

이학석사 학위논문

*Chondromyces apiculatus*가
생산하는 세포 독성 물질의
분리 및 구조 결정

Isolation and structure elucidation of cytotoxic
compounds from *Chondromyces apiculatus*

2007년 11월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

황 현 진

이학석사 학위논문

*Chondromyces apiculatus*가
생산하는 세포 독성 물질의
분리 및 구조 결정

Isolation and structure elucidation of cytotoxic
compounds from *Chondromyces apiculatus*

지도교수 안 종 응

2007년 11월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

황 현 진

본 논문을 황현진의 이학석사 학위논문으로 인준함.

위원장 이학박사 김 영 섭 인

위 원 공학박사 손 병 일 인

위 원 농학박사 안 중 응 인

2007년 11월

한국해양대학교 대학원

목 차

	page
LIST OF TABLES	i
LIST OF FIGURES	ii
LIST OF ABBREVIATIONS	iii
ABSTRACT	1
I. 서 론	4
II. 실험 재료 및 방법	7
1. 기기 및 시약	7
1.1. 실험 기구 및 기기	7
1.2. 시약 및 배지의 조성	8
2. <i>Chondromyces apiculatus</i> 의 분리 및 배양	18
2.1. <i>Chondromyces apiculatus</i> 의 분리 및 동정	18
2.2. <i>Chondromyces apiculatus</i> 의 배양	21
3. 대사 산물의 추출 및 분리, 정제	23
3.1. 추출 및 분획	23
3.2. 분리 및 정제	25

4. 생물 활성 측정	26
4.1. 세포 독성	26
4.2. 항산화 활성	28
4.3. 항균 활성	30
IV. 결과 및 고찰	31
1. 점액 세균의 분리	31
2. 균주 JW 480의 동정	34
3. <i>Chondromyces apiculatus</i> 가 생산하는 대사 산물의 분리 및 구조 결정	36
3.1. 항암 활성 물질의 분리 및 구조 결정	37
3.2. Diketopiperazine 화합물의 분리 및 구조 결정	54
IV. 결 론	66
V. 참고 문헌	68

부 록

맺 음 말

LIST OF TABLES

	Page
Table 1. Composition of WCX Agar medium	10
Table 2. Composition of VY/2 Agar medium	11
Table 3. Composition of Nutrient Agar medium	12
Table 4. Composition of Micrococcus medium	12
Table 5. Composition of Yeast Extract Agar medium	13
Table 6. Composition of CAS medium	13
Table 7. Composition of TES	14
Table 8. Composition of <i>Chondromyces apiculatus</i> liquid medium	15
Table 9. Myxobacterial strains isolated from soil samples	32
Table 10. HPLC condition for analysis of compound 1	38
Table 11. Physico-chemical properties of compound 1.....	39
Table 12. ¹ H and ¹³ C NMR spectral data of compound 1	49
Table 13. Cytotoxic activity of compound 1	52
Table 14. Antimicrobial activity of compound 1.....	53
Table 15. HPLC condition for analysis of compound 2	55
Table 16. Physico-chemical properties of compound 2	56
Table 17. ¹ H and ¹³ C NMR spectral data of compound 2	62
Table 18. Antioxidant activity of compound 2	64
Table 19. Antimicrobial activity of compound 2	65

LIST OF FIGURES

	Page
Fig. 1. Isolation of bacteriolytic myxobacteria.	20
Fig. 2. Shaking culture of strain JW 480	22
Fig. 3. Work-up scheme of strain JW 480	24
Fig. 4. Fruiting body of myxobacteria	33
Fig. 5. Fruiting body of <i>Chondromyces sp.</i>	35
Fig. 6. Fruiting body of strain JW 480	35
Fig. 7. Isolation of compounds 1 and 2	36
Fig. 8. HPLC profile and UV spectrum of compound 1	37
Fig. 9. ¹ H-NMR spectrum of compound 1	40
Fig. 10. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1	41
Fig. 11. HMBC spectrum of compound 1	42
Fig. 12. Partial structures (1) of compound 1	42
Fig. 13. DEPT spectrum of compound 1	43
Fig. 14. HMQC spectrum of compound 1	44
Fig. 15. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 1	45
Fig. 16. Partial structures (2) of compound 1	46
Fig. 17. ¹ H- ¹ H COSY and HMBC correlations of compound 1	47
Fig. 18. IR spectrum of compound 1	48
Fig. 19. Structure of compound 1	50
Fig. 20. Structures of Apicularen A and Salicylihalamide A	51
Fig. 21. HPLC profile and UV spectrum of compound 2	54
Fig. 22. ¹ H-NMR spectrum of compound 2	57
Fig. 23. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2	58
Fig. 24. DEPT spectrum of compound 2	59
Fig. 25. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 2	60
Fig. 26. Partial structures of compound 2	60
Fig. 27. ¹ H- ¹ H COSY and HMBC correlations of compound 2	61
Fig. 28. Structure of compound 2	63

