를 가지게 된다. 처음에는 영양세포(myxospore)의 형태로 번식을 하다가 영양분이 결핍이 되면 서서히 모여(aggregate) 더미(mound)를 형성한다.

이것이 시간이 지나면 점액세균 특유의 분류의 Key가 되는 자실체를 형성하게 되는 것이다(Fig. 1, 2).³⁻⁵⁾

점액세균은 점액을 생산해 고체 배지에서 움직임이 가능하지만 반면에 곰팡이나 토양 아메바로 쉽게 오염될 수 있기에 이들을 분리하는데 있어서 특별한 기술을 필요로 한다. 이들의 분리는 점액세균의 활주 이동하는 특성과 다른 미생물을 공격하거나 또는 Cellulose를 분해하는 특성을 이용해야 한다. 따라서 용균성 점액세균(Bacteriolytic Myxobacteria)은 대장균이 넓게 깔린 한천배지를 이용하고, 세루로오스 용해성 점액세균(Cellulolytic Myxo

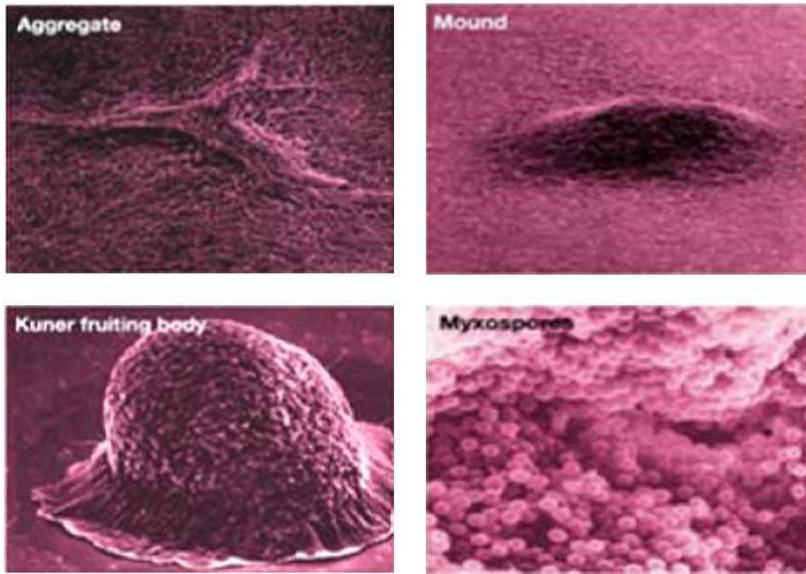


Fig. 1. Lifecycle of Myxobacteria.

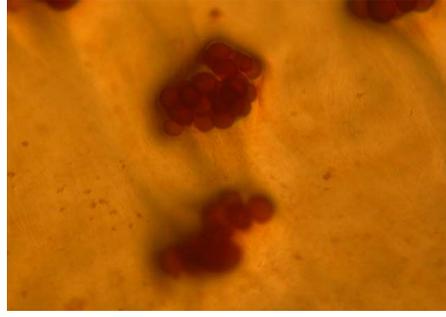
bacteria: Sorangium속)은 KNO_3 만을 함유한 무기염 한천배지위에 여과지를 두고 시료를 접종하여 분리한다.

이렇게 독특한 점액세균은 자연계로부터 분리가 까다롭고 대량배양이 어려워 지금까지는 적극적으로 연구가 되지 않았으며 분리법조차 정립되지 않은⁶⁾ 상대적으로 미개척 분야라는 장점으로 인해 연구자들의 주목을 끌고 있는 것이다.

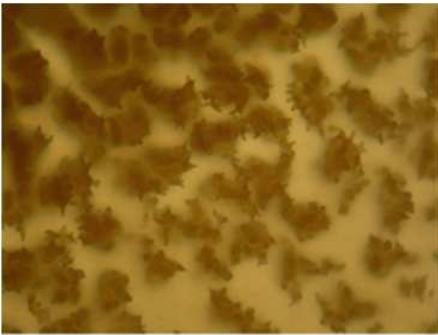
Genome size가 일반 세균보다 큰 점액세균의 장점은 다양한 화합물 생합성 능력을 가져 새로운 생리활성물질 탐색에 대한 가능성을 더욱 높여준다. 점액세균 유래 생리활성물질은 여러 가지 antibiotics를 생산하는데, 이들은 50개의 기본구조를 가지며 이 중 3개를 제외한 나머지 47개의 구조가 점액세균에서 발견되었고 한 종이 여러 가지의 antibiotic을 생산하며 myxobacteria중 55% 이상이 생리활성물질 분비한다. 현재까지 약 100여개의 다른 기본 골격의 화합물과 거의 500개의 다양한 대사산물이 점액세균으로부터 분리되었다.⁶⁻¹⁰⁾



Myxococcus type



Cystobacter type



Corallocooccus type



Archangium type



Nannocystis type



Stigmatella type

Fig. 2. Fruiting bodies of Myxobacteria.

용균성 점액세균의 한 속인 *Archangium*은 다른 용균성 점액세균과는 다른 그들만의 독특한 자실체를 가진다. 이들의 자실체는 고체성 점액과 myxospore 더미로 다른 포자들과 구분된다. 구불구불한 용기, 장 모양의 꼬임, 소용돌이형 말림의 특징과 마디가 있는 표면, 때론 손가락 모양의 돌기를 관찰할 수 있는 점액세균이다. 균체 색은 옅은 오렌지에서 갈색으로 다양하며 심지어 보라색이 발견되었다는 연구보고도 있다. 이런 *Archangium*속은 현재 오직 한 종인 *Archangium gephyra*만이 인정되고 있다.¹¹⁾

Archangium 유래의 생리활성물질로는 1995년 발견된 진핵생물 단백질 저해 물질인 gephyronic acid¹²⁾가 있다. 또한 tubilin에 대해 저해 작용을 나타내서 1시간 안에 microtubule을 완전히 붕괴시키는 tubulytin¹³⁾과 최근 새로운 specific V-ATPase inhibitor로서의 기능으로 주목 받고 있는

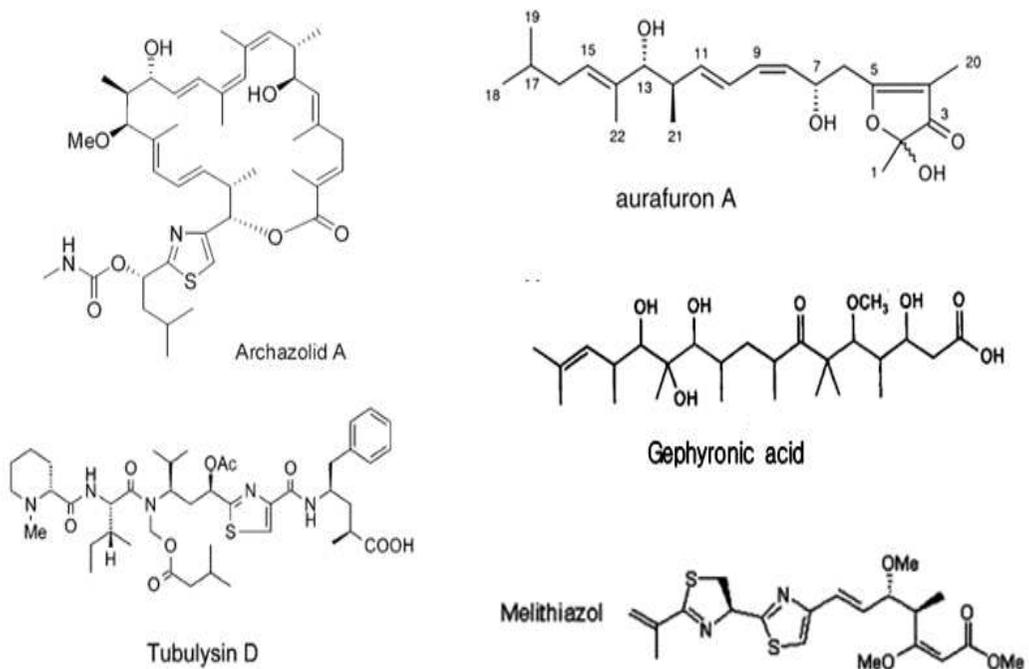


Fig. 3. Selected structures of secondary metabolites from *Archangium gephyra*.

cytotoxic macrolactone인 archazolid¹⁴⁻¹⁶⁾가 있다. 원핵생물 단백질 합성 저해제인 myxovalargin¹⁷⁾, 높은 세포 독성의 vioprolid²⁾, 그 외 aurafuron^{14,18)}, melithiazol¹⁹⁾, argyirin²⁰⁾, germacran²¹⁾등이 Archangium에서 분리 되었다(Fig. 3).

아직 미개척 분야가 더 많은 이 점액세균의 이차대사산물이 타 미생물로부터 전혀 보고된 적이 없는 특유물질임이 밝혀져 더욱 흥미롭다.²²⁾

따라서 본 연구에서는 현재 생리활성 물질의 새로운 자원으로 부각되고 있는 용균성 점액세균을 대상으로 그들의 분리법을 확립하였고 분리된 균주들을 화학적·생물학적 스크리닝을 통해 높은 활성을 지닌 균주를 선정하였다.

선정된 균주는 배양을 통해 대사산물로부터 활성의 본체를 찾아 그 구조와 활성에 대하여 연구하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1 시약

Agar, EP (JUNSEI)

Baker's Yeast, CP (BRUGGEMAN)

Beef Extract, EP (DIFCO)

CaCl₂×2H₂O, EP (JUNSEI)

Casitone EP (DIFCO)

Congo-red EP (SIGMA)

Ciprofloxacin (한국화학연구원으로부터 분양)

Cyanocobalamine, EP (ACROS)

Dextrose, EP (YAKURI)

Dimethylsulfoxide, GR (JUNSEI)

HEPES, EP (J.T.BAKER)

Malt Extract, EP (DIFCO)

MgSO₄×7H₂O, EP (JUNSEI)

Peptone, EP (MERCK)

Tryptone, EP (DIFCO)

Yeast Extract, EP (DIFCO)

XAD-16, mesh 20.00~60.00 (Rohm& Haas)

Glucose (JUNSEI)

1.2 기기

실험에 사용된 기기는 다음과 같다.

Instruments

Autoclave		SJ-220A45(SEJONG)
B.O.D incubator		SJ-250B (SEJONG)
Clean bench		SJ-701S2(SEJONG)
Electronic balance		SHIMADZU BL220H (SHIMADZU)
pH meter		Orion 420A(Orion)
Rotavapor		BUCHI R-200(BUCHI)
Shaking incubator		SJ-808M2 (DONGWON/SEJONG)
Shaking waterbath(circulator)		Mono-TECH ENG CO MSB-1511D
Vacuum pump		ULVAC G-50SA
UV/Visible spectrophotometer		CM-10 Spectroline(MODEL ENF-240C)
Microscope		OLYMPUS SZ11
Centrifuge		Supra22K(Hanil)
MPLC	Instrument	YFLC-5404 (Yamazen)
	Detector	Prep. UV-10V (Yamazen)
	Pump	540 (Yamazen)
HPLC	Instrument	Simadzu liquid chromatography LC-10
	Detector	Diode array detector (SPD-M10Avp, SHIMADZU)
	Pump	LC-6AD (SHIMADZU)
	Degasser	DGV-14A (SHIMADZU)
	Program	CLASS-VP ver.6.14 sp1
Polarimeter		Perkin-Elmer(U.S.A.) 341
FT-IR		Perkin-Elmer(U.S.A.),Spectrum GX
ESI-MS		Mariner, Perseptive Biosystem(USA)
EI-MS		Varian 1200
NMR		Varian NMR 300, Varian NMR 500 JEOL(Japan)JNM ECP-400

1.3 용매

추출 및 분획용 용매로 쓰인 Acetone, EtOAc, n-Heptane, MeOH, CH₂Cl₂, 2-Propanol(2-PrOH)은 Extra Pure급 용매(DUKSAN)를 사용하였고 TLC 및 column용 용매는 Extra Pure급 용매(DUKSAN)를 재증류하여 사용하였다.

1.4 시험균

항균활성 측정에 사용된 균주는 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양받아서 사용하였으며 균주의 종류는 다음과 같다.

Test organisms

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

1.5 배지조성^{10,23)}

실험에 사용된 배지는 Nutrient agar, WCX Agar, Vy2 Agar, standard MD1 liquid, YM agar, MM agar가 있으며 보관용으로 CAS liquid배지를 사용하였다(Table 1).

Table 1. Composition of media

Nutrient agar	Tryptone 1% Yeast extract 0.5% NaCl 1% Glucose 0.1 Agar 1.5% pH 7.2
WCX agar	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1% Agar 1.5% Cycloheximide 5mg/L pH7.2
CAS liquid	Casitone 1% MgSO ₄ ×7H ₂ O 0.1% DMSO 5%
Vy2 agar	Baker's yeast 0.5% CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1% Agar 1.5% Cyanocobalamin: 0.5mg/L pH 7.2
standard MD1 liquid	Casitone 0.3% CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.07% MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2% HEPES 0.1% Cyanocobalamin: 0.5mg/L pH7.2
YM agar	Yeast extract 0.3% Malt extract 0.3% Peptone 0.5% Glucose 1% Agar 1.5% pH 7.2
MM agar	Peptone 0.5% Yeast extract 0.3% Beef extract 0.15% Glucose 0.1% Agar 1.5% pH 7.4

2. 실험 방법

2.1 용균성 점액세균의 분리 및 배양

1) 용균성 점액세균의 분리와 동정

(1) 시료 채집

국내 토양 유래의 점액세균을 분리하기 위해 부산 영도 및 금정산, 충청북도 옥천 및 대전, 충청남도 김천, 경기도 안산 및 용인, 강원도 속초, 제주도 토양을 약 일주일간 흔들어 말리고 서늘한 곳에서 충분히 건조해 곰팡이의 증식을 억제하였다.

(2) 먹이균의 배양

냉장 보관되어있는 *E.coli* (KCTC 120006)를 streaking하여, 30°C, 24시간 incubator에서 활성화 시켰다. 'L' 튜브에 Nutrient liquid 배지를 10 ml 넣어 멸균한 후, 활성화 시켜둔 *E.coli*를 접종해 shaking water bath에서 30°C, 16시간 배양하였다. 1 L의 Nutrient liquid배지가 들어있는 2 L 삼각플라스크에, overnight시킨 *E.coli*를 10ml(0.1% seed culture) 접종하고 30°C, shaking incubator에서 16시간 배양하였다.

이 배양액을 4°C, 10000×G, 20분 동안 원심 분리하여 균체를 모은 다음 0.2% NaCl로 2회 세척한 후 냉장보관 하였다.

(3) 토양시료 처리

멸균된 vial에 먹이균 *E.coli*을 넣은 다음 WCX agar 배지에 처리하였다. WCX agar 배지 위에 미리 조제된 먹이균(*E.coli*)의 희석액을 100µl씩 원형으로 올려 4 개의 circular patch를 만들었다. *E.coli* patch가 마르면 그 위에 시료 흙을 patch 위에 올린 후, 배양하였다. 이때 시료 흙은 *E.coli* patch 상에서 흩어지지 않도록 미리 멸균 증류수를 3~4방울 첨가해 덩어리

(직경0.5cm)지게 하였다.

(4) 점액세균의 분리 및 순화

시료로부터 먹이균을 먹으며 뺀어 나온 점액세균을 위와 동일한 circular patch에 옮겨 순화하였다. 순화정도에 따라 멸균된 먹이균(멸균된 *E.coli*)으로 만든 circular patch를 거쳐 최종적으로 Vy2 배지로 옮겼다.

(5) 분리균주의 보관

제조된 CAS liquid 배지가 들어있는 Nunc tube에 보관할 점액세균을 1loop씩 넣고 액체질소에 보관하였다.

(6) 그람 염색(Gram stain)

증류수를 1~2방울 떨어뜨린 슬라이드 글라스에 미리 활성화 시켜둔 균체를 골고루 분산시켜 건조가 지나쳐 태우거나 충분하지 못해 고정이 잘 안 되는 경우가 없도록 주의하며 화염고정 시켰다. crystal violet과 phenol이 섞인 염색제 용매를 1~2방울 떨어뜨려 세균을 1분간 염색하였다. PVP-IOD+KI인 매염제 용액을 1~2방울 떨어Em려 1분 간 반응시킨 후, 증류수로 5초간 세척하였다. 이어 ethanol+propanol로 약 15초간 탈색시킨 후, 증류수로 5초간 간접세척 하였다. 대조염색제인 safranin용액으로 1분간 염색하고 세척한 후, 물기를 제거하고 현미경으로 세포의 형태와 염색 상태를 관찰하였다(Fig. 4).

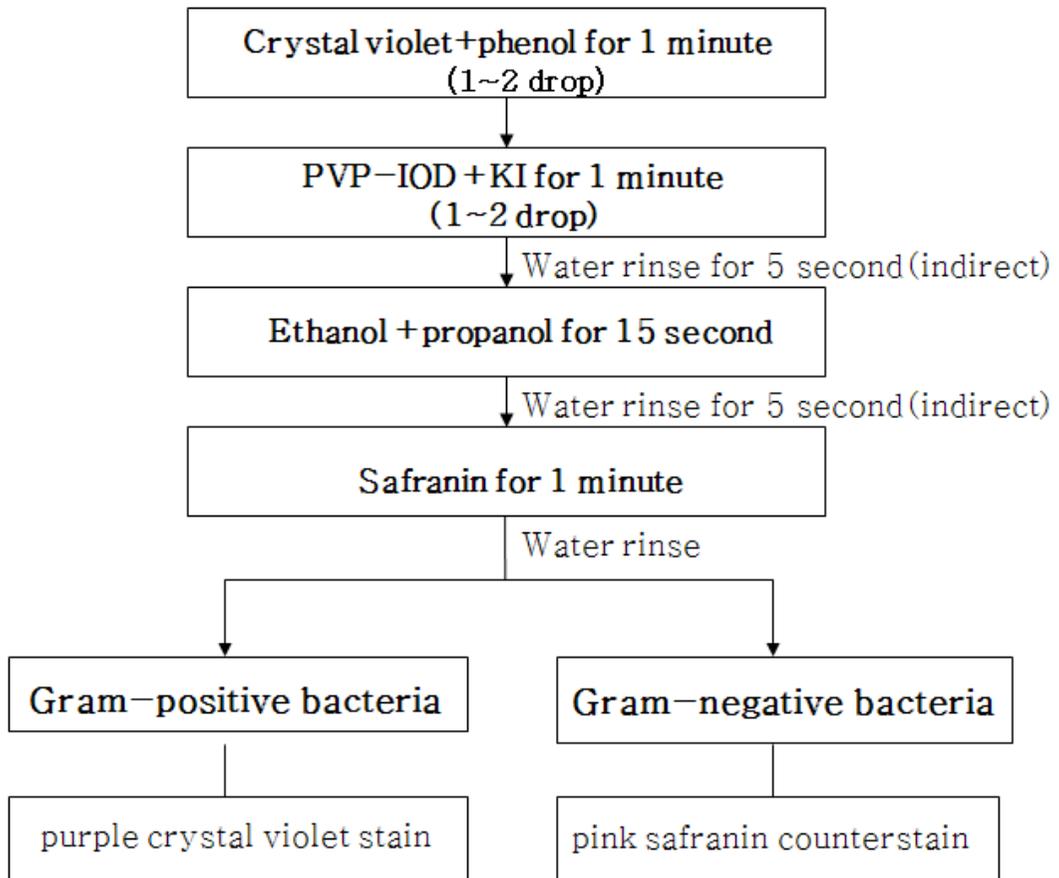


Fig. 4. Procedure of Gram stain.

(6) Congo red 염색 (Congo red stain)

Congo red 0.1g을 100ml의 증류수에 녹여 0.01% solution을 만들어 사용하였다. sample이 있는 plate에 미리 만들어 놓은 Congo red 용액을 완전히 잠길 정도로 부은 후 10분 동안 염색하여 관찰하였다.

2) 용균성 점액세균의 배양²⁴⁾

WCX agar 배지에서 순화된 점액세균을 Vy2 agar 배지의 한가운데 loading하여 증식시키면서 성장속도가 빠른 우수한 균주를 선발하여 standard MD1 liquid 배지에서 30°C에서 5-7일간 배양하였다.

균주 KM593의 액체배양은 다음과 같이 실시하였다.