LIST OF ABBREVIATIONS

- c.c : column chromatography
- CDCl₃ : deuterium trichloromethane
- CD₃OD : deuterium methanol
- ¹³C-NMR : carbon 13 nuclear magnetic resonance
- COSY : homonuclear correlation spectroscopy
- DEPT : distortionless enhancement by polarization transfer
- DMSO : dimethyl sulfoxide
- EtOAc : ethyl acetate
- EtOH : ethanol
- Fig. : figure
- HMBC : heteronuclear multiple-bond connectivity
- HMQC : heteronuclear multiple-quantum connectivity
- ¹H-NMR : proton nuclear magnetic resonance
- HPLC : high performance liquid chromatography
- IHD : index of hydrogen deficiency
- IR : Infrared
- MeOH : methanol
- MC : methylene chloride
- RP : reverse-phased
- TLC : thin layer chromatography
- UV : ultraviolet
- XE : XAD extract

Isolation and structure elucidation of cytotoxic compound from *Chondromyces apiculatus*

Hyun-Jin Hwang

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

(Advisor : Professor Jong-Woong Ahn)

ABSTRACT

The myxobacteria are single cell bacteria that display a remarkable cooperative multicellular behavior during their life cycle(1). Myxobacteria are gram-negative and move by gliding and form diffusive spreading colonies or so-called "swarms"(2,3). Their cells are appear in two basic shapes : either slender with tapering ends, or cylindrical with blunt, rounded ends(4). They form characteristic fruiting bodies and microcysts under certain conditions. Starvation initiates a sequence of developmental stages culminating after several hours in the formation of multicellular fruiting body. Shortly before the nascent fruiting body aggregates start

forming the surface of the colony often displays an elaborate pattern of propagating waves, called 'ripples'(5,6). These waves reflect the local bacterial density, with dense crests appearing much darker than the more sparsely populated troughs(7,8).

In general, the isolation of myxobacteria of all types can be a time-consuming and often tedious process. They are usually obtained from herbivore dung, decaying plant material and bark of living and dead trees by placing samples of these materials in a moist chamber and observing them frequently for the development of characteristic fruiting bodies(9).

The number of strain named to date is small compared to other bacteria. Therefore, fundamental studies of the myxobacteria are rather limited in certain species, and are restricted to morphology.

In 1892 Thaxter reported on the morphology and classification of the myxobacteria(10). McCURDY(11-15) group paid attention to the isolation and classification of this group of bacteria, and proposed a classification system based on the morphology of fruiting bodies and microcysts. MASUDA(16) published morphological study of fruiting bodies of a myxobacterium, and Abe et al.(17) reported isolation and purification methods and described their properties. However, little is known about the ecology of myxobacteria, and information about their physiology, biochemistry, chemotaxonomy, and phylogeny is limited. The practical importance of myxobacteria has not been fully determined. However, recent studies have shown this group of microorganisms to be useful sources for producing secondary metabolites(18,19).

Myxobacteria are prolific producers of a variety of bioactive secondary metabolites including antibacterial, antifungal, antiviral and antitumor compounds. Remarkably, Reichenbach found that 60-80% of the

myxobacteria tested had antibacterial or antifungal activity(9).

The isolation methods we have used are the placing soil on bacterial smears, the filter paper method, and the agar medium method. Placing soil on bacterial smears was easy to manage.

In the course of a screening for biologically active metabolites from myxobacteria, *Chondromyces apiculatus* strain JW480 was found to produce apicularen A and cyclo-leucylproryl(20). These compounds were finally purified by diode array detected HPLC. The structure of these compounds were elucidated by spectroscopic analyses.

Apicularen A demonstrated potent cytotoxicity against cultivated human cells. A cometabolite of apicularen A, the cyclo-leucylproryl was not cytotoxic, and showed weak antioxidant activity. None of the tested bacteria and yeast were inhibited.

Apicularen A is a novel macrolide with a unique unsaturated amide side chain(21). Apicularen A shows a remarkable structural similarity to Salicylihalamide A , a compound isolated from marine sponge *Haliclona* sp., but has much less cytotoxicity. There is also a structural relationship to the Lobatamides A and B, novel cytotoxic macrolides, isolated from the tunicate *Aplidium lobatum*(22).

keywords : *Chondromyces apiculatus*, myxobacteria, Apicularen A, Cyclo-leucylproryl, cytotoxic, antioxidant

I. 서론

생리 활성 물질을 발견하기 위하여 자연계에 대한 탐구는 오랜 시간동안 지속되었고, 미생물로부터 생리 활성 물질을 찾는 연구가 많이 진행되었다. 그 결과 지금까지 발견된 미생물 유래 생리 활성 물질은 약 8000-10000개 정도로 추정되고 있다. 이들 물질들은 소수의 미생물로부터 발견되었고, 전체 물질 중 65%는 Actinomycetales로부터, 7%는 *Bacillus*로부터, 1.5%는 *Pseudomonads*로부터, 나머지 20%는 곰팡이로부터 발견되었다(23). 그러나 기존 미생물로부터 신규 물질을 찾아내는 빈도가 감소함에 따라 특이적인 미생물로부터 신규 물질을 탐색하는데 관심을 돌리게 되었고 최근 점액 세균(Myxobacteria)이 주목을 받게 되었다. 점액 세균은 그람 음성의 단세포 호기성 토양 박테리아로 두께는 0.6-1.0 μm , 길이는 약 3-10 μm 정도의 막대 모양의 간균이다. 또한 점액 세균은 활주 세균(gliding bacteria)에 속하면서 spore의 자실체를 형성하는 등 세균과 진균의 특징을 모두 지닌 미생물로서 원핵 생물 중에서 가장 복잡한 life cycle을 갖고 있다(24). 즉 이들은 일정한 환경 하에서 영양세포가 제각기 모여들어 집합체를 이루며(25), 점차 성숙함에 따라 육안으로도 확인할 수 있을 정도의 자실체로 발달하고, 그 내부에 모여든 세포들은 점액성 포자(myxospore)로 변환하는 특이한 cycle을 이루고 있다. 활주 운동에 의해 이동하는 점액 세균은 집락이 고체 표면에 얇은 막처럼 펼쳐져 있는 모습이며, 영양분이 결핍되면 자실체를 형성하게 되고 각각 구형 또는 타원형의 포자로 변형된다.

또한 점액 세균은 타 미생물을 용해하여 영양원으로 하는 용균성 점액 세균(bacteriolytic myxobacteria)과 세루로오스를 용해하는 세루로오스 용해성 점액 세균(cellulolytic myxobacteria)으로 대별된다(26,27). 점액 세균은 토양 내에 서식하고 처음 동물의 분에서 분리되었기 때문에 dung organism으로 여겨진 때도 있었는데 일반적으로 흙덩이, 나무껍질, 썩은 식물 조직, 동물의 배

설물 등을 기질로 생육한다. 이들은 가끔 육안으로도 관찰되는 흔한 미생물이지만 근래까지 크게 주목받지 못하였을 뿐만 아니라 일반 토양 생물로도 인정받지 못하였는데 이의 주된 이유는 자연계로부터 분리가 어렵고 배양이 까다롭기 때문이다. 즉 점액 세균은 타 세균이나 미생물을 분리하는 통상의 기술이나 방법으로는 자연계로부터 분리되지 않고 single colony 의 형성이 어려우며 저영양균이고 성장 속도가 느리며 배양 조건이 까다로운 점들로 인해 타 미생물에 비해 현저히 선행 연구가 없을 뿐 아니라 미생물 보존 기구에서 보존되고 있는 이들의 수도 매우 적은 실정이다.

점액 세균에 대한 연구는 1892년 Thaxter에 의해 처음 보고된 이래 점액 세균의 용균 작용에 항균 물질의 관련 가능성이 제기되어 오다가 1960년대에 비로소 McCurdy group을 중심으로 분리법과 분류학적 연구가 이루어진 후, 독일, 일본, 미국을 비롯한 선진국들에 의해 이들의 분리법과 배양기술이 개발되면서 점액세균은 오히려 강한 연구 의욕을 불러 일으키는 관심의 대상이 되었고, 이들이 생산하는 항생 물질의 정체도 밝혀졌을 뿐 아니라(28), 많은 연구 결과 방선균에 필적하는 다양한 물질의 생합성 능력이 밝혀져 이들은 현재 신물질 탐색의 새로운 대상으로 떠오르고 있다. 지난 수십년 간 전세계 곳곳으로부터 점액 세균을 분리 수집하여온 독일의 Hans Reichenbach 연구팀은 이들 점액 세균으로부터 생리 활성이 있는 수백 종의 신물질들을 분리하여왔는데, 이들 물질들은 항박테리아, 항곰팡이, 항암 등 그 효능 범위가 다양하며, 그 기본 구조도 50종류 이상이 되는 것으로 알려졌다(25). 이들 중, 전자전달계 저해 물질인 myxothiazol, stigmatellin, myxalamide 는 여러 다른 종류의 *Stigmatella aurantiaca* 에 의해 생산되고(29), actin cytoskeleton을 교란시킴으로서 항암 효과를 보이는 chondramide는 *Chondromyces crocatus* 로부터 생산된다(30,31). Myxobacteria의 생리 활성 물질의 대부분은 소수성이며, 선형 또는 환형의 polyketide 및 peptide 이다. 많은 물질들이 polyketide에 아미노산에 결합되어 있으며, 종종 heterocycle을 형성하기도 한다.

Myxobacteria의 polyketide는 매우 특이적인 군에 속하는 물질로서

macrocyclic lactone과 lactam, 심지어 기존의 macrolide 가 당, polyether, polyenic, alkaloid, aromatic 등과 결합한 경우도 있다. 이들 생리 활성 물질의 대부분은 항진균, 항암, 항생제 활성을 갖고 있기 때문에 의학적 목적으로 연구들이 진행되고 있다. 특히 세루로오스를 용해하는 점액 세균의 일종인 *Sorangium cellulosum*의 대사 산물로부터 Taxol의 효과를 증가하고 microtubule을 안정화시킴으로서 taxol-resistant cancer cell에 효과적인 항암제로 기대되는 Epothilones가 발견됨으로서(32) 점액 세균은 그야말로 생리 활성 물질의 새로운 source로 급부상되어 이들에 대한 산업적 이용 연구가 선진 제약 기업을 위주로 대단히 활발히 진행되고 있는 상황이다.