① 종 배양: standard MD1 liquid 배지 50ml을 포함한 300ml삼각 플라스크를 silistopper로 마개한 후 알루미늄 호일로 덮어 autoclave하였다. autoclave된 배지를 완전히 식힌 후, cyanocobalamine 25 μ l를 syringe filter하여 첨가한 다음 미리 Vy2 agar 배지에서 배양한 종균을 2 loop접종하였다. 이때 plate상에서 동심원을 이루며 성장한 swarm의 최외각 부분을 취하여 접종하였다. shaking incubator에서 30°C, 160RPM을 유지하여 2일 간 배양하였다. 이렇게 얻은 seed는 균체 위주로 2ml씩 standard MD1 liquid 배지에 접종하여 역시 이전과 동일한 과정으로 배양되었다.

② 대량배양: 제조한 standard MD1 liquid 배지 400ml을 포함한 2 L삼각플라스크에 흡착합성수지 Amberlite XAD-16을 6g첨가하였다. 종 배양과 동일한 방법으로 silistopper로 마개하여 알루미늄호일로 덮어 autoclave한 후 식혀서 syringe filter한 cyanocobalamine 200 μ l를 넣어준 다음 종 배양 한 균체를 8ml 접종하였다. shaking incubator에서 30°C, 160RPM을 유지하여 5일 간 배양하였다.

배양이 끝난 후 배양액을 100mesh채로 걸러 XAD와 균체를 모으고 여액은 원심분리(10000 \times G, 20min, 4°C)하여 잔존하는 균체를 수확하였다.

2.2 대사산물의 추출 및 분리정제

1) 추출

sieving과 원심분리로 얻어진 균체와 XAD를 Acetone과 MeOH 1:1용매로 실온에서 6시간 동안 추출한 다음 다시 Acetone만을 사용하여 3~4차 추출하였다.

2) 분획

추출물을 rotary evaporator로 농축한 후 농축물에 물과 EtOAc를 첨가하여 물층과 EtOAc층으로 분획한 다음 EtOAc층을 anhydrous sodium sulfate로 건조시켰다. 건조된 EtOAc액을 농축한 다음 다시 MeOH에 녹인 후 여기에 n-Heptane을 첨가해 분획하여 무극성의 세포 성분을 제거하였다(Fig. 5).

3) 크로마토그래피

(1) Thin layer chromatography (TLC)

실험에 사용된 TLC plate는 silica gel F254, 20x20cm(MERCK)와 RP-18 gel F254, 20x20cm(MERCK)이었다.

전개된 TLC plate는 UV 254nm와 365nm에서 흡수를 관찰한 다음 발색시약을 처리하여 화합물의 분리 형태를 관찰하였다.

사용된 발색시약과 그 조제법은 다음과 같다.

① VS(Vanillin-sulfuric acid액)

소량의 vanillin이 첨가된 진한 sulfuric acid용액을 분무한 후 120°C로 가열하였다.

② Ninhydrin액

아미노산 검정용 시약으로 Ninhydrin 0.3g을 n-BuOH 100ml에 녹인 다음 여기에 초산 3ml을 가한 용액을 분무 후 100°C로 가열하였다.

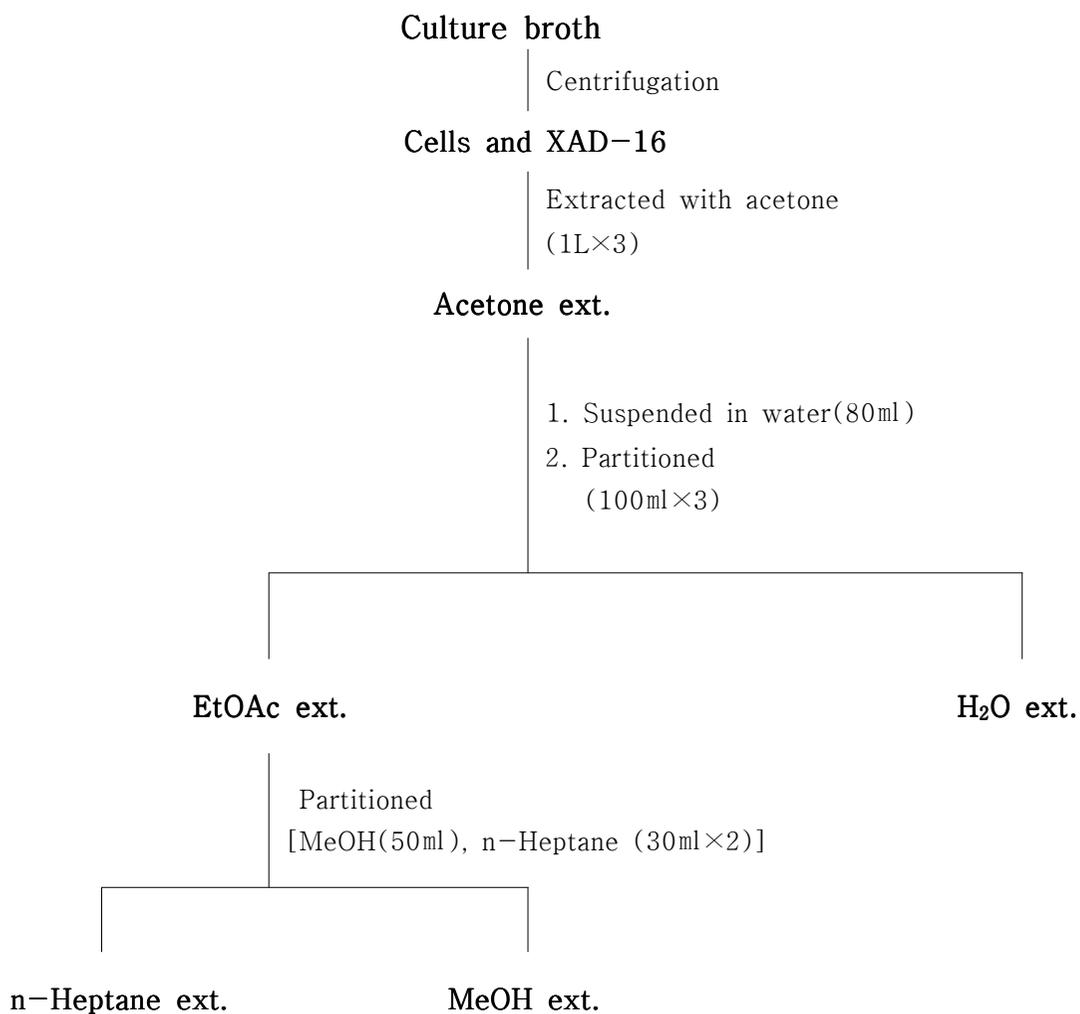


Fig. 5. Work-up procedure of strain KM593.

③ Dragendorff액

0.85g의 basic bismuth nitrate를 10ml의 빙초산이 함유된 40ml의 증류수에 녹인 후 여기에 8g의 KI를 녹인 20ml 증류수를 가한 용액을 분무하였다.

(2) Column chromatography

실험에 사용된 칼럼은 Silica gel(Silica gel 60, 40-63 μ m, MERCK)을 충전제로 사용하였으며 용매는 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, Acetone, MeOH등을 이용하였다. 역상 크로마토그래피로는 LiChroprep RP-18(40-63 μ m, MERCK)를 사용하였으며 MeOH, H₂O을 용매로 이용하였다. 이외에 필요한 경우 Sephadex LH-20(bead size 25~100 μ m, Fluka) column chromatography를 사용하였는데 이때, fraction collector(Pharmacia Biotech)와 UV detector(254nm, 2238 UVICORDS II, LKB BROMMA) 및 recorder(Pharmacia Biotech)가 장착된 Universal system을 통해 물질 분리의 속도와 효율성을 재고하였다.

(3) MPLC

Yamazen사의 MPLC를 사용하였고 pre-packed column으로 Lobar-B(240-10) (LiChroprep® Si60, 40-63 μ m, MERCK)와 Lobar-B(310-25)(LiChroprep® RP-18, 40-63 μ m, MERCK)를 사용하였다.

(4) Analytical HPLC

Analytical HPLC는 혼합물 또는 몇 개의 fraction들의 분리 조건을 정하거나 분리한 화합물의 순수도를 평가 및 기존 화합물과 동일 여부를 확인하기 위해 사용되었다. 본 실험에서 사용한 HPLC는 Diode array detector HPLC를 사용하였으며, 분석 용 칼럼은 CAPCELL PAK C18(UG120, 5

μm ; 4.6mm I.D.x250mm, SHISEIDO), YMC-Pack SIL($5\mu\text{m}$, 12nm; 4.6mm I.D.x250mm), YMC-Pack Diol-120-NP($5\mu\text{m}$, 12nm; 4.6mm I.D.x150mm)의 칼럼을 사용하였다.

(5) Semi-preparative HPLC

분취 칼럼은 CAPCELL PAK C18(UG120 Å, $5\mu\text{m}$; 10mm I.D.x250mm, SHISEIDO), YMC-Pack SIL($5\mu\text{m}$, 6nm; 10mm I.D.x250mm), YMC-Pack Diol-120-NP($5\mu\text{m}$, 12nm; 20mm I.D.x150mm)를 사용하였다.

4) 대사산물의 구조분석

비선광도는 Polarimeter(Perkin-Elmer USA 341)를 사용하여 MeOH을 용매로 측정하였다.

IR은 Perkin-Elmer(USA), Spectrum GX로 측정하였다.

분자량은 ESI-MS(Mariner, Perseptive Biosystem, USA)를 이용하여 분자량을 측정하였으며 ^1H NMR, ^{13}C NMR 및 2D NMR의 측정은 Varian NMR 300과 Varian NMR 500, JEOL(Japan) JNM ECP-400 spectrometer를 사용하였다.

2.3 생물활성측정

1) 항균활성

(1) 검정균의 순화

한국생명공학연구원 유전자은행과 경상대로부터 *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*를 구입 혹은 분양 받았다. 동결 건조된 상태로 분양받은 각 균의 앰플을 clean bench 안에서 줄칼로 중간부분에 금을 긋고 앰플 외부를 70%알코올을 적신 거즈로 잘 닦은 다음 알코올램프로 가볍게 화염 살균한 후 부러뜨렸다. 여기에 세균 현탁액을 Nutrient Agar나 YM Agar 배지에 300 μ l씩 도말하여 1일간 28 $^{\circ}$ C에서 배양하여 활성화시켰다. 활성화된 세균 일부를 streaking하여 single colony를 떼어 Nutrient Agar, YM Agar 배지에 옮겨 배양한 후 사면배지로 옮겨 냉장 보관하였다.

(2) 시료 처리

각종 점액세균의 대사산물의 EtOAc추출액을 MeOH에 녹여 10000 ppm (시료10mg/1ml용매)으로 조제하여 처리하였다. 시료 추출액을 paper disk에 injection하여 clean bench에서 건조시킨 후 기저균이 도말된 plate위에 올려 그 생장 저해도를 측정하였다.

(3) 항균활성 측정

냉장 보관된 세균을 Nutrient Agar와 YM Agar 배지에 배양하여 활성화시킨 후 Nutrient liquid와 YM liquid 배지가 10ml담긴 'L'자형 tube에 접종하였다. 이것을 shaking water bath에서 30 $^{\circ}$ C, 160RPM으로 overnight (약 16시간) 배양하여 기저균으로 사용하였다.

① Agar well method

0.8% agar를 첨가한 Nutrient agar와 YM agar 배지를 autoclave하여

45–50℃정도 식힌 후 미리 배양된 균액 0.2%를 접종한 후 고르게 섞은 다음 이것을 petri dish에 분주하여 굳힌 후, 멸균된 pasteur pipette을 이용하여 구멍을 뚫어 우물(well)을 만들고, 여기에 시료를 가득 채워 말린 후, B.O.D incubator (30℃) 에서 48시간 배양 후 inhibition zone을 vernier caliper로 측정하여 나타내었다.

② 도말법

1.5% agar를 첨가한 Nutrient agar와 YM agar 배지에 배양된 균액 100μl를 loading 한 후 도말 하였다. 여기에 6mm paper disk에 샘플 20 μl를 loading 한 후 말려서 배지 위에 올리고, B.O.D incubator (30℃) 에서 48시간 경과 후 inhibition zone을 vernier caliper로 inhibition zone의 크기를 측정하여 나타내었다.

2) ORAC assay

ORAC assay 및 value 측정은 Cao et al,^{25),26)} Ou et al²⁷⁾ 를 참고하였다.

B-PE, phosphate buffer, Sample을 15min 동안 water bath 상에서 pre-incubation 하고 75mM phosphate buffer(pH7.4), B-PE: FL (final 10uM), Sample, Radical generator(AAPH, final 50mM)가 혼합된 반응액 200ul을 37℃로 미리 평형시킨 형광분광광도계를 사용하여 형광의 감소 과정 60분 동안 2분 간격으로 관찰, 기록하였다. Vitcor31420 Multi-label counters Recording Fluoro meter(Perkin Elmer)를 사용해, 형광이 95% Loss될 때 까지 측정하였다. Reading 조건은 excitation 530±30nm(혹은 excitation 540nm, emission 565nm)이다. ORAC value의 산출은 Trolox standard curve로부터 Trolox를 standard로 사용한 기준치로부터 산출하였다.²⁶⁾

$$\text{Relative ORAC value} = \frac{(\text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{\text{Blank}})}{(\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{Blank}})} \times \frac{(\text{molarith of Trolox})}{(\text{molarity of sample})}$$

3) DPPH free radical 소거 활성

분획 및 분리된 각각의 화합물을 EtOH에 일정 농도로 녹이고 각각을 희석하여 최종적으로 100ug/ml, 50ug/ml, 10ug/ml, 5ug/ml, 1ug/ml의 5가지 농도가 되게 하여 실험하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 0.1mM이 되도록 EtOH에 용해하고, 96 well plate에 각 농도의 시료 용액 100ul와 DPPH 용액 100ul 혼합액(A), 시료용액 100ul에 EtOH 100ul만 가한 액(B), DPPH 용액 100ul와 EtOH 100ul의 혼합액(C) 및 200ul ETOH(D)를 각각 만들고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 540nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였으며 그 저해율(%)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left\{ \frac{[(C-D) - (A-B)]}{(C-D)} \right\} \times 100$$

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 점액세균의 분리

부산의 한국해양대학교 해양과학기술대학관 주변화단, 해사대학관 주변화단, 산책로와 금정산, 옥천지역의 배밭, 포도밭, 복숭아밭등 과수원 토양, 안산, 용인, 속초, 김천, 제주도 등의 여러 지역의 토양을 채집하여 *E.coli*를 먹이균으로 한 WCX Agar배지 위에 처리한 후 현미경을 통해 관찰하며 점액세균을 분리하였다.

점액세균의 분류는 Congo red 염색과 WCX agar와 Vy2 agar 배지에 서의 swarm과 자실체의 형태를 기준으로 삼았다(Table 2, Fig. 6).

Table 2. Myxobacteria classification by Congo red staining²²⁾

Congo red		
	positive	negative
Suborder	Cystobacterinaea	Sorangineae
Family	Myxococcaceae Cystobacteaceae	Poliangiaceae Nannocystaceae
Genus	<i>Myxococcus</i> <i>Archangium</i> <i>Corallooccus</i> <i>Cystobacter</i> <i>Angiococcus</i> <i>Melittangium</i> <i>Stigmatella</i>	<i>Polyangium</i> <i>Nannocystis</i> <i>Haploangium</i> <i>Chondromyces</i> <i>Sorangium</i>

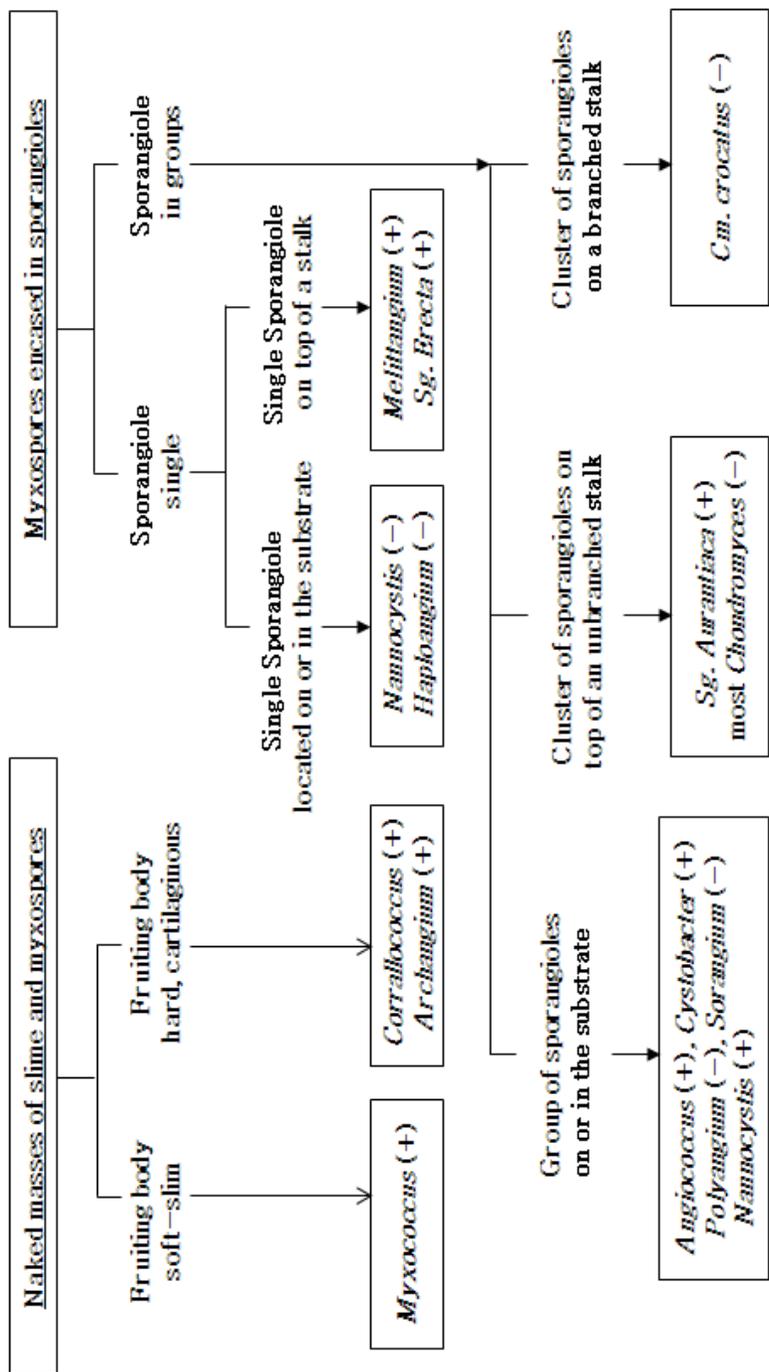


Fig. 6. Morphological classification of myxobacteria.22

분리된 점액세균은 총 245종이었으며 그 중 세루로오스 용해성 점액세균이 60종, 나머지 185종이 용균성 점액세균이었고 기타(Unspecified) 4종이었다(Table 3). 분리된 용균성 점액세균은 *Myxococcus* sp., *Corallococcus* sp., *Angiococcus* sp., *Archangium* sp., *Cystobacter* sp., *Chondromyces* sp., *Nannocystis* sp., *Polyangium* sp., *Stigmatella* sp., *Melittangium* sp.이었다. *Myxococcus* sp., *Corallococcus* sp., *Archangium* sp.이 약 78%의 비율로 분리되었고 그 중 *Archangium* sp.이 26%의 높은 비율로 분리되었다.

Table 3. Myxobacterial strains isolated from soil samples

Taxon	Number of isolated strains
<i>Myxococcus</i> sp.	43
<i>Corallococcus</i> sp.	52
<i>Angiococcus</i> sp.	1
<i>Archangium</i> sp.	49
<i>Cystobacter</i> sp.	17
<i>Chondromyces</i> sp.	2
<i>Nannocystis</i> sp.	5
<i>Polyangium</i> sp.	10
<i>Stigmatella</i> sp.	1
<i>Haploangium</i> sp.	–
<i>Melittangium</i> sp.	1
<i>Sorangium</i> sp.	60
Unspecified	4
Total isolated	245

1.1 점액세균의 배양과 대사산물의 스크리닝

순수하게 분리된 점액세균은 Screening 배양을 하였고 sieving과 원심분리로 얻은 이들의 균체와 XAD에서 물질을 추출하였다. 이때 용매로 acetone을 사용하였다. 추출물을 물층과 EtOAc층, n-Heptane과 MeOH의 분획을 통해 세포벽 성분과 배지성분을 제거한 순수한 점액세균 대사산물을 얻었으며 이를 스크리닝 시료로 사용하였다.