점액세균이 공업적으로 사용된 예는 아직 없으나, 그 가능성을 나타내는 연구 결과는 매년 증가하고 있다. 특히 항생 물질 분야에서 활발한 연구가 이루어져 지금까지 약 50여종의 항생 물질이 점액 세균으로부터 발견되었는데, myxobacterial antibiotics 중에서 최초로 구조가 밝혀진 Ambruticin(23) 외에 aromatics, heterocycles, quinones, macrolides, polyethers, polyenic compounds, peptides 등 다양한 구조의 화합물들이 분리되었다. 이러한 점에서 점액 세균은 peptides나 nucleotides 와 같은 일차 대사 산물의 분해 산물이 주종을 이루는 일반 세균의 생합성 pattern과는 전혀 다르며, 오히려 방선균에 비교할 만큼 다양한 구조의 물질을 생산함과 아울러 더욱 흥미롭게 한다.

본 연구에서는 다양한 국내 토양에서 분리한 각종 점액 세균의 대사 산물을 대상으로 인체 암세포에 대한 항암 활성 물질을 조사하던 중에 균주 JW 480의 배양물에서 강한 활성이 발견되어 생산 균주의 동정 및 활성 물질에 대한 화학적 규명을 시도하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 기기 및 시약

1.1 실험 기구 및 기기

- Autoclave (SJ-220A45, SEJONG)
- B.O.D incubator (SJ-250B, SEJONG)
- Clean bench (SJ-701S2, SEJONG)
- Electronic balance (SHIMADZU BL220H, SHIMADZU)
- Micropipette (GILSON, FRANCE)
- pH meter (Orion 420A, Orion)
- Rotary evaporator (BUCHI R-200, BUCHI)
- Shaking incubator (SJ-808M2, DONGWON/SEJONG)
- Shaking waterbath (circulator, Mono-TECH ENG CO MSB-1511D)
- Sonicator (KUM SUNG ULTRASONIC)
- Vacuum pump (ULVAC G-50SA)
- Vernier caliper (Mitutoyo Coporation)
- Vortex mixer (BARNSTEAD/THERMOLYNE, USA)
- 해부현미경 (OLYMPUS SZ11)
- 냉동 원심분리기 (Supra22K, Hanil)
- UV/Visible spectrophotometer(CM-10 Spectroline,MODEL ENF-240C)
- High Performance Liquid Chromatography
 - Pump (LC-6AD, SHIMADZU)
 - Detector (Diode array detector, SPD-M10Avp, SHIMADZU)
 - Degasser (DGV-14A, SHIMADZU)

Program (CLASS-VP ver.6.14 sp1)

- FT-NMR (JNM ECP-400, Varian NMR 300)
- Polarimeter (Perkin-Elmer, U.S.A)
- ESI-MS (Mariner, Perspective Biosystem, U.S.A)
- EI-MS (JEOL, JMS-700)
- FT-IR (Perkin-Elmer, U.S.A)

1.2. 시약 및 배지 조성

(1) 시약

- Agar, EP(Junsei)
- Baker's Yeast, CP(BRUGGEMAN)
- Beef Extract, EP(DIFCO)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, GR(Junsei)
- Casitone, EP(DIFCO)
- Ciprofloxacin(한국화학연구원으로부터 분양)
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, GR(SHINYO)
- Congo-red, EP(SIGMA)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, EP(YAKUI)
- Cyanocobalamin, EP(SIGMA)
- Cycloheximide, EP(ACROS)
- Dimethyl sulfoxide, GR(Junsei)
- EDTA, Na- Fe^{3+} Salt, GR(Junsei)

- Glucose, GR(Junsei)
- H₃BO₃, EP(YAKURI)
- HEPES, EP(J.T.BAKER)
- KBr, EP(YAKURI)
- KI, EP(Junsei)
- LiCl, EP(YAKURI)
- Malt Extract, EP(DIFCO)
- MgSO₄ · 7H₂O, GR(Junsei)
- MnCl₂ · 4H₂O, (SHINYO)
- NaCl, EP(Junsei)
- Na₂MoO₄ · 2H₂O, EP(YAKURI)
- NaOH, EP(ORIENTAL)
- Peptone, EP(MERCK)
- SnCl₂ · 2H₂O, EP(YAKURI)
- Soluble starch, EP(DIFCO)
- Soybean flour (SIGMA)
- Tryptone, EP(DIFCO)
- Vanillin (Fluka)
- Yeast Extract, EP(DIFCO)
- ZnCl₂, EP(YAKURI)
- XAD-16, mesh 20.00-60.00 (Rohm & Haas)
- CDCl₃ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)
- CD₃OD (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

(2) 배지의 조성 및 조제법

① WCX Agar medium

구성 성분은 Table 1 과 같고, 121℃, 1기압에서 15분간 고온 멸균하였다. 고온 멸균한 뒤, 배지가 50-60℃ 정도의 적정 온도가 되었을 때, 토양 시료 중 본 연구의 목적 시료인 용균성 점액세균(bacteriolytic myxobacteria) 이외의 곰팡이균의 생장을 저해하기 위하여 항진균제 역할을 하는 cycloheximide를 syringe filter 하여 첨가하였고, petridish에 2/3만큼 분주하여 실온에서 1시간 동안 건조시킨 뒤 사용하였다.