화학적 스크리닝과 생물학적 스크리닝을 실시하였으며 스크리닝한 108종의 점액세균의 대사산물 중에서 71종의 시료에서 inhibition zone이 나타났다(Table 4).

특히 *Archangium*속은 33종 중 12종이 활성을 나타내었다.

그 분포로는 *E.coli*에서 10mm미만 1개, 10mm이상 2개, *S.aureus*에서 10mm미만 9개, 10mm이상 3개, *R.rubra*에서 10mm미만 1개, *S.cerevisia*에서 10mm이상 2개, *C.albicans*에서 10mm이상 1개의 결과를 보였다.

전체적으로 *S.aureus* 와 *E.coli* 에서는 많은 균주들이 활성을 보였으나 *S.cerevisia*와 *R.rubra*에서는 활성을 가진 균주가 극히 드물었다.

특히 균주 KM593은 항균시험에서 *S.aureus*, *S.cerevisia*, *C.albicans*에 높은 성장억제활성을 나타내었으며 ORAC assay를 통한 항산화시험에서 대조물질인 Trolox와 비교할 만한 강한 활성을 보였다. 또한 대사산물의 TLC 결과, Vanillin-sulfuric acid의 처리로 특이한 발색 반응을 나타내는 동일 계열의 대사산물이 혼재되어 있음을 알 수 있었다.

따라서 본 연구에서는 균주 KM593의 대사산물을 대상으로 활성 본체 및 대사산물에 관한 연구를 수행하기로 하였다.

Table 4. Screening of myxobacteria for antimicrobial substances

Strain	Type	Inhibition zone (mm)				
		Bacteria		Yeast		
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>R. rubra</i>	<i>S. cerevisia</i>	<i>C. albicans</i>
425	Mx	–	++	–	–	n.t.
437	Cb	–	–	–	–	n.t.
444	Ar	–	+	–	–	n.t.
451	Ar	–	–	–	–	n.t.
457	Ar	–	+	–	–	n.t.
461	Ar	–	–	–	–	n.t.
462	Ar	–	–	–	–	n.t.
472	Ar	–	–	–	–	n.t.
480	Ch	–	++	–	–	n.t.
484	Mx	–	–	++	++	n.t.
485	Cc	–	–	n.t.	n.t.	n.t.
501	Mx	–	–	–	–	n.t.
502	Mx	–	–	++	+	n.t.
503	Cc	–	–	–	–	n.t.
504	Cc	–	+	–	–	n.t.
505	Mx	–	+	–	–	n.t.
506	Mx	–	–	–	–	n.t.
507	Na	–	+	+	++	n.t.
508	Cc	–	+	–	–	n.t.
509	Ar	–	–	–	–	n.t.
511	Cc	–	–	–	–	n.t.
512	Mx	–	–	+	–	n.t.
513	Nn	–	–	–	–	n.t.
515	Mx	–	–	–	–	n.t.
516	Ar	–	–	–	–	n.t.
517	Cb	–	–	–	–	n.t.
518	Ar	–	+	–	–	n.t.
519	Ar	–	+	–	–	n.t.
520	Mx	–	–	+	+	n.t.
521	Mx	–	+	–	–	n.t.
522	Mx	+	++	–	–	n.t.
523	Cc	–	++	–	–	n.t.
524	Ar	–	–	–	–	n.t.
525	Ar	–	–	–	–	n.t.
526	Mx	–	++	–	–	n.t.
527	Cc	–	–	–	–	n.t.
528	Mx	–	–	–	–	n.t.
529	Cc	++	++	–	–	n.t.

530	Cb	-	-	-	-	n.t.
531	Ar	-	+	-	-	n.t.
532	Pl	-	++	-	-	n.t.
533	Cc	+	+	-	-	n.t.
534	Pl	-	-	-	-	n.t.
535	Cc	+	+	+	-	n.t.
536	Ar	+	++	-	-	n.t.
537	Cc	+	++	-	+	n.t.
538	Cc	-	-	-	-	n.t.
539	Cc	-	+	-	-	n.t.
540	Mx	-	+	-	-	n.t.
541	Mx	+	+	-	-	n.t.
542	Ar	-	+	-	-	n.t.
543	Mx	-	-	-	+	n.t.
544	Na	-	-	-	+	n.t.
545	Ar	-	-	-	-	n.t.
548	Cb	-	++	-	-	n.t.
549	Mx	-	-	+	-	n.t.
550	Cc	-	-	-	-	n.t.
551	Ar	-	-	-	-	n.t.
552	Ar	-	+	-	-	n.t.
553	Cc	-	+	-	-	n.t.
554	Cc	-	-	-	-	n.t.
555	Cc	+	-	++	-	n.t.
556	Mx	+	-	-	-	n.t.
558	Mx	-	-	-	-	n.t.
560	Mx	-	-	-	-	n.t.
561	Mx	+	+	++	-	n.t.
564	Mx	-	+	-	-	n.t.
566	Mx	-	+	-	-	n.t.
568	Cb	-	-	-	-	n.t.
569	Mx	-	+	-	-	n.t.
570	Ar	-	-	-	-	n.t.
572	Mx	-	-	++	-	n.t.
573	Ar	-	-	-	-	n.t.
574	Ar	-	+	-	-	n.t.
575	Cc	-	+	-	-	n.t.
576	Cc	-	+	-	-	n.t.
577	Mx	-	+	-	-	n.t.
578	Mx	-	-	-	-	n.t.
579	Cc	-	+	-	-	n.t.
580	Ar	-	-	-	-	n.t.
582	Ar	-	-	-	-	n.t.
583	Ar	-	-	-	++	n.t.
584	Cc	-	+	+	-	n.t.

585	Mx	-	+	+	+	++
586	Ar	-	+	+	-	-
589	Cc	-	-	-	-	n.t.
591	Cb	-	+	-	+	-
593	Ar	-	++	++	-	++
595	Cb	n.t.	n.t.	+	n.t.	-
596	Cc	-	++	-	-	n.t.
597	Cc	-	+	-	-	n.t.
598	Mx	n.t.	n.t.	++	n.t.	++
599	Mx	-	-	++	-	++
603	Cc	-	n.t.	+	-	-
606	Mx	-	-	-	-	-
607	Cb	-	+	-	-	-
609	Cc	-	+	-	++	-
611	Ar	n.t.	+	n.t.	n.t.	n.t.
619	Cc	-	+	-	-	n.t.
626	Mx	-	+	n.t.	n.t.	-
627	Mx	-	+	n.t.	n.t.	n.t.
635	Ar	-	++	n.t.	n.t.	n.t.
639	Cc	-	-	n.t.	-	n.t.
648	Ar	++	-	-	-	n.t.
652	Ar	-	-	n.t.	n.t.	-
653	Ar	++	-	n.t.	n.t.	-
664	Cc	-	++	n.t.	n.t.	-

+ = less than 10 mm, ++ = 10 ~ 20 mm

n.t. = not tested

2. 균주 KM593의 분류와 동정

안산토양에서 분리한 균주 KM593은 Gram 염색에서 음성, Congo red 염색에서 양성을 보였다.

WCX agar와 Vy2 agar에서 성장 pattern이 약간 달랐는데 WCX agar에서 균체의 색깔은 짙은 갈색이고 Vy2 agar에서는 검은 빛이 섞인 오렌지색으로 각각 다른 형태학적 특징을 가졌다. 또한 WCX agar에서는 영양세포가 각각 단일하게 떨어져 있고 균체가 plate 위에 주름이 잡힌 듯 한 모습을 보였고 Vy2 agar에서는 자실체가 혈관 형태와 구 형태를 모두 지니며 전체적으로 형태가 일정치 않고 구불구불한 덩어리가 서로 겹치거나 혹은 따로 존재함을 알 수 있었다(Fig. 7, 8).

이들 형태상의 특징과 문헌¹¹⁾검색을 통해 KM593은 *Archangium* 속 점액세균으로 동정되었으며 현재 이 속에는 *Archangium gephyra* 1종만 인정되어 있으므로 균주 KM593은 *Archangium gephyra* KM593으로 명명하였다.



Fig. 7. Fruiting body and swarm of strain KM593 on WCX agar.

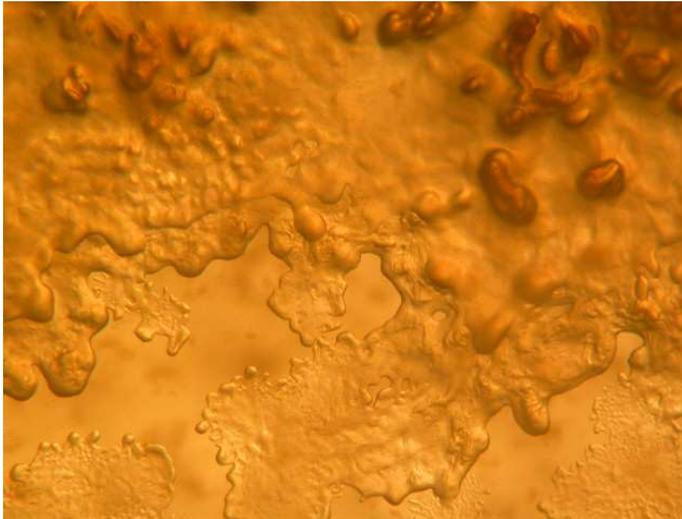


Fig. 8. Fruiting body and swarm of strain KM593 on Vy2 agar.

3. *Archangium gephyra* KM593이 생산하는 활성물질의 분리

균주 KM593의 배양은 shaking incubator 30°C, 160RPM의 조건하에서 standard MD1 liquid를 사용해 38 L를 120시간동안 총 5차례 배양하였다. 균주 KM593은 배양 시, 배양액이 맑고 균체색은 검은색을 띠었으며 400ml 종배양시 배양액이 옅은 자주색을 띠는 특징을 보였다. 120시간 배양 기간 동안 평균 pH 7.9의 수준이었다. 점액세균의 대표적인 특징인 플라스크의 벽면에 띠를 두르는 현상도 관찰 되었다. 배양 후 sieving을 통해 균체와 XAD을 수확하고 배양액은 원심 분리하여 배양액 속에 남아 있는 균체까지 확보함으로써 손실을 최소화하였다.

용매로 MeOH와 Acetone 사용하여 12시간씩 4번의 추출을 하였으며 추출물을 농축한 후 물층과 EtOAc층으로 분리하고 이 중에서 EtOAc층을 다시 농축한 다음 MeOH과 n-Heptane으로 재분획하여 MeOH층을 회수하여 농축한 것(1.7g)을 분리 시료로 하였다.

먼저 CH₂Cl₂와 Acetone, MeOH을 용출 용매로 사용하여, silica gel column chromatography 하였다. 처음에는 MeOH, Acetone, CH₂Cl₂을 각각 2:3:95의 조건으로 사용하였고 그 후로 MeOH의 농도를 3%, 5%, 10%, 100%로 단계별로 높여 모두 5개의 Fr.을 얻었다(Fig. 9).

Fr.1은 용출용매로 EtOAc, n-Hexane, CH₂Cl₂, Acetone, MeOH을 사용해 silica gel column chromatography하여 총 10개의 Fr.을 얻었다.

Fr.1-1(EtOAc:n-Hexane=70:30)는 silica gel column chromatography 을 거쳐 Fr.1-1-1(2-Propanol:Hexane:CH₂Cl₂=10:18:72)을 얻었고 계속해서 silica gel Semi-preparative HPLC을 MeOH: Hexane:CH₂Cl₂=1:49.5

:49.5의 용매를 사용해 **Compound 4**(15.1mg)을 분리하였다.

Fr.1-2(EtOAc 100%)을 silica gel column이 장착된 Semi-preparative HPLC를 용매 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=98:2$ 를 사용하여 **Compound 2**(19.8mg)을 분리하였다.

Fr.1-3($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Acetone}=95:5$)은 silica gel column chromatography하였는데 용출용매는 $\text{EtOAc}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=30:70$ 를 사용하였다. 이 실험으로 나온 Fr.1-3-1는 RP-18 Semi-preparative HPLC로 분리해 **Compound 5**(8.2 mg)를 얻었다. 용매로는 $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=20:80$ 가 사용되었다.

Fr.2($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=95:5$)는 RP-18 column chromatography로 Fr.2-1($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=40:60$)을 얻어 이를 silica gel MPLC($\text{MeOH}:\text{Hexane}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=5:47.5:47.5$)하여 각각 Fr.2-1-1과 Fr.2-1-2를 분리하였다.

Fr.2-1-2은 RP-18 column chromatography로 $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=(30:70)-(0:100)$ 을 MeOH의 양을 점점 높여 주어 Fr. 2-1-1-1를 얻어 이를 최종적으로 RP -18 Semi-preparative HPLC하여 **Compound 1**(19.1mg)을 분리하였고 이 때, 용매 조건은 $2\text{-Propanaol}:\text{Hexane}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=10:18:72$ 이었다.

Fr.2-1($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=40:60$)을 silica gel MPLC ($\text{MeOH}:\text{Hexane}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=5:47.5:47.5$)하여 얻어진 Fr.2-1-2를 Sephadex LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=80:20$)하여 Fr.2-1-2-1를 마지막으로 silica gel Semi-preparative HPLC($2\text{-Propanaol}:\text{Hexane}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=10:18:72$)하여 **Compound 3**(10.4mg)을 분리하였다.

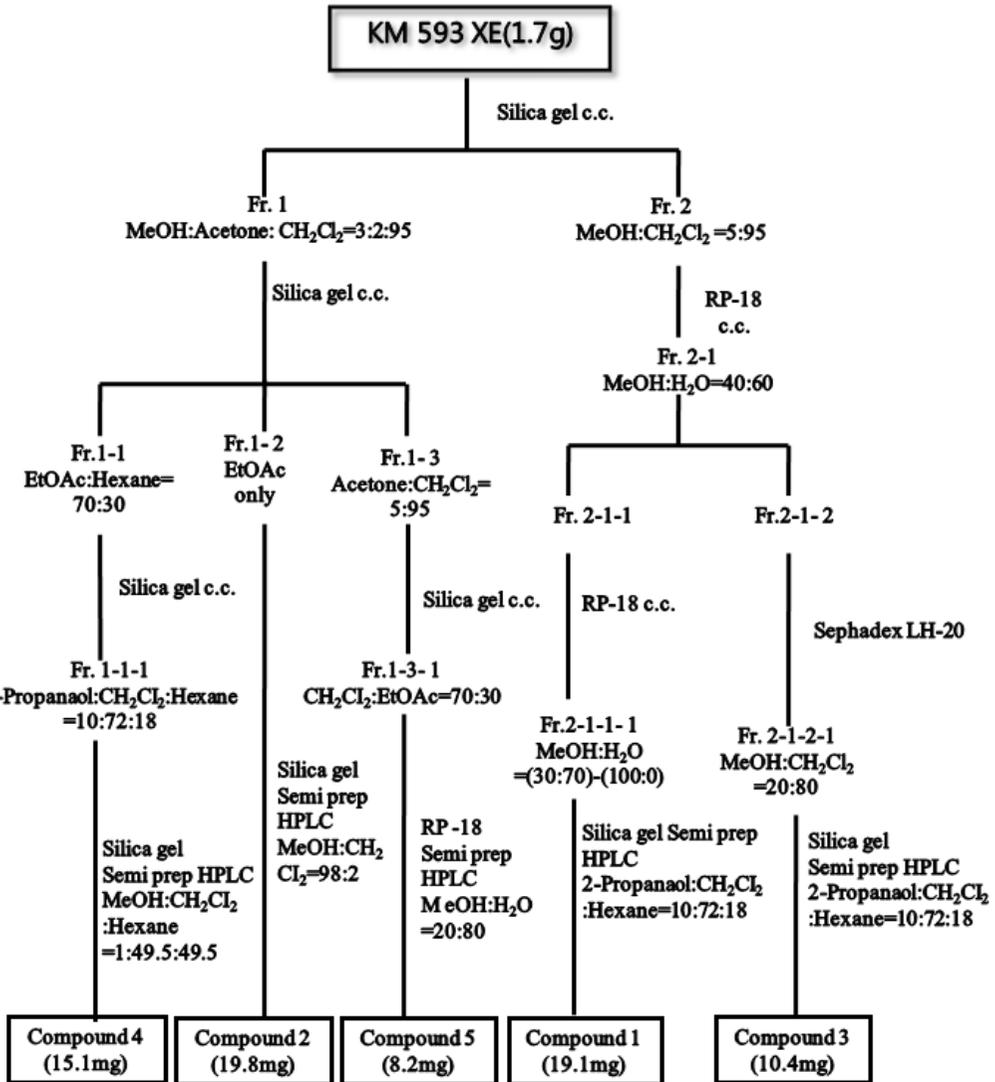


Fig. 9. Isolation of bioactive compounds from strain KM593.

3.1 활성물질의 구조 결정

1) Compound 1

Compound 1은 흰색의 고체(White solid)로 침상결정을 보였으며 VS(V anillin-sulfuric acid)반응에서 흰색을 보였고 $[\alpha]_D^{25}$ 값이 -72.0 ($c=0.5$, MeOH), RP-18 TLC에서 MeOH:H₂O=5:5일 때, R_f 0.52의 값을 가졌으며 UV 254nm에서 흡수를 보였다. 이 물질은 ESI-MS를 통해 이루어졌으며 ESI-MS에서 m/z 283 $[M+Na]^+$ 을 HR-ESIMS에서 m/z 261. 1245 $[M+H]^+$ 의 값을 보였기에 이 Compound 1의 분자식은 C₁₄H₁₆N₂O₃로 밝혀졌다. 이 화합물의 물리·화학적 특징은 Table 5에 나타내었고 ¹H and ¹³C-NMR 스펙트럼은 Table 6에 정리하였다.

Table 5. Physico-chemical properties of compound 1

Compound 1	
Appearance	White solid
$[\alpha]_D^{25}$	-72.0 ($c=0.5$, MeOH)
ESI-MS(m/z)	283 $[M+Na]^+$
HR-ESIMS(m/z)	261. 1245 $[M+H]^+$
Molecular formula	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃
Solubility	
soluble	MeOH, EtOAc, CH ₂ Cl ₂
insoluble	H ₂ O, Hept
TLC(RP-18)	$R_f = 0.52$ (MeOH : H ₂ O = 5:5)

Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 1 in CD_3OD

Position	δ_{H}	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	δ_{C}	HMBC
1			166.7 s	H-2, 4, 5
2	4.34(1H, t, 5.5)	H-8a	57.8 d	H-8
3			170.5 s	H-2, 7, 8
4	4.03(1H, m)	H-5a	60.0 d	H-5, 7
5	a. 2.08(1H, m) b. 1.23(1H, m)	H-4, 6	29.4 t	H-4, 6
6	1.79(2H, m)	H-5a, 5b, 7	22.7 t	H-5, 7
7	3.54(2H, m)	H-6	45.9 t	H-5, 6
8	a. 3.09(1H, dd, 14.5/5.5) b. 3.33(1H, dd, 14.5/5.5)	H-2	37.6 t	H-2, 3, 1', 2'/6'
1'			127.5 t	
2'/6'	7.01 (2H, br d, 9.0)	H-3'/5'	131.9 t	H-8, 4', 3'/5'
3'/5'	6.68 (2H, br d, 9.0)	H-2'/6'	116.0 t	H-1', 4', 2'/6'
4'			157.4 t	H-3'/5', 2'/6'

Assignment were aided by a combination of $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.

각 탄소의 치환 정도는 HMQC를 토대로 알 수 있었다. ^1H -NMR δ

7.01(br d, H-2', 6'), δ 6.94(br d, H-3', 5')에서 1,4-disubstituted phenyl ring이 있음을 알려주었고 이 peak의 형태 또한 1-4 disubstituted phenyl ring 구조의 전형적인 peak이다. 이들의 ^{13}C -NMR에서도 δ 131.9, δ 116.0은 이를 지지하였다(Fig. 10, 11).

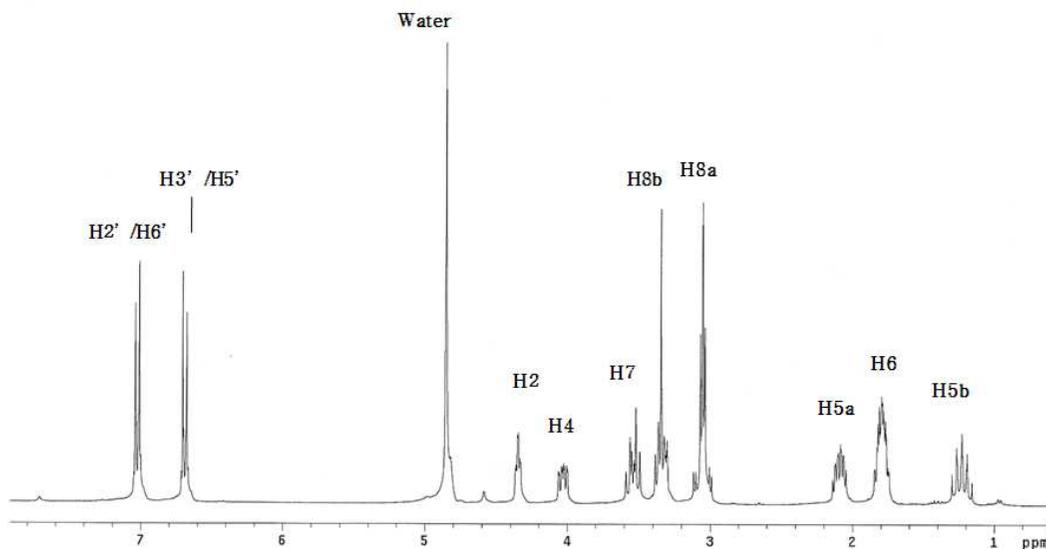


Fig. 10. ^1H NMR spectrum of compound 1 (in CD_3OD).

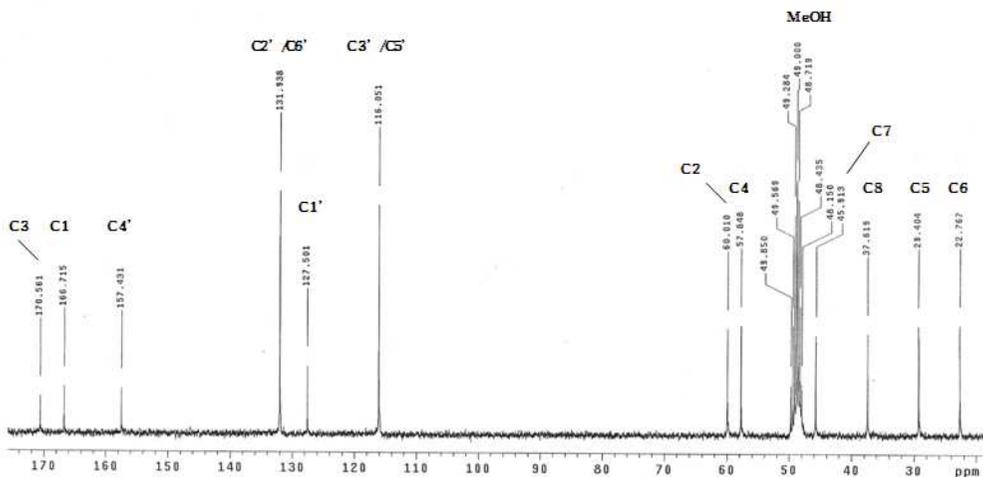


Fig. 11. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (in CD_3OD).

그리고 ^1H - ^1H COSY는 2'와 3', 5'와 6의 연결을 보여 주었고 aromatic ring의 다른 부분은 $\delta 127.5(\text{C}-1')$, $\delta 157.4(\text{C}-4')$ 로 구성됨을 HMBC로 알 수 있었다(Fig. 12).

$\delta 166.7(\text{C}-1)$, $\delta 170.5(\text{C}-3)$ 은 치환되지 않은 carbonyl group의 탄소임을 알 수 있었다. ^1H 과 ^{13}C -NMR에서 이들 두 carbonyl은 2개의 amide 이고 $\delta 57.8/4.34(\text{CH}-2)$, $\delta 60.0/4.03(\text{CH}-4)$ 에서 N과 C의 연결을 확인할 수 있었다.

나머지 $\delta 2.08(\text{CH}_2-5)$, $\delta 1.79(\text{CH}_2-6)$, $\delta 3.54(\text{CH}_2-7)$ 는 모두 ^1H - ^1H COSY로 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 의 부분 구조로 서로 연결되고 이는 δ

60.0/4.03(CH-4)와 연결되었다(Fig. 12).

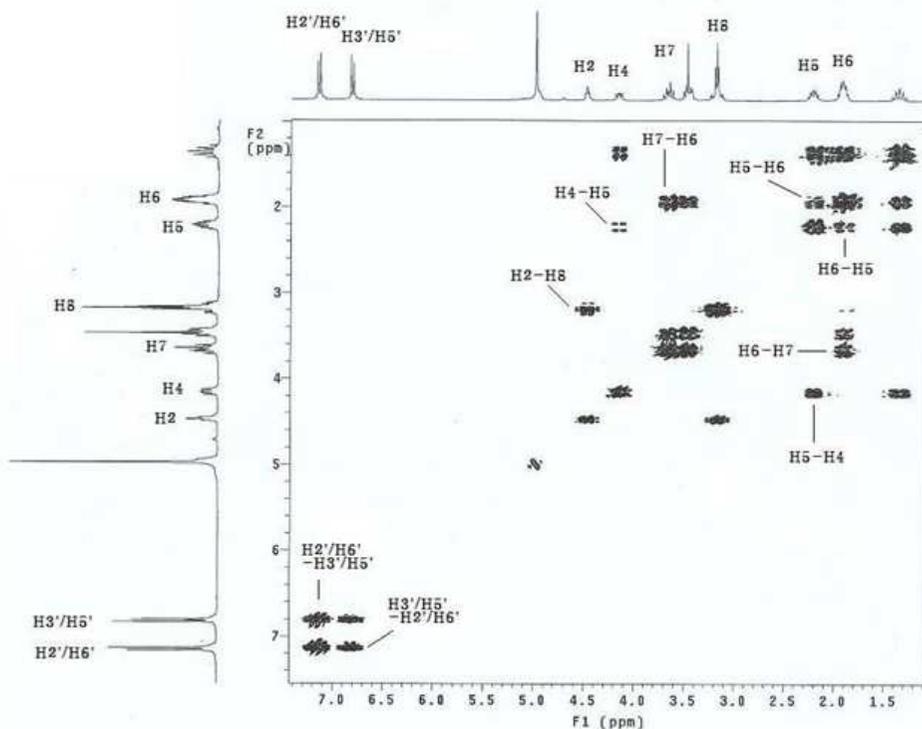


Fig. 12. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 1 (in CD_3OD).

$\delta 37.6/3.33(\text{CH}_2-8)$ 은 $\delta 60.0/4.03(\text{CH}-4)$ 와 ^1H - ^1H COSY로 연결되었다. 이렇게 나온 부분 구조들은 HMBC와 IHD에 토대해 서로 연결하여 proline carbonyl $\delta 170.5(\text{C}-1)$, tyrosine carbonyl $\delta 166.7(\text{C}-3)$ 를 얻어 dikeopiperazine의 핵을 가짐을 알 수 있었다.

^1H 과 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 문헌대조한 결과, compound 1은 *Cyclo*-(L-Pro-L-Tyr)임이 판명되었다. 이 화합물은 Bacteria²⁸⁾ Fungus²⁹⁾등에서 이와 동일한 구조의 화합물이 분리되었음을 알 수 있었고³⁰⁻³⁴⁾ 이들은 역시 합성을 통해서도 만들어질 수 있음을 알 수 있었다³⁵⁾(Fig. 13).

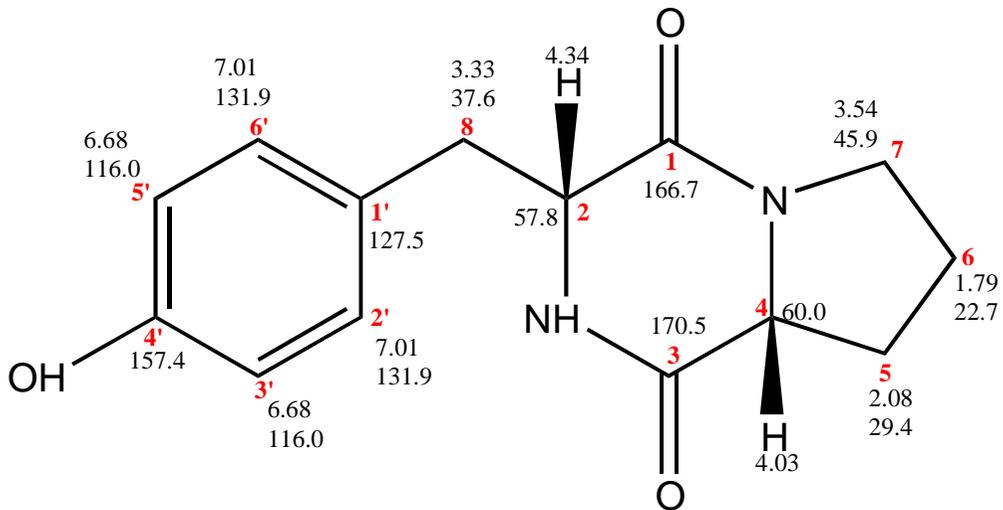


Fig. 13. Chemical structure of compound 1.

2) Compound 2

Compound 2는 흰색의 고체(White solid)였으며 VS반응에서 흰색을 보였고 RP-18 TLC에서 MeOH : H₂O =5:5일 때, R_f 0.20의 값을 가졌다. UV 254nm에서 흡수를 보였다. Compound 4의 물리·화학적 특징은 Table 7에 정리하였다.

이 물질의 분자식은 ¹H and ¹³C-NMR 스펙트럼을 통해 측정되었다. ¹H과 ¹³C-NMR data는 Table 8에 정리하였다.

Table 7. Physico-chemical properties of compound 2

Compound 2	
Appearance	colorless oil
$[\alpha]_D^{20}$	-80.9 (<i>c</i> =2.6, MeOH)
EI-MS(<i>m/z</i>)	244.1 [M+H] ⁺
Solubility	
soluble	MeOH, EtOAc, CH ₂ Cl ₂
insoluble	H ₂ O, Hept
TLC(RP-18)	R _f = 0.20 (MeOH : H ₂ O =5:5)

Table 8. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 2 in CD_3OD

Position	δ_{H}	δ_{C}
1		171.1 s
2	4.44(1H, m)	57.8 d
3		167.0 s
4	4.05(1H, dd)	60.2 d
5	a. 2.08(1H, m) b. 1.20(1H, m)	29.5 t
6	1.81(2H, m)	22.8 t
7	3.36~3.53(2H, m)	46.1 t
8	3.15(2H, m)	38.3 t
1'		137.4 s
2'/ 6'	7.24(2H, m)	131.2 d
3'/ 5'	7.27(2H, m)	129.5 d
4'	7.24(1H, m)	128.2 s

Assignment were aided by a combination of ^1H - ^1H COSY, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.

^1H -NMR 스펙트럼에서 적분 곡선으로 14개의 H이 있는 것으로 확인되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼으로 C이 14개가 있으며 이들의 치환 형태는 C 3개, CH 7개, CH_2 4개인 것을 알 수 있었다(Fig. 14, 15).

C 3개 중 $\delta 171.1(\text{C}-1)$ 과 $\delta 167.0(\text{C}-3)$ 는 carbonyl group임을 확인하였고 남은 C 1개는 $\delta 137.4$ aromatic ring의 C로 추정되었다.

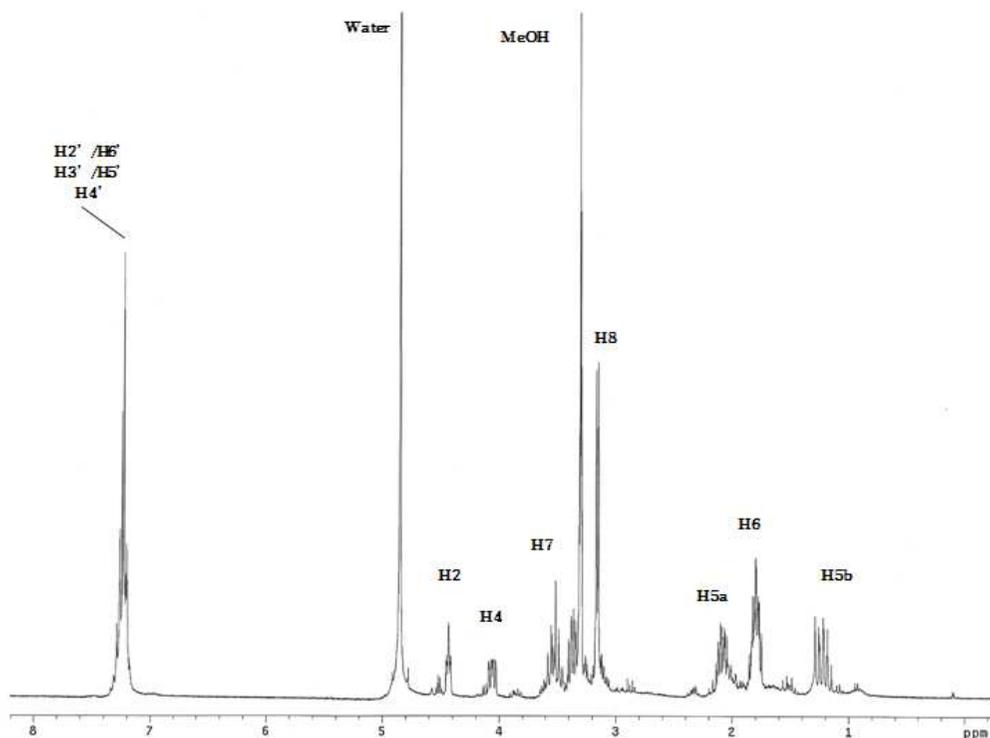


Fig. 14. ^1H NMR spectrum of compound 2 (in CD_3OD).

$\delta 7.24/131.2(2\text{H}, \text{m}, \text{CH}-2'/ 6')$, $\delta 7.27/129.5(2\text{H}, \text{m}, \text{CH}-3'/ 5')$ 은 $\delta 7.24/128.2(1\text{H}, \text{m}, \text{CH}-4)$ 과 $\delta 137.4(\text{C}-1')$ 과 함께 aromatic ring을 이룸을 알 수 있었고 치환 형태는 mono-substituted aromatic ring임을 알 수 있었다.

$\delta 2.08, 1.20/29.5(1\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2-5)$, $\delta 0.78/22.8(2\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2-6)$, $\delta 3.36\sim$

3.53/46.1(2H, m, CH₂-7)는 스핀-스핀 갈라짐(spin-spins plitting)로 methine 이 서로 연결되어있는 부분구조 -CH₂-CH₂-CH₂-으로 서로 연결 되었다.

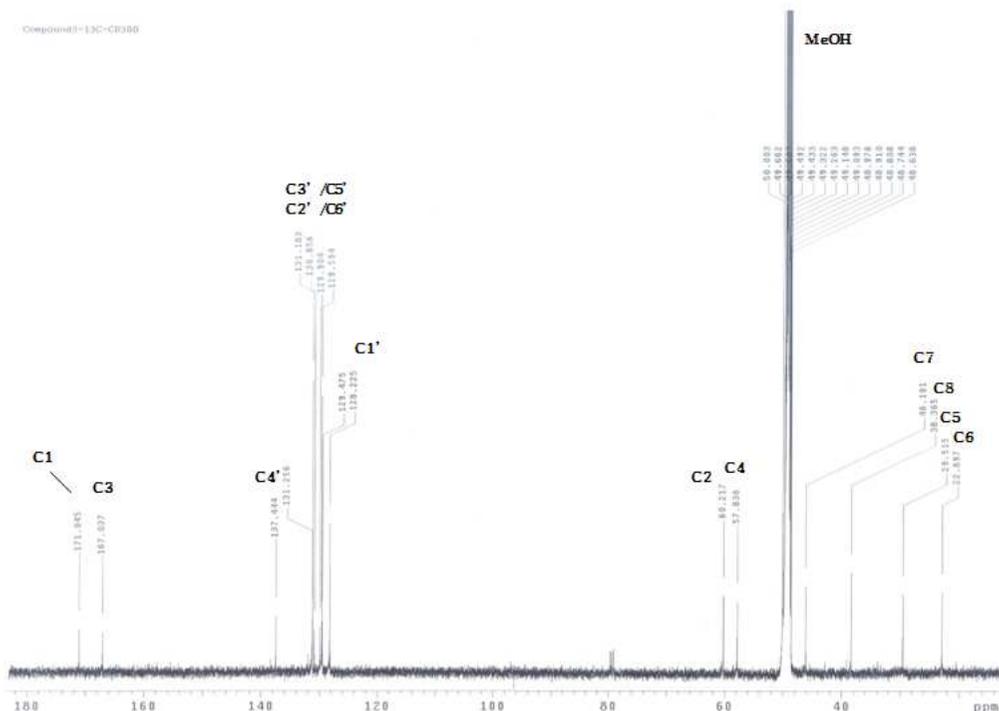


Fig. 15. ¹³C NMR spectrum of compound 2 (in CD₃OD).

2개의 CH δ4.09/57.8(1H, m, CH-2), δ4.05/60.2(1H, dd, CH-4)는 앞에서 구조 결정한 compound 1과 같이 N-C결합을 가지는 의 핵을 가진 compound로 추측되었다.

Compound 2는 VS반응과 물리적 성상이 compound 1와 유사하였고 ¹H 과 ¹³C-NMR스펙트럼은 compound 1의 1-4 disubstituted aromatic ring 을 제외하곤 거의 유사한 유형을 보임을 알 수 있었다. 따라서 Compound 2는 DKP 1과 거의 유사하나 aromatic ring의 치환 형태만 다른 Compound일 것이라 추측하였고 그와 비슷한 구조를 가진 Compound를

문헌조사 하였다. 이 결과 compound 2는 *Cyclo*-(Phe-Pro)임을 알 수 있었다(Fig. 16).

대조한 문헌에서^{28,29,36)} δ 4.09(H-2)과 δ 4.05(H-4)는 부분구조 aromatic ring과 $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 에 HMBC로 각각 연결되어 phenyl alanine 잔기와 proline잔기를 이루어 *Cyclo*-(Phe-Pro)임을 알 수 있었고 특히 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -80.9$ ($c=2.6$, MeOH)는 compound 2가 *Cyclo*-(L-Phe-L-Pro)라는 사실을 지지해 주었다. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 가 제시된 다른 논문에서 *Cyclo*-(L-Phe-L-Pro)는 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -94$ ($c=0.5$, MeOH)를 보였다.³⁷⁾

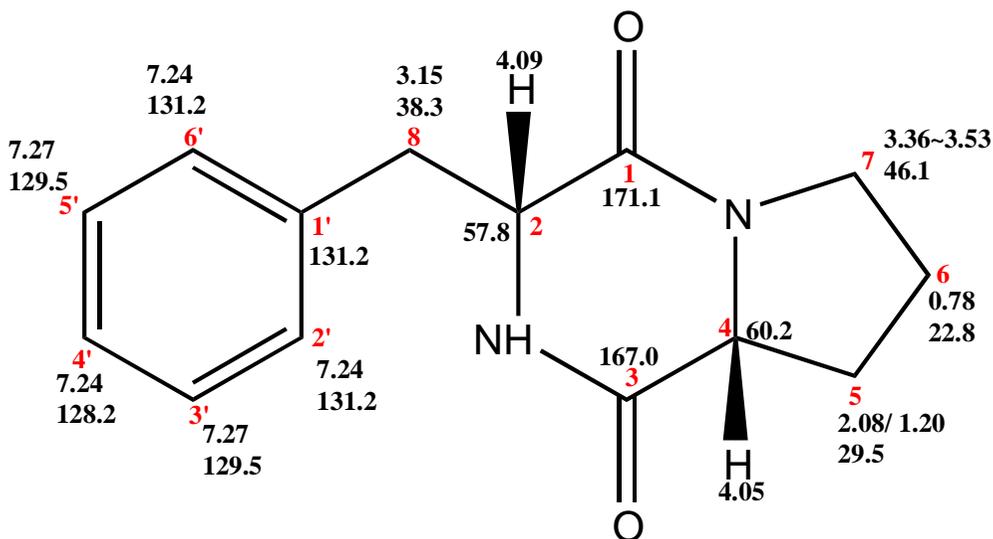


Fig. 16. Chemical structure of compound 2.