Table 1. Composition of WCX Agar medium

Components	Concentration	pH
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.0g/l	7.2 (with NaOH)
Agar	15.0g/l	
Cycloheximide (stock : 100mg/10ml H ₂ O)	5ml/l	

② VY/2 Agar medium

구성 성분은 Table 2 와 같다. 배지를 고온 멸균하기 전, Baker's Yeast는 덩어리째 영키는 것을 방지하기 위하여 100℃에서 5분간 끓여 용융시킨 뒤 첨

가하였고, 121℃, 1기압에서 15분간 고온 멸균하였다.

고온 멸균한 뒤, 배지가 50-60℃ 정도의 적정 온도가 되었을 때, 균주의 생장에 요구되는 비타민 cyanocobalamin(B₁₂)을 syringe filter 하여 첨가하였고, petridish에 2/3만큼 분주하여 실온에서 1시간 동안 건조시킨 뒤 사용하였다.

Table 2. Composition of VY/2 Agar medium

Components	Concentration	pH
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.0g/ℓ	7.2 (with NaOH)
Baker's Yeast	5.0g/ℓ	
Agar	15.0g/ℓ	
Cyanocobalamin(B ₁₂) (stock : 5mg/5ml H ₂ O)	500μℓ/ℓ	

③ Nutrient Agar medium (NA)

구성 성분은 Table 3 과 같고, 121℃, 1기압에서 15분간 고온 멸균하여 petridish에 2/3만큼 분주하였고, 실온에서 1시간 동안 건조시킨 뒤 사용하였다.

먹이균으로 사용하기 위한 *E.coli* 배양에는 Agar를 첨가하지 않은 Nutrient Broth(NB)배지를 사용하였다.

Table 3. Composition of Nutrient Agar medium

Components	Concentration	pH
Tryptone	10.0g/l	7.2 (with NaOH)
Yeast Extract	5.0g/l	
NaCl	10.0g/l	
Glucose	1.0g/l	
Agar	15.0g/l	

④ Micrococcus medium (MM)

구성 성분은 Table 4 와 같다. 121℃, 1기압에서 15분간 고온 멸균하였고, petridish에 2/3만큼 분주하여 실온에서 1시간 동안 건조시킨 뒤 사용하였다.

Table 4. Composition of Micrococcus medium

Components	Concentration	pH
Peptone	5.0g/l	7.4 (with NaOH)
Yeast Extract	3.0g/l	
Beef Extract	1.5g/l	
Glucose	1.0g/l	
Agar	15.0g/l	

⑤ Yeast Extract Agar medium (YM)

구성 성분은 Table 5 와 같고, 121℃, 1기압에서 15분간 고온 멸균하여 petridish에 2/3만큼 분주한 뒤 실온에서 1시간 동안 건조시켜 사용하였다.

Table 5. Composition of Yeast Extract Agar medium

Components	Concentration	pH
Peptone	5.0g/l	7.2 (with NaOH)
Yeast Extract	3.0g/l	
Malt Extract	3.0g/l	
Agar	15.0g/l	

⑥ CAS medium

구성 성분은 Table 6 과 같다.

Table 6. Composition of CAS medium

Components	Concentration
Casitone	1.0g/100ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g/100ml
DMSO	5ml/100ml

⑦ Trace Element Solution (TES)

Chondromyces apiculatus 의 생장에 필요한 미량 원소 성분으로서 그 조성은 Table 7 과 같고 실온에 보관하였다가 사용하였다.

Table 7. Composition of TES

Components	Concentration
MnCl ₂ · 4H ₂ O	100mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	20mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	10mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	10mg/l
ZnCl ₂	20mg/l
LiCl	5mg/l
SnCl ₂ · 2H ₂ O	5mg/l
H ₃ BO ₃	10mg/l
KBr	20mg/l
KI	20mg/l
EDTA, Na-Fe ³⁺ Salt	8g/l

⑧ *Chondromyces apiculatus* liquid medium

Chondromyces apiculatus 의 대량 배양을 목적으로 사용된 액체 배지로서, 구성 성분은 Table 8 과 같고, 균주가 생산하는 물질을 흡착시키기 위하여 neutral adsorber XAD-16을 첨가하였다.

먼저 50mM HEPES(1.2%) 용액에 XAD-16(1.5%)과 Soybean flour(0.04%)를 첨가하여 5분간 1차 고온 멸균한 뒤, Soluble starch(0.04%)와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 혼합액(0.3%)을 첨가하여 121℃, 1기압에서 15분간 2차 고온 멸균하였다.