3) Compound 3

Compound 3는 역시 흰색의 고체(White solid)로 침상결정을 보이고 VS반응으로 흰색을 나타내었으며 RP-18 TLC에서 MeOH : H₂O =5:5일 때, R_f 0.55의 값을 가졌고 UV 254nm에서 흡수를 보였다. $[a]_D^{20}$ 는 +56.0 (c=0.5, MeOH)이었고 IR 스펙트럼에서 3231, 2954, 1644, 1614, 1514, 1455, 1242cm⁻¹에서 흡수를 보였다. 이로서 OH 혹은 NH기와 aromatic ring, amide carbonyl기가 있을 것이라 추정하였다. ESI-MS에서 m/z 261.40[M+H]⁺와 HRESI-MS에서 m/z 261.1225[M+H]⁺의 peak를 보였으며 분자식은 C₁₄H₁₆N₂O₃로 밝혀졌다. Compound 3의 물리·화학적 특징은 Table 9에 정리되어 있고 ¹H and ¹³C-NMR은 Table 10에 나와 있다.

Table 9. Physico-chemical properties of compound 3

Compound 3	
Appearance	White solid
$[a]_D^{20}$	+56.0 (c=0.5, MeOH)
IR ν_{\max} , cm ⁻¹ (MeOH)	3231, 2954, 1644, 1614, 1514, 1455, 1242
EI-MS(m/z)	261.40 [M+H] ⁺
HR-ESIMS(m/z)	261.1245 [M+H] ⁺
Molecular formula	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃
Solubility	
soluble	MeOH, EtOAc, CH ₂ Cl ₂
insoluble	H ₂ O, Hept
TLC(RP-18)	R _f = 0.55 (MeOH : H ₂ O =5:5)

Table 10. ^1H and ^{13}C NMR data for compound **3** in CD_3OD

Position	δ_{H}	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	δ_{C}	HMBC
1			171.1 s	H-4, 6, 8a, 8b
2	4.13(1H, t, 4.5)	H-8a, 8b	59.8 d	H-8a, 8b, 1'
3			167.3 s	H-2, 4
4	2.59(1H, dd, 5.8/ 16.5)	H-5b, 6b	59.1 d	H-1, 5, 6
5	a. 1.64(1H, m)	H-4, 6a	29.8 t	H-6, 7
	b. 2.05(1H, m)	H-4, 6b		
6	a. 1.94(1H, m)	H-5a, 7	22.5 t	H-4, 5, 7
	b. 1.64(1H, m)	H-4, 5b, 7		
7	3.51(2H, m)	H-6a, 6b	46.0 t	H-6
8	a. 3.10(1H, dd, 4.5/18.5)	H-2, 8a	40.2 t	H-1, 2, 3, 4, 1'
	b. 2.86(1H, dd, 4.5/18.5)	H-2, 8b		
1'			126.8 s	H-2, 8a, 8b, 3'/5'
2'/6'	6.94 (2H, br d, 8.4)	H-3'/5'	132.1 d	H-8a, 8b, 3'/5'
3'/5'	6.70 (2H, br d, 8.4)	H-2'/6'	116.2 d	H-2'/6'
4'			158.0 s	H-3'/5', 2'/6'

Assignment were aided by a combination of $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.

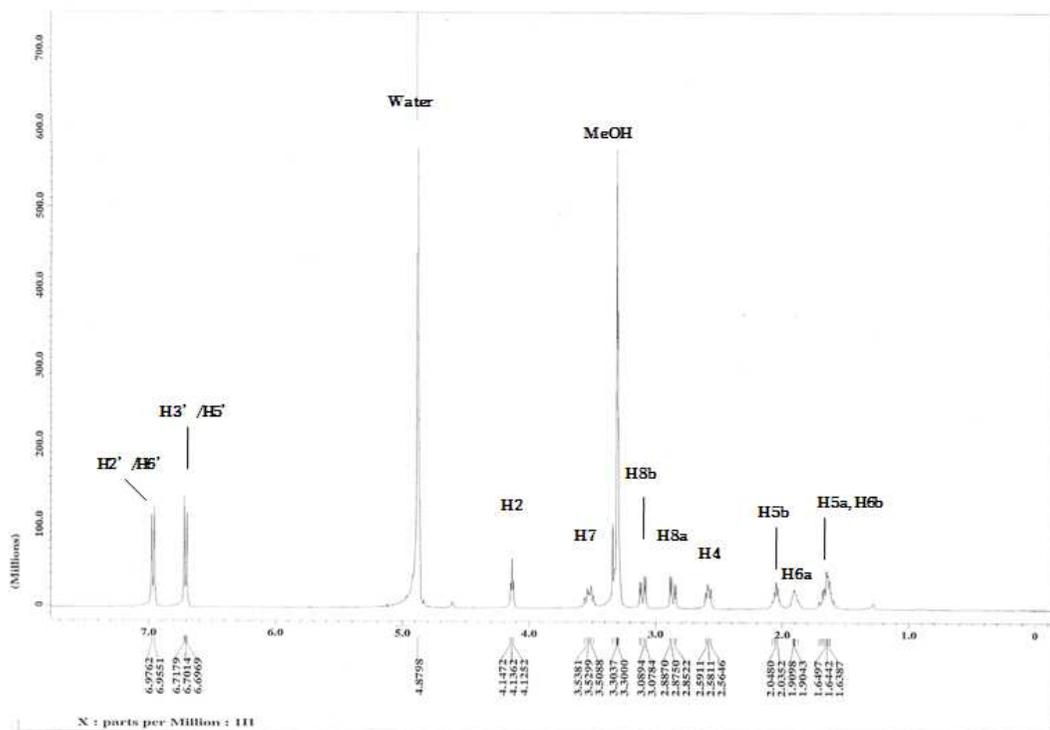


Fig. 17. ^1H NMR spectrum of compound 3 (in CD_3OD).

Compound 1과 비교해 보았을 때 몇 개의 peak를 제외하곤 거의 유사한 NMR 스펙트럼을 보였기에 compound 1과 compound 3이 isomer 관계라는 것을 추측할 수 있었다.

각 탄소의 치환 정도는 역시 HMQC를 토대로 알 수 있었다. ^1H -NMR δ 6.70(br d, H-3', 5'), δ 6.94(br d, H-3', 5')에서 1-4 disubstituted aromatic ring이 있음을 알려주었고 이 peak의 형태 또한 1-4 disubstituted aromatic ring 구조의 전형적인 peak인이다. 이들의 ^{13}C -NMR 수치인 δ 132.1, δ 116.2은 이를 지지하였다(Fig. 17, 18).

^{13}C -NMR 수치인 δ 171.1, δ 167.3 amide carbonyl group의 탄소였으며 δ 59.1/2.59(CH-2), δ 59.8/4.13(CH-4)에서 N-C결합을 확인 할 수 있었다.

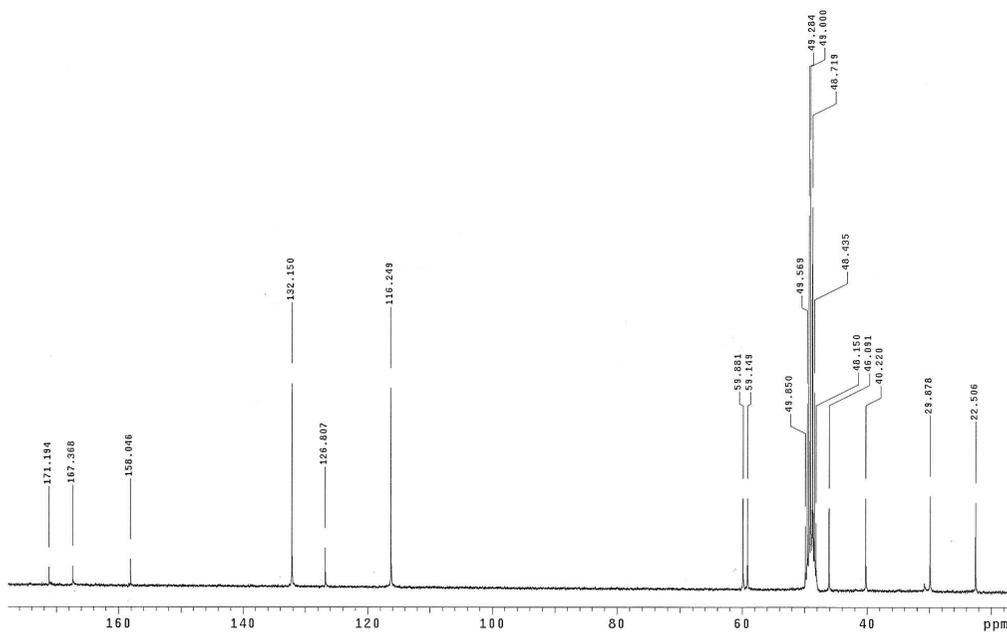


Fig. 18. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 (in CD_3OD).

나머지 $\delta 2.05$, $1.64(\text{CH}_2-5)$, $\delta 1.94$, $1.64(\text{CH}_2-6)$, $\delta 3.51(\text{CH}_2-7)$ 는 모두 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY로 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 의 부분 구조로 서로 연결되고 이는 $\delta 59.1/2.59(\text{CH}-4)$ 와 연결되었다. $\delta 40.2/3.10$, $2.84(\text{CH}_2-8)$ 은 $\delta 59.8/4.13(\text{CH}-2)$ 와 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY로 연결되었다. 이렇게 나온 부분 구조들은 HMBC와 IHD에 토대해 서로 연결하여 proline carbonyl $\delta 171.1(\text{C}-1)$, tyrosine carbonyl $\delta 167.3(\text{C}-3)$ 를 얻어 역시 dikeopiperazine의 유도체임을 알 수 있었다(Fig. 19).

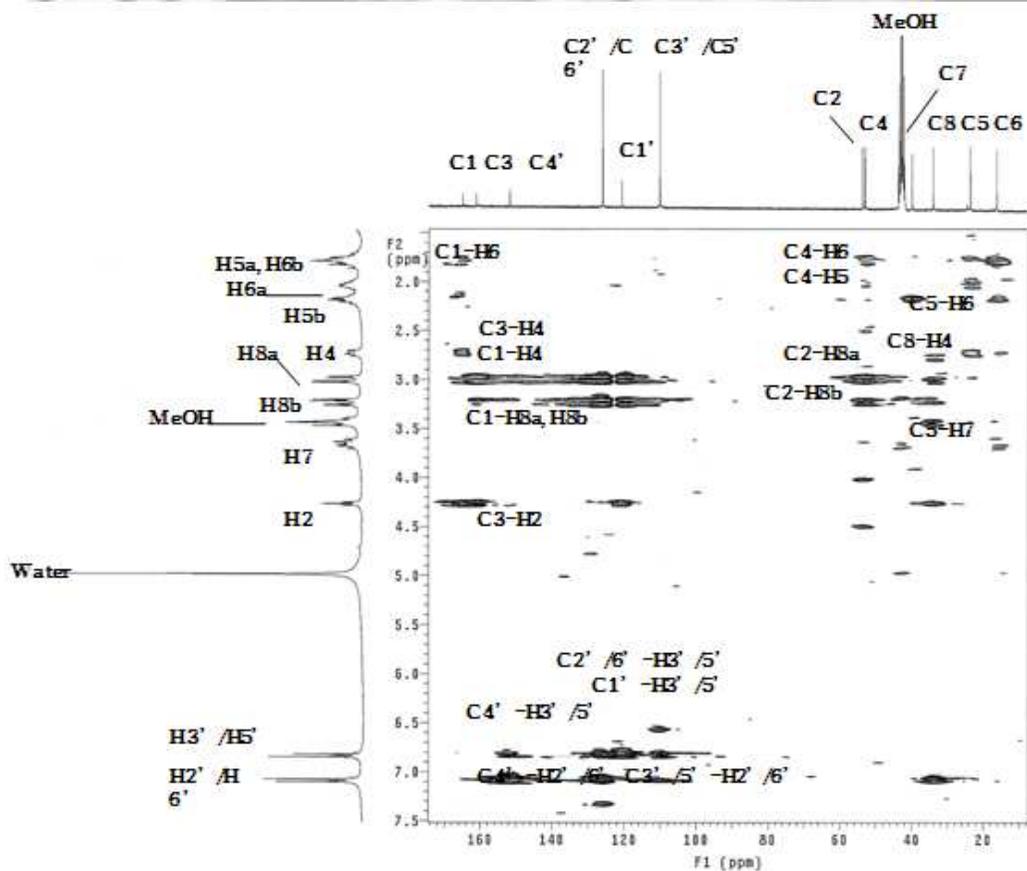


Fig. 19. HMBC spectrum of compound 3 (in CD₃OD).

compound 1과 ¹H-NMR 스펙트럼을 비교했을 때, compound 1은 δ 4.34(1H, t, H-2)과 δ4.03(1H, dd, H-4)의 값을 가지고 compound 3는 δ4.13(1H, t, H-2)과 δ2.59(1H, q, H-4)로 4번 H의 위치가 다른 isomer관계에 있는 구조임을 알 수 있었다.

[α]_D²⁰ +56.0는 compound 1인 *Cyclo*-(L-Pro-L-Tyr)가 -72.0의 값을 가지므로 이와 입체구조가 다른 화합물임을 알 수 있었고 ¹H-NMR 스펙트럼의 문헌대조를 통해 compound 3의 구조는 *Cyclo*-(D-Pro-L-Tyr)임이 판명되었다^{33,37)}(Fig. 20).

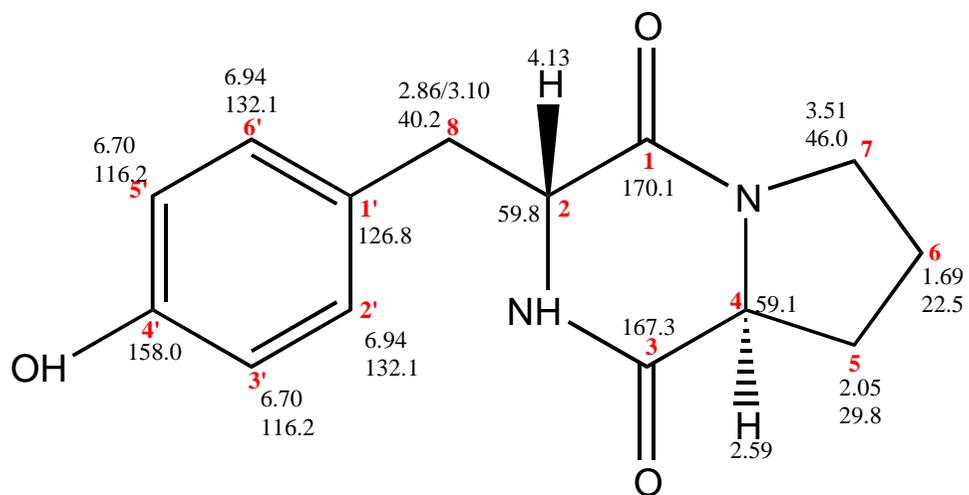


Fig. 20. Chemical structure of compound 3.

4) Compound 4

Compound 4은 흰색의 고체(White solid)로 침상결정을 보였으며 VS반응에서 흰색을 보였고 RP-18 TLC에서 MeOH : H₂O =5:5일 때, R_f 0.30의 값을 가졌다. UV 254nm에서 흡수를 보이지 않았으며 $[\alpha]_D^{20} = -29.8$ ($c=1.1$, MeOH)이었다. 이 화합물의 물리·화학적 특징은 Table 11에 정리하였다.

Table 11. Physico-chemical properties of compound 4

Compound 4	
Appearance	White solid
$[\alpha]_D^{20}$	-29.8 ($c=1.1$, MeOH)
IR ν_{\max} , cm ⁻¹ (MeOH)	3400, 1630
Solubility	
soluble	MeOH, EtOAc, CH ₂ Cl ₂
insoluble	H ₂ O, Hept
TLC(RP-18)	R _f = 0.30 (MeOH : H ₂ O = 5:5)

Table 12. ^1H and ^{13}C NMR data for compound 4 in CD_3OD

Position	δ_{H}	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	δ_{C}
1			170.1 s
2	4.25(1H, t)	H-8a, 8b	53.4 d
3			166.0 s
4	4.10(1H, m)	H-5a, 5b	58.9 d
5	a. 2.01(1H, m) b. 1.50(1H, m)	H-4, 6a, 6b	28.1 t
6	a. 2.00(1H, m) b. 1.90(1H, m)	H-5a, 5b, 7	23.3 t
7	3.50(2H, m)	H-6a, 6b	45.5 t
8	a. 2.30(1H, m) b. 2.00(1H, m)	H-2, 1'	38.6 t
9	1.80(1H, m)	H-8a, 8b	24.7 d
10	0.96(3H, d)	H-9, 11	21.2 q
11	1.00(3H, d)	H-9, 10	22.8 q

Assignment were aided by a combination of $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.

이 물질의 분자식은 ^1H and ^{13}C -NMR, IR 스펙트럼을 통해 이루어졌다. CDCl_3 를 용매로 사용한 ^1H -NMR 스펙트럼에서 적분 곡선으로 18개의 H 이 있고 이중 하나의 H은 C이 아닌 hetero 원자에 있는 H으로 추측되었다 (Fig. 21). ^{13}C -NMR 스펙트럼으로 C이 11개가 있으며 이들의 치환 형태는 DEPT를 통해 C 2개, CH 3개, CH_2 4개, CH_3 2개를 알 수 있었다. *sp* 결합된 C 2개는 IR 스펙트럼에서 carbonyl group이 존재함을 알 수 있었고 흡수도 1630으로 이들이 amide 결합된 carbonyl group임을 확인하였다. 또한 3400의 흡수는 primary amine N-H의 결합임을 알 수 있었고 이로서 hetero원자의 H의 성질을 알 수 있었다. 이 모든 자료를 통합해 볼 때 compound 4의 분자식은 $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 로 밝혀졌다. ^1H and ^{13}C -NMR 스펙트럼은 Table 12에 나와 있다.

$\delta 4.25/54.0$ (1H, t, CH-2)와 $\delta 4.10/60.1$ (1H, m, CH-4)은 N-C잔기임을 확인할 수 있었다. $\delta 2.01/28.8$ (1H, m, CH_2 -5), $\delta 2.00/23.2$ (1H, m, CH_2 -6), $\delta 3.50/46.0$ (2H, m, CH_2 -7)는 모두 ^1H - ^1H COSY로 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 의 부분 구조로 서로 연결되고 이는 $\delta 4.10/60.1$ (1H, m, CH-4)와 연결되었다.

$\delta 0.96/21.4$ (3H, d, CH_3 -10), $\delta 1.00/22.8$ (3H, d, CH_3 -11)은 각각 $\delta 1.0$ 영역에서 doublet으로 서로 영향을 끼치고 이와 ^1H - ^1H COSY로 연결된 $\delta 1.80/25.0$ (1H, m, CH-9)의 H이 CH_3 의 H의 영향으로 Septet의 모양의 스피-스핀 갈라짐(spin-spin splitting)을 보였기에 이 부분 구조가 isopropyl group을 이룸을 알 수 있었다. 이 구조는 DQ-COSY로 $\delta 2.30/38.2$ (1H, m, CH_2 -8)과 $\delta 4.25/54.0$ (1H, t, CH-2)로 차례로 연결되었다.

amide 결합된 carbonyl group인 $\delta 172.6$ (C-1)은 HMBC로 H-2와 8과 long-range correlation하여 이들 부분구조와 연결되어 leucine 잔기가 되었다. 나머지 $\delta 168.5$ (C-3)는 역시 HMBC로 H-4가 이루고 있는 $-\text{CH}$

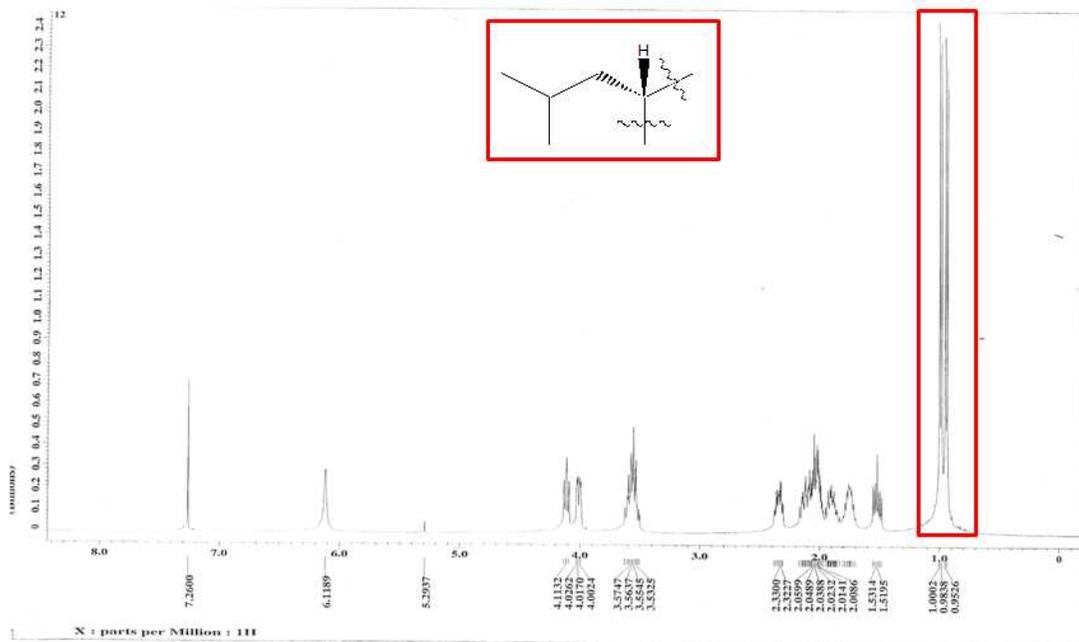


Fig. 21. ^1H NMR spectrum of compound 4 (in CD_3OD).

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 의 부분 구조와 연결되어 proline 잔기가 되었다. leucine carbonyl δ 172.6(C-1)과 H-4, proline carbonyl δ 168.5(C-3)과 H-2의 2개의 HMBC long-range correlation과 IHD에 맞추어 leucine 잔기와 proline 잔기가 결합한 dikeopiperazine의 핵을 가진 *Cyclo* $-(\text{-Pro-Leu-})$ 임을 알 수 있었다.

문헌조사^{28-29,38-41)} 결과 compound 4는 *Cyclo* $-(\text{L-Pro-L-Leu})$ 로 밝혀졌다(Fig. 22).

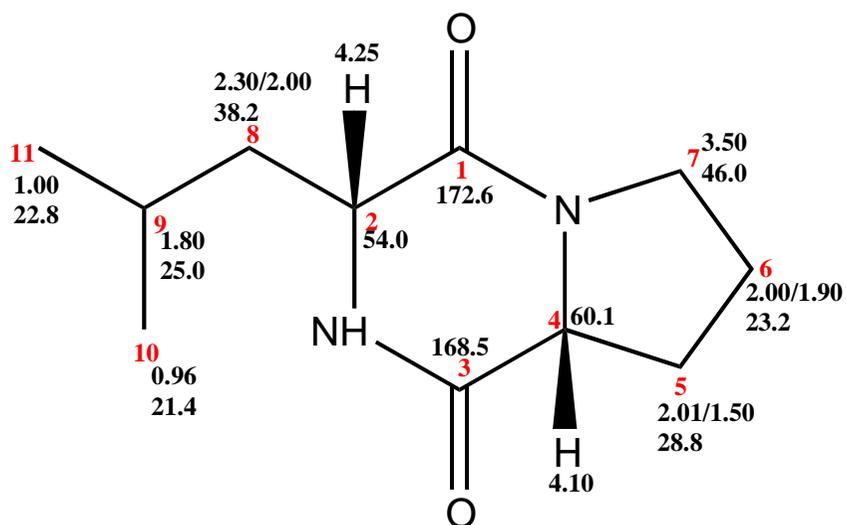


Fig. 22. Chemical structure of compound 4.

5) Compound 5

Compound 5는 흰색의 고체(White solid)로 침상결정을 보였으며 VS반응에서 흰색을 보였고 RP-18 TLC에서 MeOH : H₂O =5:5일 때, R_f 0.34의 값을 가졌다. UV 254nm에서 흡수를 보이지 않았다. 이 화합물의 물리·화학적 특징은 Table 13에 정리하였다.

이 compound의 구조는 ¹H 과 ¹³C-NMR, IR 스펙트럼과 문헌 대조를 위주로 이루어졌다. ¹H-NMR, ¹H-¹H-COSY는 Table 14에 정리하였다.

¹H-NMR 스펙트럼에서 15개의 H이 있는 것으로 추정되었다(Fig. 23).

Table 13. Physico-chemical properties of compound 5

Compound 5	
Appearance	White solid
$[\alpha]_D^{20}$	-127.7°(c=0.5, MeOH)
IR ν_{\max} , cm ⁻¹ (KBr)	3400, 1630, 1600
Solubility	
soluble	MeOH, EtOAc, CH ₂ Cl ₂
insoluble	H ₂ O, Hept
TLC(RP-18)	R _f = 0.34(MeOH : H ₂ O =5:5)

Table 14. ^1H NMR data for compound 5 in CD_3OD

Position	δ_{H}	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY
1		
2	4.02(1H, s)	H-8
3		
4	4.19(1H, t)	H-5
5	a. 2.30(1H, m) b. 1.92(1H, m)	H-4, 6
6	1.92(2H, m)	H-4, 5a, 5b, 7
7	3.50(2H, m)	H-6, 5b
8	2.46(1H, m)	H-1',2'
9	1.08(1H, d)	H-8
10	0.93(3H, d)	H-8

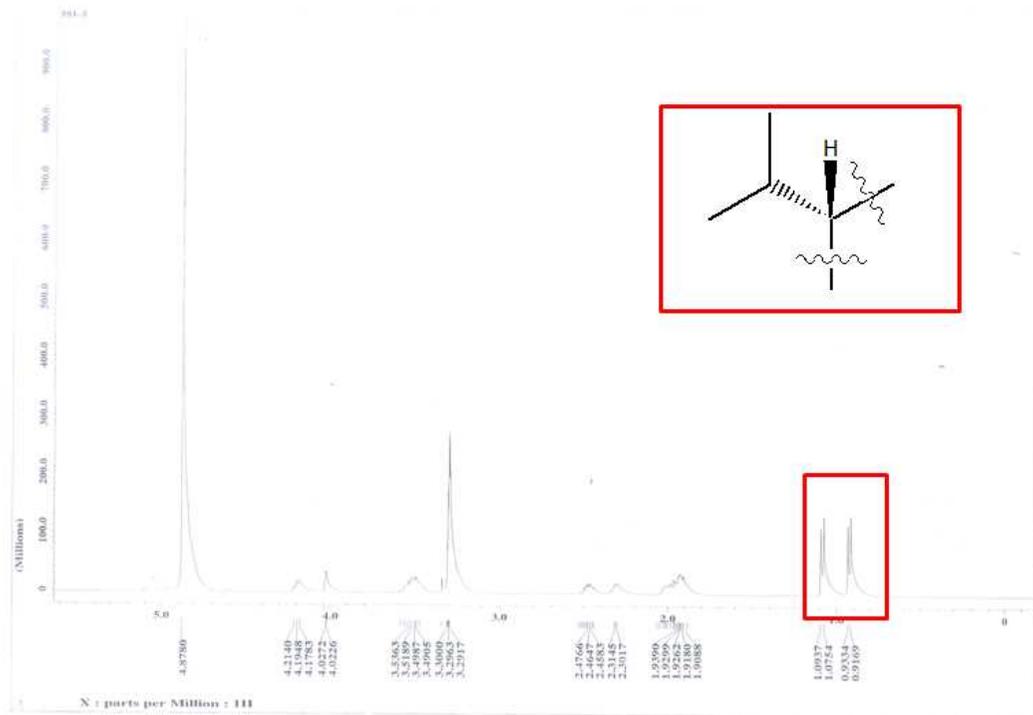


Fig. 23. ¹H NMR spectrum of compound 5 (in CD₃OD).

Compound 5는 앞에서 구조 결정한 compound 1-4 와 유사한 물리적 성상 및 ¹H-NMR, ¹H-¹H-COSY을 가짐을 알 수 있었다. δ1.08(3H, d, H-9)과 δ0.93(3H, d, H-10)은 2개의 CH₃로 δ2.46(1H, m, H-8)가 연결되어 isopropyl group을 이루고 이 부분구조가 연결되어 valine 잔기가 되는 것으로 밝혀졌다.

이 모든 자료를 통합해 볼 때 compound 5는 앞에서 분리된 다른 화합물들과 마찬가지로 dikeopiperazine의 핵을 가진 DKP임을 추측할 수 있었다. 문헌 대조한 결과 이 화합물이 이미 알려진 *Cyclo*-(Pro-Val)로 밝혀졌다.^{29, 37)}

입체구조는 δ4.02(1H, s, H-2), δ4.19(1H, t, H-4)의 수치를 문헌 대조하여 D-valine구조임을 알 수 있었고 문헌의 [*a*]_D²⁰ -103(c 0.5,

MeOH)이 측정된 -127.7 ($c=0.5$, MeOH)의 $[\alpha]_D^{20}$ 값이 이를 뒷받침해 주었다.³⁷⁾ 따라서 compound 5는 *Cyclo*-(L-Pro-D-Leu)임을 알 수 있었다 (Fig. 24).

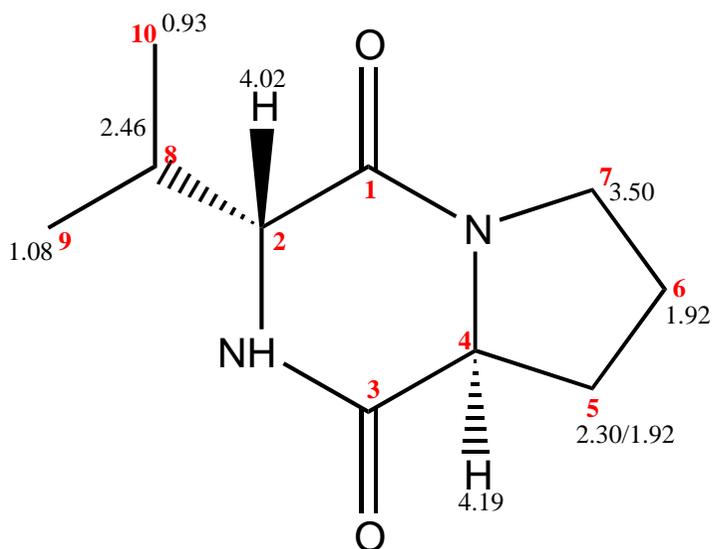


Fig. 24. Chemical structure of compound 5.

3.2 분리된 화합물(1~5)의 생리활성

Archangium gephyra KM593의 이차대사산물로부터 분리된 5개의 화합물은 모두 diketopiperazine 화합물로 밝혀졌다.

Diketopiperazines(2,5-diketopiperazines; Cyclo dipeptides or 2,5-dioxypiperazines; DOPs)는 1906년에 발견 되었으나 최근에 들어서 상당한 흥미를 가지게 된 화합물이다. 이들 compounds의 단순성과 제한적인 구조적 유연성으로 인해, diketopiperazine은 larger peptides의 공간적 이해에 대한 기준을 정하는데 이용되었고 여러 연구 논문에 model compounds 로 사용되었다.⁴³⁾

이 화합물들은 미래에 큰 기대를 거는 bioactive peptides들 중 상대적으로 미개척 분야에 있으며⁴⁴⁾ 현재 까지 알려진 활성으로는 antibacterial, fungicidal, herbicidal, antitumor, antiviral등이 있다.⁴⁵⁻⁴⁶⁾ 최근 significant bioactivity⁴⁷⁾와 소위, "quorum sensing"이라 불리는 박테리아의 cell-cell signalling mechanism역할로 인해 이 화합물에 대한 관심이 증가되고 있고 LuxR-mediated quorum sensing system of bacteria에 활성적이거나 대항하는(antagonise)기능을 하는 것으로 밝혀졌다.⁴⁸⁻⁴⁹⁾

본 연구에서는 ORAC assay 와 DPPH assay를 통해 *Archangium gephyra* KM593유래의 diketopiperazine화합물 1~5의 항산화 활성을 측정하였다.

1) 항산화활성(ORAC and DPPH assay)

항산화력 측정기법 중에서 radical 소거기능 측정법에는, ORAC, TEAC, ABTS, TRAP, DPPH, DCFH-METHOD 등이 있는데 이들 중 최근 해외서 항산화 기능을 갖는 식품원료 인증을 받기 위하여, U. S. Dept, Agriculture에서 표준화한 실험 기법으로 ORAC를 선택하고 있는 추세이다.

ORAC assay(Oxygen Radical Absorbance Capacity)는 AUC(Area Under the Curve)를 측정해 free radical 손상에 대한 정도를 측정하는 일종의 inhibition method로써 Reaction 과정은 Buffer와 Sample, FL solution을 mix한 후, radical generator인 AAPH를 첨가함으로써 반응이 시작되고 이 원리는 AAPH에 의하여 FL decay가 일어나는데 Antioxidant가 존재하면 FL decay반응이 억제된다는 것을 이용한 것이다.

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 매우 안정한 free radical로 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 유기용매에 아주 안정하고 proton-radical scavenger에 의해 탈색되므로 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있기에 DPPH assay는 가장 널리 이용되고 있는 항산화 효과 측정법이다.

ORAC assay에서 대조물질로 쓰인 Trolox를 1로 보았을 때 화합물 1은 대조물질보다 더 강한 활성을 가짐을 알 수 있었고 화합물 3역시 화합물 1에 미치지 않으나 상당한 항산화활성을 가짐을 알 수 있었다.

그러나 이들 화합물은 DPPH assay에서는 모두 활성을 나타내지 않았다 (Table 15).

화합물 1과 3은 phenyl group의 존재로 인해 상당한 항산화 활성을 가진 것으로 추정되는데 흥미롭게도 동일한 화합물인 1과 3이 그들의 입체구조의 차이로 인해 다른 항산화력을 가졌다. 이 결과를 토대로 이들 화합물의 입체구조가 항산화력의 증가와 감소에 큰 영향을 끼침을 알 수 있었고 이들 상관관계에 대한 정립을 위해 후속연구가 수행될 필요가 있다.

Table 15. Antioxidant activities of compounds 1 ~ 5

	ORAC assay ^a	DPPH assay ^b
Compound 1	1.724	n.t. ^c
Compound 2	0.872	200<
Compound 3	0.904	200<
Compound 4	0.545	200<
Compound 5	0.079	200<

^a ORAC values are expressed as relative Trolox equivalent.

^b DPPH IC₅₀($\mu\text{g/ml}$) are compared with Ascorbic acid.

^c n.t.= not tested

IV. 결 론

자연계에는 아직 잘 알려져 있지 않은 미생물이 많은데 그 중 하나로 점액세균을 들 수 있다. 이 세균은 기아, 고형 표면체의 존재, 균밀도 증가 등의 조건에서는 개개의 세포가 모여 집합체를 이루어 점차 성숙함에 따라 육안으로도 확인할 수 있을 정도의 자실체(fruiting body)로 발달하며, 그 내부에서는 모여든 세포가 점액성 포자(myxospore)로 변화하는 대단히 특이한 cell cycle을 가진 세균을 이들 하나 하나의 세포들이 모여들어 형성되는 자실체는 그 모양이 다양할 뿐만 아니라 그들 중에는 여러 형태로 잘 분화된 것들도 많다. 점액세균은 Bergey's Manual(9th)의 제 2부 gram 음성 활주세균(gliding bacteria)에 속하는 세균의 총칭으로 *Myxococcus*, *Corallocooccus*, *Angiococcus*, *Archangium*, *Cystobacter*, *Mellittangium*, *Stigmatella*, *Haploangium*, *Nannocystis*, *Polangium*, *Chondromyces*, *Sorangium*의 12속으로 구성되어 있다.

본 연구는 국내 토양에서 분리한 용균성 점액세균 *Archangium* sp.의 분리법을 확립하고 분리하고 동정해 그 균주가 생산하는 대사산물에 대한 조사목적으로 하였다.

국내 토양에서 분리한 점액세균 245종 중 용균성 점액세균은 약 75%를 차지하였고 그 중에서 *Archangium*속 점액세균은 약 25%를 차지했다. 분리된 *Archangium*속을 대상으로 화학적 스크리닝과 생물학적 스크리닝을 실시해 Vanillin-sulfuric acid 발색시약에 특이한 흰색 반응을 보이고 강한 항산화력을 가진 대사산물을 생산하는 균주 KM593을 연구대상으로 선정하였다.

균주 KM593은 경기도 안산 토양에서 분리되었으며 형태학적·생화학적 특성과 배양상의 특성을 바탕으로 *Archangium gephyra*로 동정하였다.

Archangium gephyra KM593을 액체배양을 통해 확보한 이차대사산물로

부터 5개의 diketopiperazine 화합물을 분리하였다.

각종 NMR과 IR 스펙트럼, $[\alpha]_D^{20}$, Solubility같은 화학적 특성을 토대로 분리된 5개의 diketopiperazine 화합물들은 각각 Cyclo(L-Pro-L-Tyr), Cyclo(L-Pro-L-Phe), Cyclo(D-Pro-L-Tyr), Cyclo(L-Pro-L-Leu), Cyclo(L-Pro-D-Val) 이었으며 ORAC assay 한 결과 compound 1 즉, Cyclo(L-Pro-L-Tyr)이 가장 높은 항산화활성을 보였다.

DKPs는 자연계를 통틀어 어디에나 존재하며²⁸⁾ 가장 일반적으로는 육상의 효모 및 지의류, 곰팡이 등의 배양물에서 분리되었고 또한 해양세균이나⁵⁰⁾ 방선균⁵¹⁾ 및 sponge,³⁷⁾ starfish⁵²⁾에서도 분리된 바가 있지만 점액세균의 대사산물에서 diketopiperazine의 분리는 본 연구를 통해 처음으로 밝혀진 사실이다.

V. 참고문헌

1. 안종웅, 정영훈, 정유섭, 지옥표, 2002, The Discovery of Promising New Leaders for Anticancer Drug Development from Myxobacteria., 21세기 바이오 산업과 천연물과학 심포지움, 서울대학교.
2. Reichenbach H., 2001, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 149–156.
3. Helge B. Bode, Rolf Müller, 2006, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33** 577–588.
4. Arthur L. Koch, David White, 1998, The social lifestyle of myxobacteria., *Bioassays*, **20**, 1030–1038.
5. Kroos, L., A. Kuspa, and D. Kaiser., 1986, A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*., *Dev. Biol.*, **117**, 252–266.
6. LiPing Zhang, HaiYing Wang, 2003, Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strain., *J. Microbiol. Method.*, **54**, 21–27.
7. Reichenbach H., Höfle G., 1993, *Biotech. Adv.*, **11**, 219.
8. Reichenbach H., Höfle G., 1995, In *Myxobacteria II*; Dworkin, M., Kaiser, D., Eds., American Society for Microbiology, Washington., 347.
9. Reichenbach H., Höfle G., 1999, Myxobacteria as a producers of Secondary metabolites; In Grabley S., Thiericke, R., (Eds), *Drug Discovery from nature*, Springer Verlag, Berlin, 149–179.

10. 조경연, 2001, Myxobacteria의 군집생활, 자실체 형성 및 생리활성물질의 생산., 생물산업, **14**, 11-16.
11. Holt J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, 1994, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.
12. Sasse F., Steinmetz H., Höfle G., Reichenbach, H., 1994, Gephyronic Acid, a Novel Inhibitor of Eukaryotic Protein Synthesis from *Archangium gephyra*(Myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action., *J. Antibiot.*, **48**, 21-25.
13. Sasse F., Steinmetz H., Heil J., Höfle G., Reichenbach, H., 2000, Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties., *J. Antibiot.*, **53**, 879-885.
14. Huss M., Sasse F., Kunze B., Jansen R. and et al., 2005, Achazolid and apicularen: Novel specific V-ATPase inhibitor., *BMC Biochemistry*, **6**:13, 1-10.
15. Sasse F., Steinmetz H., Höfle G., Reichenbach, H., 2003, Achazolids , New cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties., *J. Antibiot.*(Tokyo), **56**, 520-525.
16. Hassfeld J., Fares C., Steinmetz H., Carlomagno T., Menche D., Stereochemical Determination of Archazolid A and B, Highly Potent V-ATPase Inhibitors from the Myxobacterium *Archangium gephyra*.