고온 멸균 후 배지가 50-60℃ 정도로 적정 온도가 되었을 때, 무균 상태에서 TES와 Cyanocobalamin(B_{12})을 syringe filter 하여 첨가하여 혼합한 뒤, 균주를 접종하였다.

Table 8. Composition of *Chondromyces apiculatus* liquid medium

Components	Concentration	pH
HEPES(50mM)	1.2%	7.2 (with NaOH)
Soybean flour (Anti form B : 4drop)	0.04%	
Soluble starch	0.04%	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1:4)	0.3%	
TES	0.1%	
Cyanocobalamin (B_{12})	0.05%	
XAD-16	1.5% ^a	

a : wet weight

(3) 발색 시약의 조제

TLC 발색 시약으로 주로 Vanillin-sulphuric acid reagent를 많이 사용하였으며 Dragendorff reagents, Ninhydrin reagent, Iron(III) chloride reagent, Anisaldehyde- sulphuric acid reagent 도 함께 사용하였다. 조제법은 다음과 같다(33).

① Vanillin-sulphuric acid reagent (VS)

solution 1 : 5% Ethanolic sulphuric acid

solution 2 : 1% Ethanolic vanillin

solution 1과 2를 TLC plate에 분무한 다음, 110°C에서 5-10분 동안 가열한 후 TLC plate 상에 나타나는 시료 성분을 확인하였다.

② Dragendorff reagents (DRG)

0.85g의 basic bismuth nitrate를 10ml의 빙초산이 함유된 40ml의 증류수에 녹인 후 여기에 8g의 KI를 녹인 20ml 증류수를 가한 용액을 분무하고 TLC plate 상에 나타나는 시료 성분을 확인하였다.

③ Ninhydrin reagent (NIH)

0.3g의 ninhydrin을 10ml의 normal-butanol에 녹인 다음 3ml의 98% 빙초

산을 가한 용액을 분무하였고, 110℃에서 5-10분 동안 가열한 후 TLC plate 상에 나타나는 시료 성분을 확인하였다.

④ Iron(III) chloride reagent (FeCl₃)

시료를 점적한 TLC plate에 10% FeCl₃ 용액을 분무하였고, TLC plate 상에 나타나는 시료 성분을 확인하였다.

⑤ Anisaldehyde-sulphuric acid reagent (AS)

0.5ml의 Anisaldehyde 를 10ml의 빙초산에 첨가한 후, 85ml의 methanol 과 5ml의 진한 황산 용액과 함께 분무하였고, 100℃에서 5-10분 동안 가열한 후 TLC plate 상에 나타나는 시료 성분을 확인하였다.

(4) 시험균

본 실험에서 항균 활성 측정 실험에 사용된 균주는 다음과 같으며, 한국 생명 공학 연구원 유전자 은행으로부터 분양받아 계대 중인 것을 사용하였다.

Escherichia coli (KCTC 12003),
Saccharomyces cerevisiae (KCTC 7246),
Staphylococcus aureus (KCTC 1916),
Rhodotorula rubra (KCTC 1209)

2. *Chondromyces apiculatus* 의 분리 및 배양

2.1. *Chondromyces apiculatus*의 분리 및 동정

(1) 용균성 점액 세균(bacteriolytic myxobacteria)의 분리

토양 시료를 대상으로 *E. coli* (*Escherichia coli*)의 생균체를 먹이균으로 한 baiting method를 이용하여 용균성 점액 세균을 분리하였다(Fig. 1).

① 토양 시료 채취

전북 익산시에 소재한 밭에서 지표면으로부터 10cm 아래 부근의 토양을 다량 채취하였고, 습기를 제거하기 위하여 햇빛이 들지 않고 통풍이 잘 되는 서늘한 곳에서 일주일 동안 충분히 건조시켜 곰팡이의 생장을 억제한 뒤 실험에 사용하였다(34).

② 먹이균의 배양

냉장 보관되어 있는 *E. coli* 를 Nutrient Agar (NA) plate에 선 도말한 뒤 30°C, incubator에서 24시간 동안 정지배양하여 활성화시켰다.

‘L’형 시험관에 Nutrient Broth (NB) 배지를 10ml 준비하여 고온 멸균하였고 활성화시킨 *E.coli* 의 단콜로니를 접종하여 30°C, 120rpm, shaking waterbath에서 16시간동안(overnight) 배양하였다.

‘L’형 시험관의 *E.coli*를 overnight 한 뒤, 2ℓ 용량의 삼각 플라스크에 Nutrient Broth (NB) 배지 1ℓ를 고온 멸균하여 이 배지에 overnight 한 균액

을 무균 상태에서 10ml (0.1% seed culture)을 접종한 다음, 30℃, 160rpm, shaking incubator 에서 16시간 동안 진탕 배양한 뒤 수확하였다.

수확은 고속원심분리기로 4℃, 10000G, 20 min 의 조건하에서 수행하였다. 원심분리하여 모아진 상층액은 버리고, 균체의 손실을 줄이기 위하여 0.2%의 NaCl 용액으로 씻어주면서 *E. coli* 균체만 모았다. 한 곳에 모아진 *E. coli* 에 0.2% NaCl 용액을 약 10배가량 더하여 한번 더 고속원심분리하였고, 모아진 상층액은 버리고 물기를 제거하여 균체를 냉장보관하였다.

③ 토양 시료 처리

배양한 먹이균(*E. coli*)을 멸균 증류수로 10배 희석한 다음, WCX plate 의 가장자리로부터 약 2cm 되는 안쪽 위치에 micropipet을 사용하여 100 μ l 씩 떨어뜨려 지름이 1.5-2cm 되는 circular patch를 만들었다. 하나의 WCX plate 에 circular patch가 4-5개 되도록 하였고, 배지 표면상에서 circular patch가 유동성을 갖지 않도록 약 30-60분 동안 무균 상태에서 건조시켰다.

잘 건조된 *E. coli* circular patch의 바깥쪽 가장자리에 토양 시료를 지름 0.5cm의 원형으로 뭉쳐서 올리고, 멸균 증류수를 소량 떨어뜨려 토양이 분산 되지 않도록 한 뒤, 30℃, incubator에서 정치배양하였다.

④ 용균성 점액 세균의 순화

토양 시료를 정치 배양하여 3-5일 후부터 용균성 점액 세균의 자실체가 관찰되면, 자실체를 떼어내어 상기 언급한 방법으로 만든 *E. coli* circular patch 에 옮겨 30℃, incubator에서 배양하였고, 타균과의 분리를 위해 동일한 배지

를 준비하여 여러 차례 옮긴 후 계속 배양하였다.

위 과정을 여러 차례 반복한 후, 균주의 순수 분리를 위하여 고온 멸균한 *E. coli* 로 circular patch를 준비하였고, 여기에 균주를 옮겨 30℃, incubator에서 배양하면서 순화하였다.

순화된 균은 VY/2 plate에 옮겨 30℃, incubator에서 계대 배양한 후, 균주 보관용 배지(CAS medium)에 옮겨 액체 질소에 보관하였다.

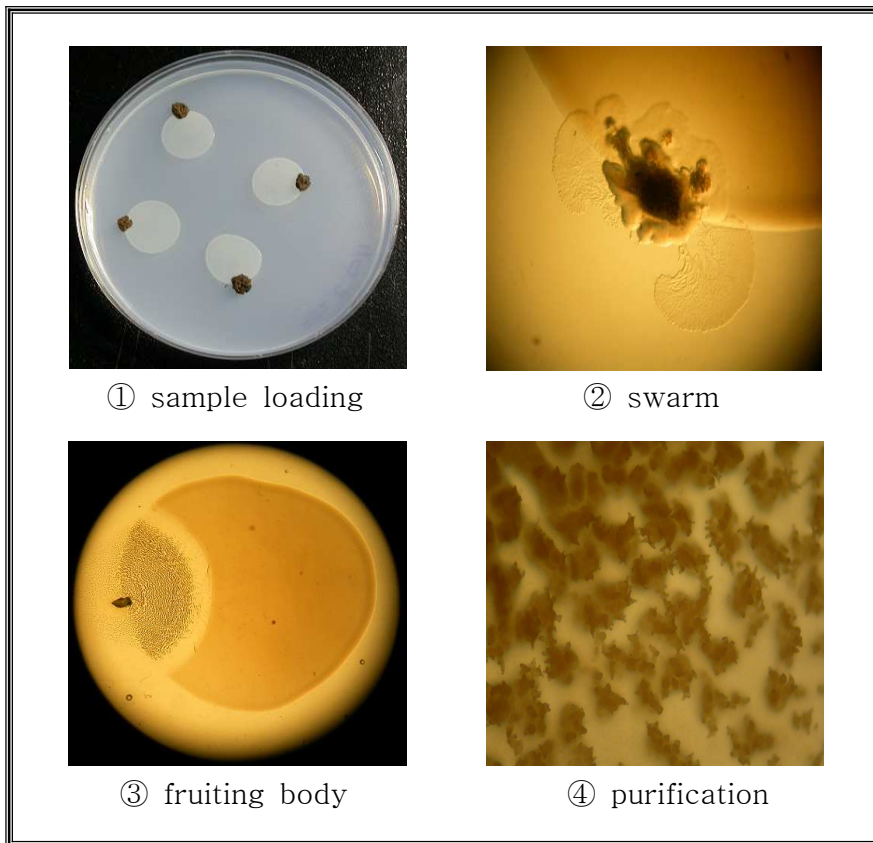


Fig. 1. Isolation of bacteriolytic myxobacteria.

(2) 균주의 동정

토양 시료로부터 분리된 균주 JW 480의 분류학적 동정을 위해 균주를 VY/2 Agar plate에 옮겨 30℃, incubator에서 5-10일동안 배양하였다.

해부 현미경을 통해 VY/2 Agar plate상에서 균주의 집락(swarm)과 자실체(fruiting body)의 형태적 특징을 관찰하였고, 0.01% Congo-red 수용액을 사용하여 균주의 염색 여부를 확인하였다.