17. Irschik H., Gerth K., Kemmer T., Steinmetz H., Reichenbach, H., 1983, The myxovalgins, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus*(Myxobacterales). I. Cultivation, isolation, and some chemical and biological properties., *J. Antibiot.*, **36**, 6–12.
18. Kunze B., Reichenbach H., Müller R., Höfle G., 2005, Aurafuron A and B, New Bioactive Polyketides from *Stigmatella aurantoca* and *Archangium gephyra*(Myxobacteria)., *J. Antibiot.*, **58**, 244–251.
19. Sasse F., Bohlendorf B. and et al, 1999, Melithiazols, new methoxy acrylate inhibitor of the respiratory chain isolated from myxobacteria. Production, isolation, physico–chemical and biological properties., *J. Antibiot.*, **52**, 721–729.
20. Sasse F., Steinmetz H., Heil J., Höfle G., Reichenbach, H. and et al, 2002, Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physico–chemical and biological properties., *J. Antibiot.*, **55**, 543–551.
21. 김용석, 배우철, 박성진, 2003, Myxobacteria의 생리활성 물질., *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 1–12.
22. Reichenbach H., Dworkin, M., In Balows, A. H. G. Truper, M. Dworkin(eds.), 1992, *The Prokaryotes*(2nd ed.), Springer Verlag, New York, The *Myxobacteria*, 3416–3487.
23. L. Koch, and D. White., 1998, The social lifestyle of myxobacteria., *Bioassays*, **20**, 1030–1038.

24. Matthew T.G. Holden, 1999, Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria., *Molecular Microbiology*, **33**(6), 1254-1266.
25. Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A.H.B., Prior, R.L., 1995, Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II., *Clin. Chem.*, **41**, 1738-1744.
26. Cao, G., Alessio, H. M., Culter, R., 1991, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants., *Free Radical Biol. Med.*, **14**, 303-311.
27. Ou, B., Maureen, H-W., Prior, R.L., 2001, Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4619.
28. Mohamed Attia Shaaban Mahmoud, 2004, Bioactive Secondary Metabolites from Marine and Terrestrial Bacteria. Isoquinolinequinones, Bacterial Compounds with a Novel Pharmacophore, *Dissertation, University of Göttingen*
29. Hefni Effendi, 2004, Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge-derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali sea (Indonesia), *Dissertation, University of Düsseldorf*
30. Salvatore De Rosa, 2003, Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides., *Biomolecular Engineering*, **20**, 311-316.

31. 농업과학기술원, 농림부 최종연구보고서 2002, 고효성 유도저항성 근원균(EXTN-1)의 실용기술 개발.
32. Young chul Park, 2006, Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Chromocleista* sp. Isolated from a Deep-Water Sediment Sample collected in the Gulf of Mexico., *J. Nat. Prod.*, **69**, 580-584.
33. Andrea C. Stierle et al., 1988, Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8008-8011.
34. Park D-K, Lee K-E, Baek C-H, Kim IH, Kwon J-H, Lee WK, Lee K-H, Kim B-S, Choi S-H, Kim K-S., 2006, Cyclo (Phe-Pro) modulates the expression of ompU in *Vibrio* spp., *Journal of Bacteriology*, **188**(6), March 06, 2214-2221.
35. Takashi Tatsuno et al., 1971, Recherches Toxicologiques des Substances Metaboliques du *Fusarium nivale*.VII. La Quatrieme Substance Metabolique de *F .nivale*., *Chem. Pharm. Bull.*, **19**(7), 1488-1500.
36. Dae-Kyun Park, Mar. 2006, Cyclo(Phe-Pro) Modulates the Expression of *ompU* in *Vibrio* spp., *J. Bacteriology*, **188**(6), 2214-2221.
37. M. Adamczeski, A. R. Read, P. Crews, 1995, New and known diketopiperazines from the caribbean sponge, *Calyx* CF. *Prodatypa*., *J. Nat. Prod.*, **58**, 201-208.
38. Irene Wagner-Dobler., Integrated Approach To Explore the Potential of Marine Microorganisms for the Production of Bioactive Metabolites., *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*., **74**.

39. Masanobu Munekata et al., 1981, Selective Inhibition of SV40-transformed Cell Growth by Diketopiperazines., *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**(11), 2613–2618.
40. Niede A. J. C. Furtado, 2005, Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain., *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**, (6B), 1448–1453.
41. Jayatilake, G. S., Thornton, M. P. et al., 1996, Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*., *J. Nat. Prod.*, **59**, 293–296.
42. Pei-Sheng Yan et al., 2004 Dec., Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl) Produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*., *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(12), 7466–7473.
43. Milne, PJ, Graz, CJM, Rostoll, K & Hunt, AL., 1998, The biological activity of selected cyclo dipeptides., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 1–8.
44. Salvatore De Rosa., 2003, Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides., *Biomolecular Engineering*, **20**, 311–316.
45. Sarath P. Gunasekera., 2003, Discorhabdins S, T, and U, New Cytotoxic Pyrroloiminoquinones from a Deep-Water Caribbean Sponge of the Genus *Batzlila*., *J. Nat. Prod.*, **66**, 1615–1617.
46. Min Chu et al., 1995, Inhibition of *c-fos* Proto-oncogene Induction by Sch 52900 and Sch 52901, Novel Diketopiperazines Produced by

- Gliocladium* sp., *J. Antibiotics*, **48**, 1440–1445.
47. Chandan Prasad, 1995, Bioactive Cyclic Dipeptides, *Peptides*, **16**(1), 151–164.
48. Degrassi G. et al., 2002, Plant Growth–Promoting *Pseudomonas putida* WCS358 Produces and Secretes Four Cyclic Dipeptides, Cross–Talk with Quorum Sensing Bacterial Sensors, *Curr. Microbiol.*, **45**, 250–254.
49. Matthew T. G. Holden., 1999, Quorum–sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram–negative bacteria., *Molecular Microbiology*, **33**(6), 1254–1266.
50. A. C. Stierle, J. H. Cardellina, G. A. Strobel., 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **85**, 8008–8011.
51. J. Trischman., 1993, *Dissertation, University of California, San Diego*
52. G. R. Pettit, R. B. Von Dreele, G. G. Bolliger, P. M. Traxler, P. Brown., 1973, *Experientia*, **29**, 521.

부 록

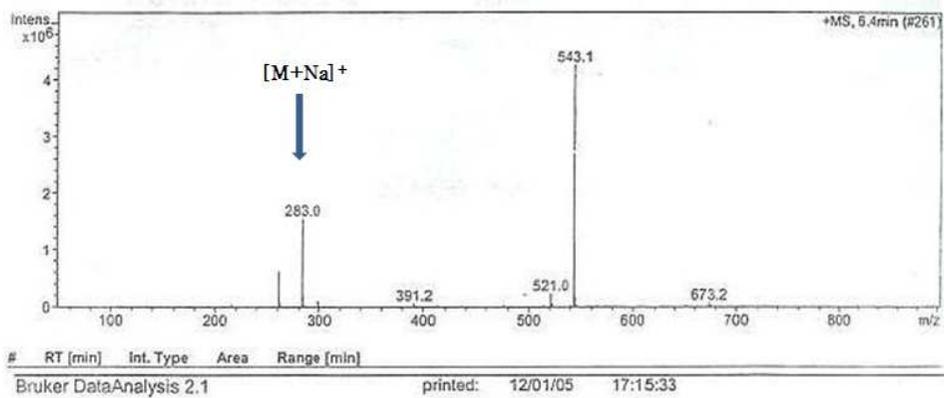


Fig. 25. ESIMS of compound 1.

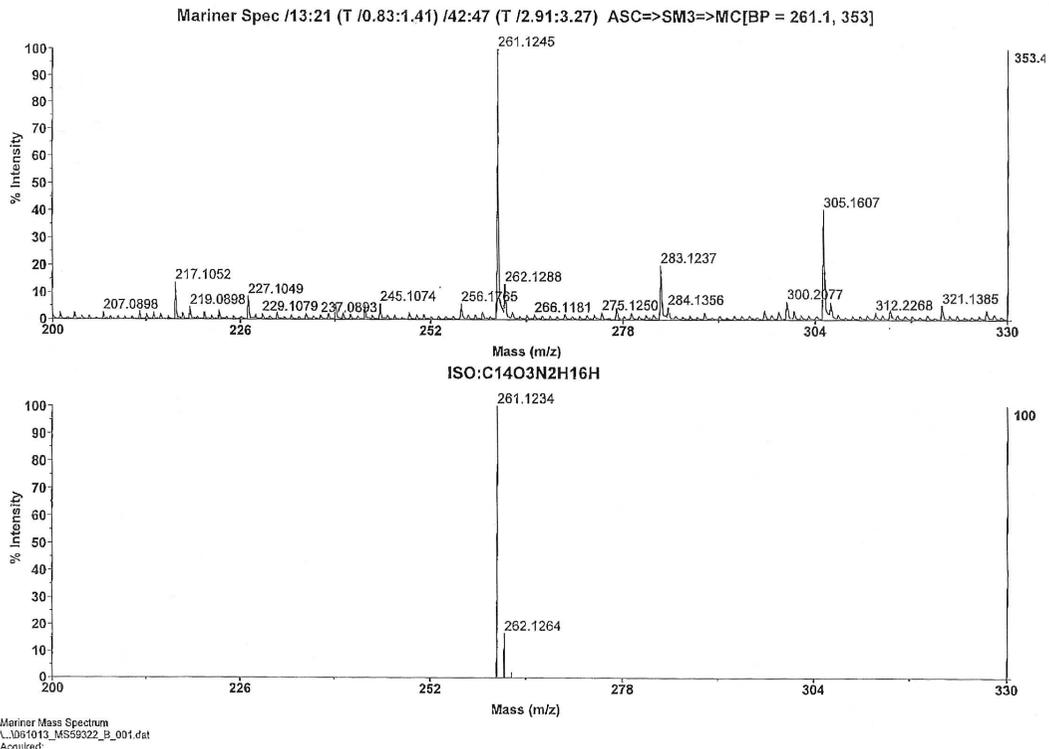


Fig. 26. HR-ESIMS of compound 1.

Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Operator: vmer1
INOVA-500 "kobs1"
Relax, delay 2.000 sec
Acq. time 9.229 sec
Width 4473.3 Hz
2D Width 21361.8 Hz
64 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.7309866 MHz
DECOUPLE C13, 125.6666508 MHz
Power 35 dB
on during acquisition
off during delay
V40_prgw modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.106 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.009 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 10 hr, 25 min, 48 sec

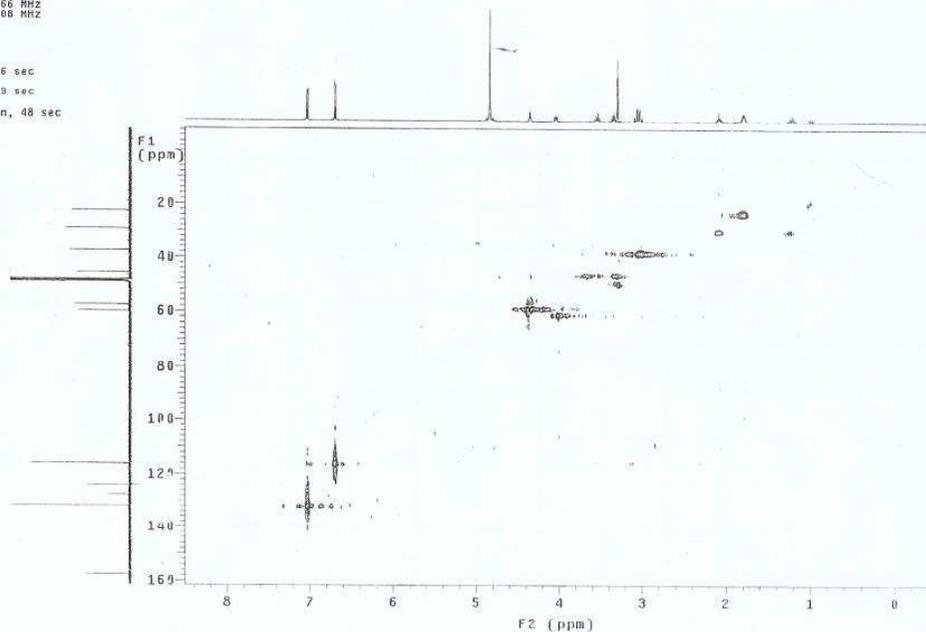
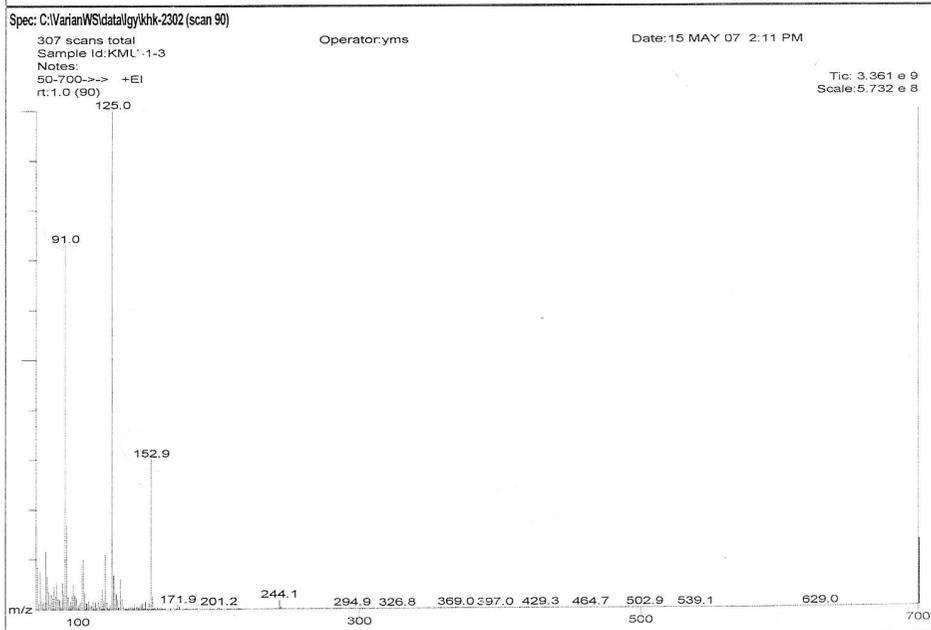
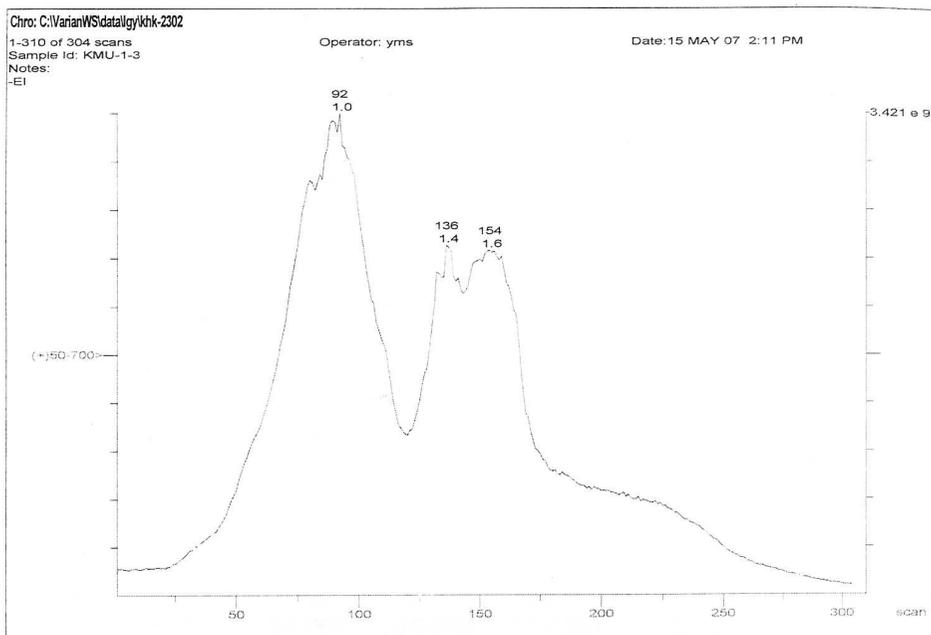


Fig. 27. HMQC spectrum of compound 1(in CD₃OD, 125MHz).



MAY 15 2007 02:17:47 PM

Varian 1200

Fig. 28. EIMS of compound 2.

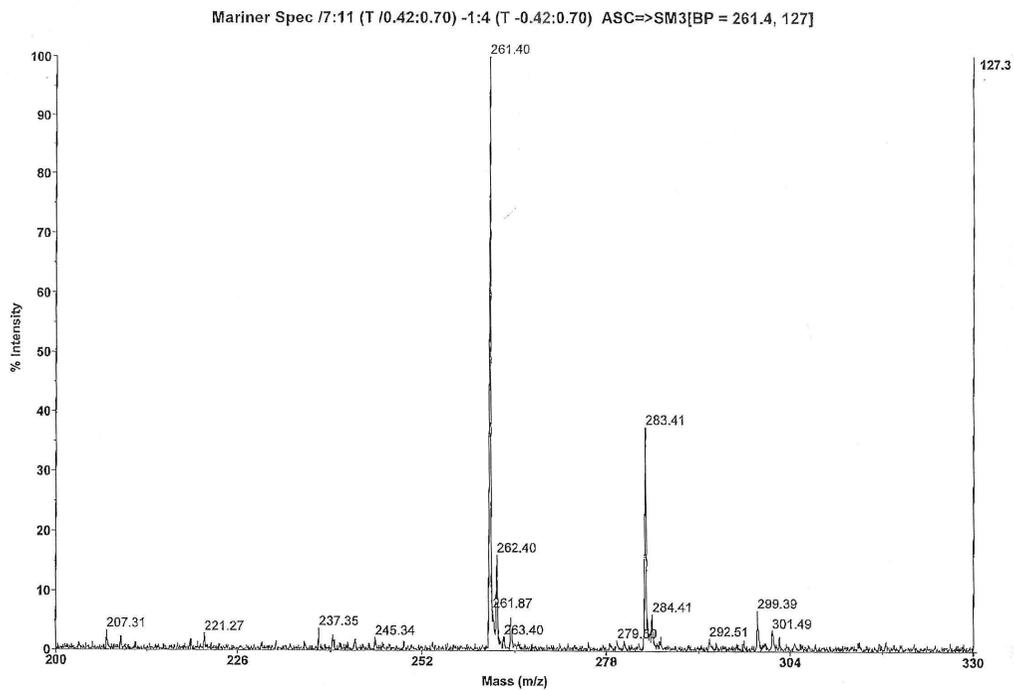


Fig. 29. ESIMS of compound 3.

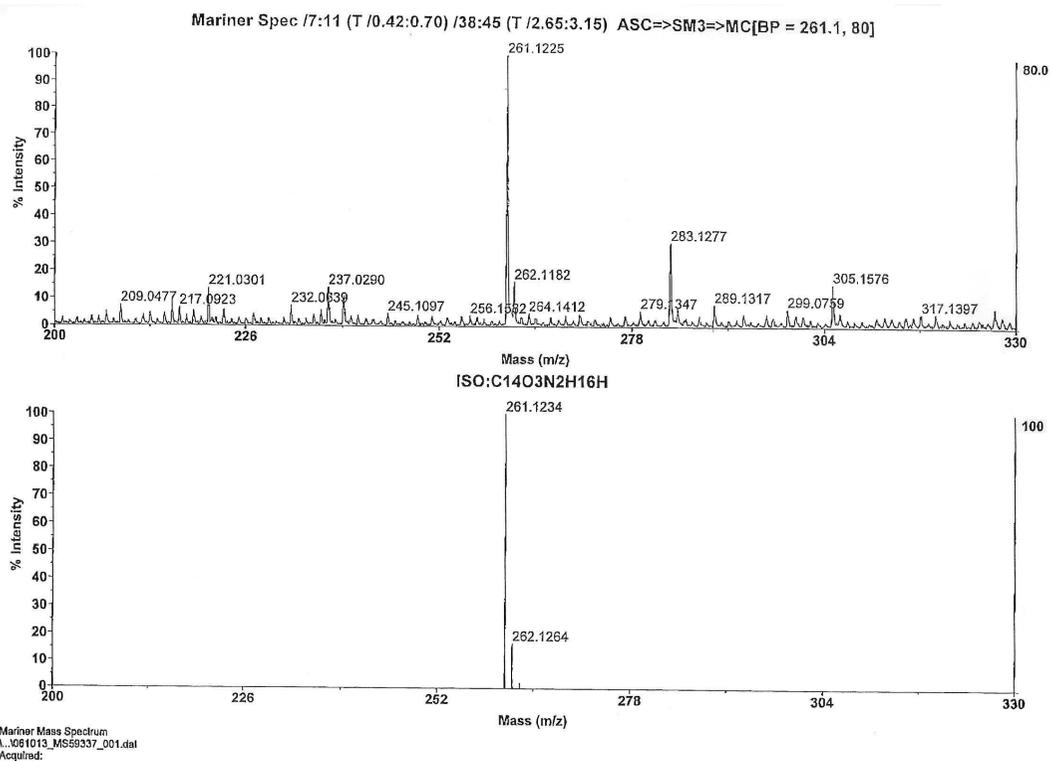


Fig. 30. HR-ESIMS of compound 3.

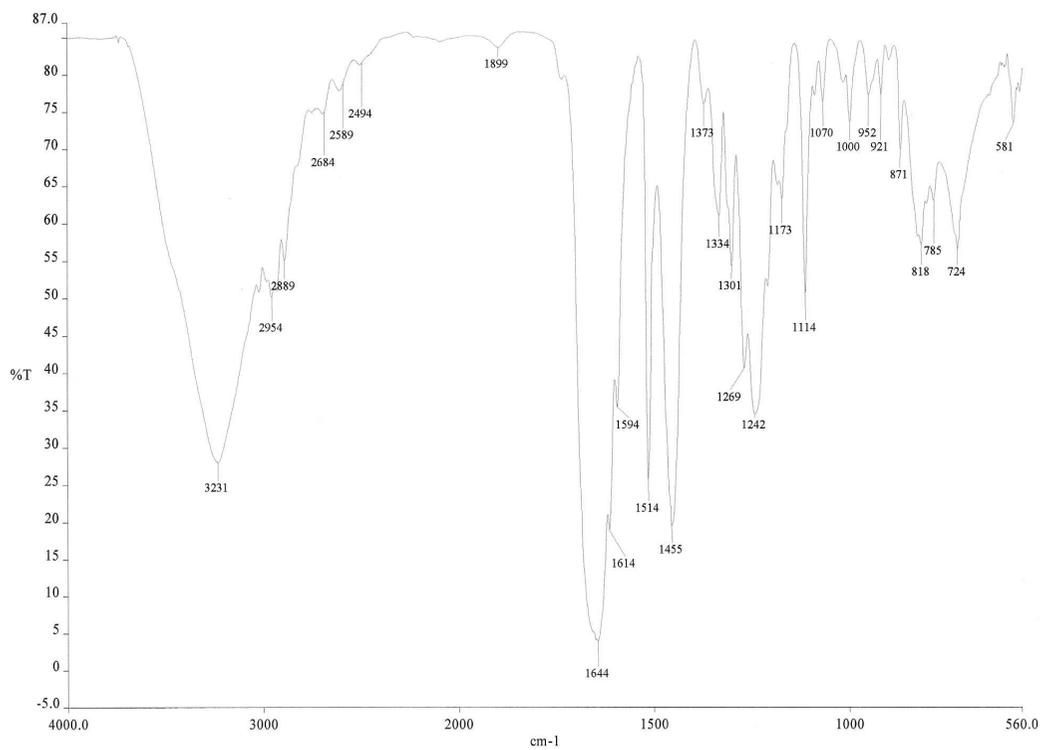


Fig. 31. IR Spectrum of compound 3 (in MeOH).

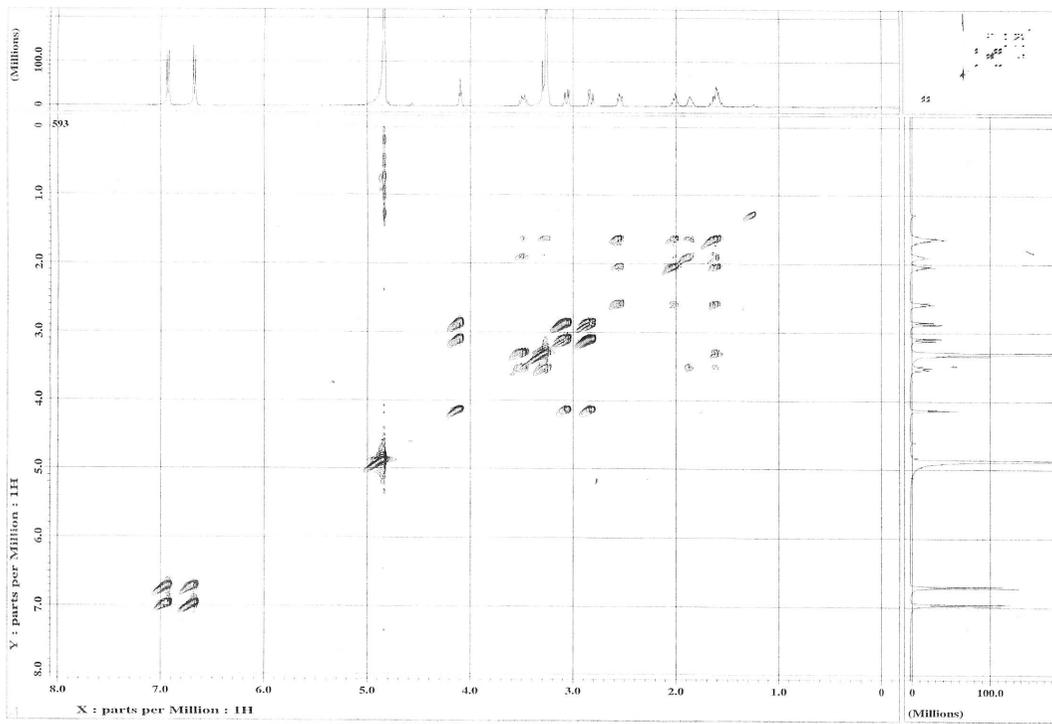


Fig. 32. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 3 (in CD_3OD , 400MHz).

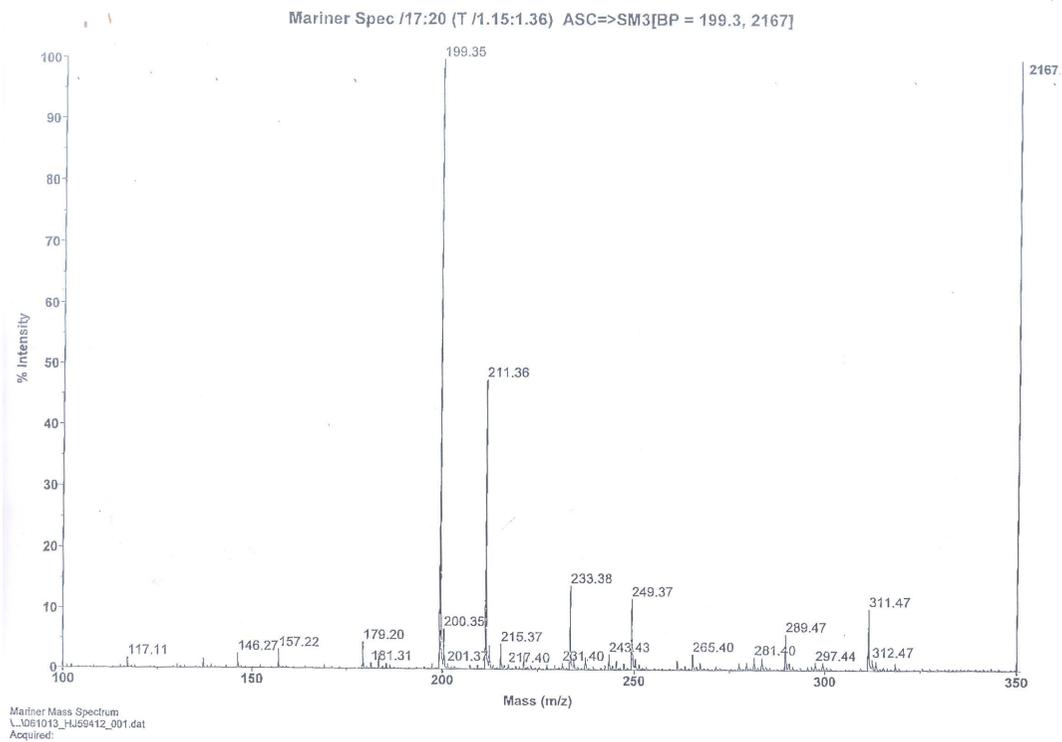


Fig. 33. ESIMS of compound 4.

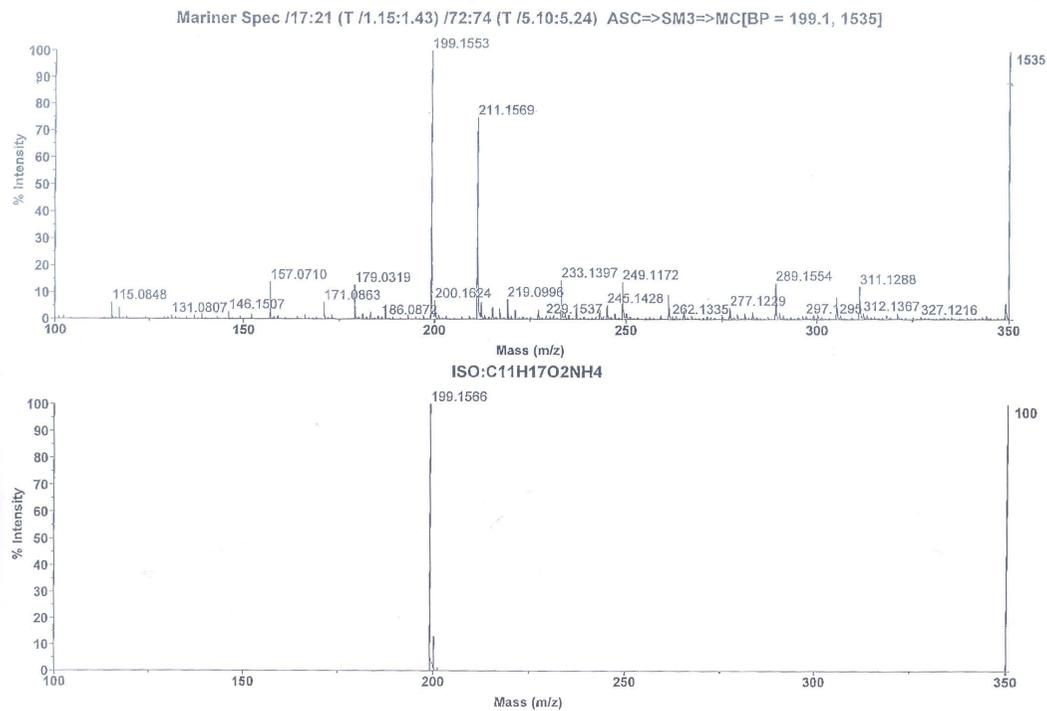


Fig. 34. HR-ESIMS of compound 4.

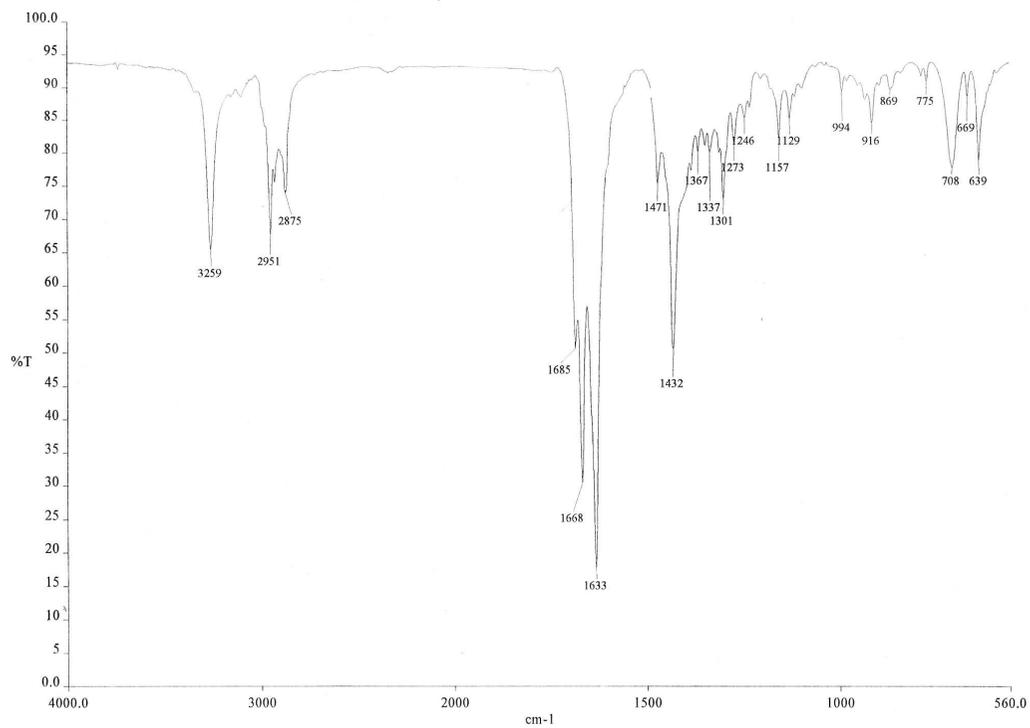


Fig. 35. IR Spectrum of compound 4 (in MeOH).

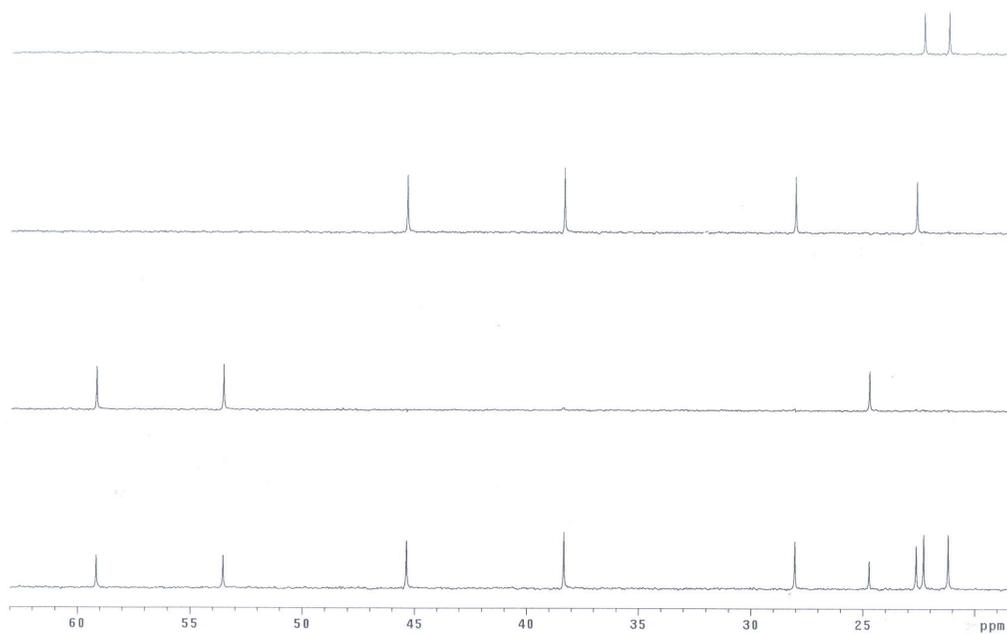


Fig. 36. DEPT spectrum of compound 4 (in CD₃OD, 75MHz).

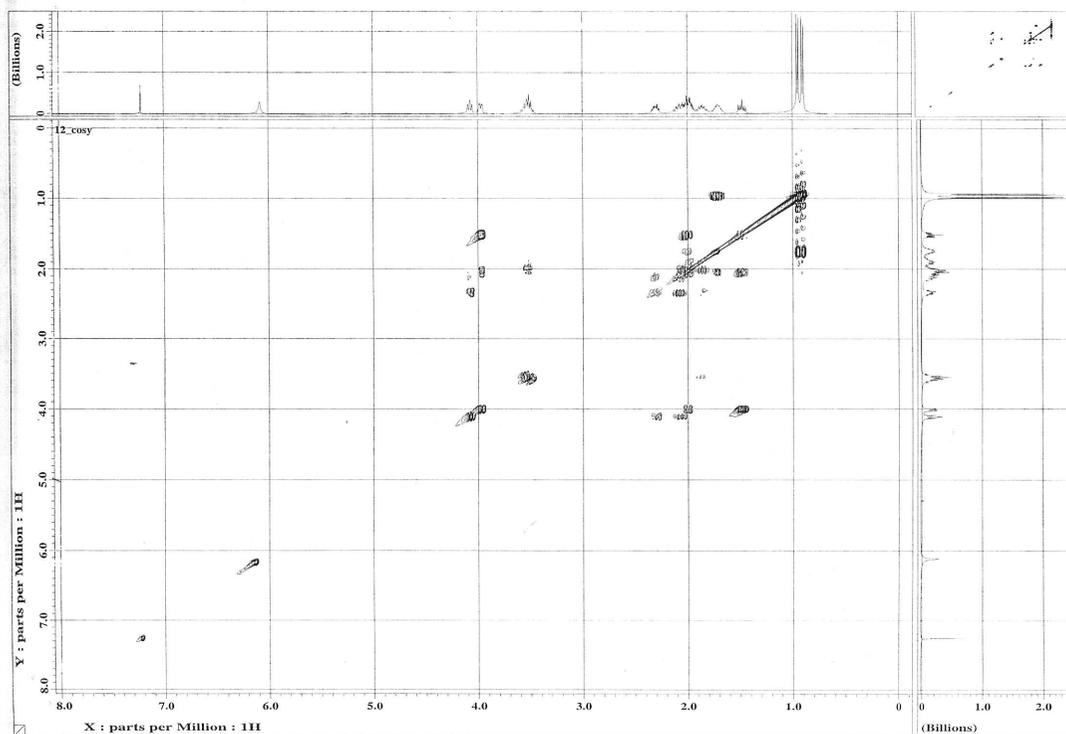


Fig. 37. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 4 (in CD_3OD , 400MHz).

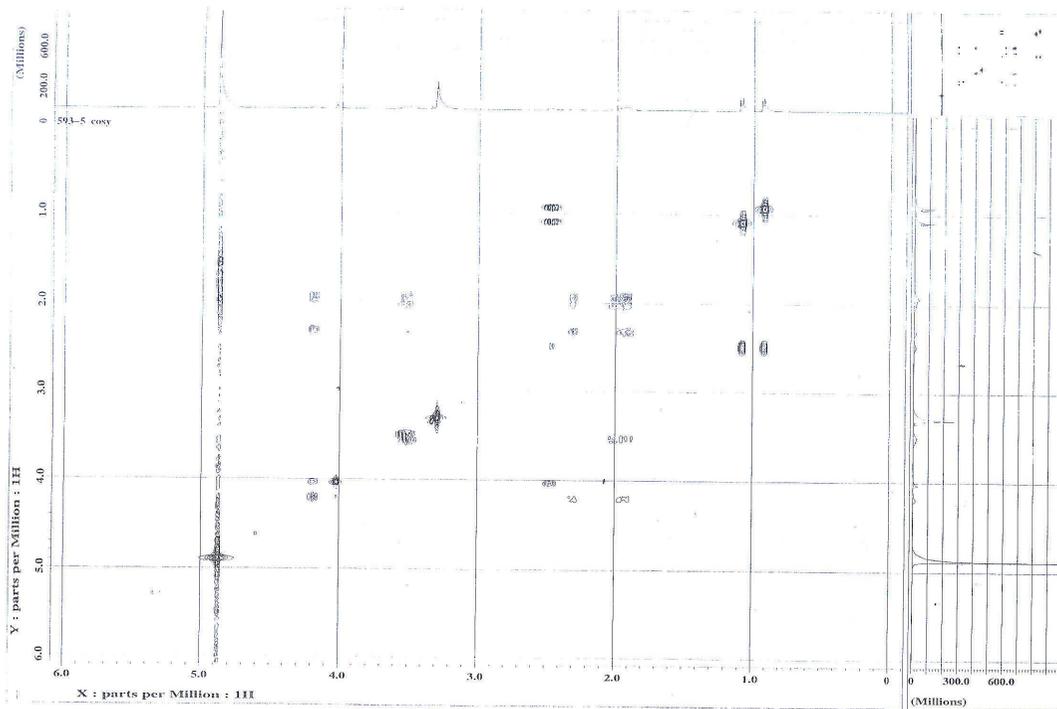


Fig. 38. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 5 (in CD_3OD , 400MHz).