Bergey's Manual 및 문헌의 분류, 동정에 관한 기준에 따라 용균성을 비롯하여 자실체(fruiting body) 및 집락(swarm)의 형태적 특성과 색소 생성 여부 등을 동정지표로 사용하였다.

2.2 *Chondromyces apiculatus*의 배양

토양 시료로부터 순수 분리된 균주 JW 480을 VY/2 Agar plate에서 계대 배양하였고, 액체 질소에 보관하거나 대량 배양의 목적으로 30℃, incubator에서 정치 배양하였다.

균주가 생산하는 대사 산물의 특성과 활성을 검토하기 위한 예비 배양과 본 실험의 목적 물질을 확보하기 위한 대량 배양은 *Chondromyces apiculatus* 배지를 이용하였다. 예비 배양 시에는 *Chondromyces apiculatus* 배지를 800ml (400ml×2) 만 사용하여 배양하였다. 대량 배양 시에는 균체 증식을 위한 종 배양과 물질 생산을 위한 본 배양의 두 단계로 나누어 수행하였다.

종 배양 시 300ml 용량 삼각 플라스크에 *Chondromyces apiculatus* 배지를 50ml 준비하여 1차, 2차 고온 멸균하였고, 배지가 25℃이하로 적정온도가 되었을 때, 무균 상태에서 Cyanocobalamin(B₁₂)과 TES를 syringe filter 하여

첨가하여 혼합하였다.

준비된 배지에 무균 상태에서 균주 JW 480을 접종하여 30℃, 160rpm, shaking incubator에서 3일 동안 진탕 배양하였고, 균액 4%를 취하여 동일 성분의 배지 50ml을 함유하는 새로운 300ml 용량 삼각 플라스크에 접종하여 상기의 방법으로 진탕 배양하였다(Fig. 2).

본 배양은 균주에 대한 자가 독성을 방지하고 물질 생산량을 높이기 위해 2ℓ 용량의 배양 플라스크에 흡착 합성 수지인 neutral adsorber XAD-16을 6g (wet weight) 첨가한 후, 배지 400ml을 넣어 멸균하였고, 종 배양한 균액을 2% 접종하여 30℃, 160rpm, shaking incubator에서 7일 동안 진탕 배양하였다(35). 또한 배양 플라스크의 수를 다량으로 증가시킴으로서 균체의 양과 물질 생산량의 양적 확보에 충당하였다.



Fig. 2. Shaking culture of strain JW 480

3. 대사 산물의 추출 및 분리,정제

3.1. 추출 및 분획

배양액 중에서 균체와 흡착 합성 수지는 sieving하여 배지 성분과 분리하였고, 균체와 흡착 합성 수지를 제외한 나머지 배지 성분은 10℃, 10000G, 25min 조건 하에서 고속원심분리하였다.

고속원심분리하여 얻어진 상층액은 버리고, 하층에 모아진 물질만 취하여 상기의 분리된 균체, 흡착 합성 수지와 함께 MeOH-Acetone(1:1) 혼합 용매로 Magnetic spin bar와 교반기를 함께 이용하여 실온에서 12시간 동안 1차 추출하였다.

2차 추출은 Acetone으로 6시간 동안 추출하였으며, 동일한 방법으로 여러 차례 반복 후 감압 농축하여 미정제 추출물을 얻었다.

얻어진 미정제 추출물을 H₂O와 Ethyl acetate 용매로 분획한 다음 Ethyl acetate 분획물을 회수하여 sodium sulfate(anhydrous)를 사용하여 여분의 H₂O를 제거한 후 rotary evaporator로 감압 농축하였다.

감압 농축한 Ethyl acetate 분획물은 포화시킨 n-heptane 과 MeOH 용매로 재분획하였다. 이 중에서 MeOH 분획물을 rotary evaporator로 감압 농축하여 JW 480 XE(XAD acetone extract)를 얻었다(Fig. 3).

3.2. 분리 및 정제

TLC(Thin layer chromatography) 분석은 silica gel plate (silica gel F₂₅₄, 20×20cm, 0.25mm, MERCK)와 RP-18 plate (RP-18 F₂₅₄, 20×20cm, 0.25mm, MERCK)를 고정상으로 사용하였고, 이동상으로 Methylene chloride, Ethyl acetate, Methanol, H₂O 등 다양한 극성을 가진 용매를 단독 혹은 여러 비율로 혼합하여 사용하였다.

휘발성 용매에 녹인 묽은 용액의 시료를 모세관을 사용하여 정지상의 끝에서 1cm 되는 지점에 점적하였고, 용매를 증발시킨 후에 이동상 용매가 들어있는 전개 장치 속에 시료의 위치가 잠기지 않도록 위치시켰다. 전개가 완료된 후 이동상의 흐름을 정지하고 용매를 증발시킨 다음 UV 254 및 365 파장에서 시료의 전개 양상을 일차적으로 확인하였다.

발색 시약으로는 VS, AS, NIH, FeCl₃, DRG 용액을 사용하여 시료의 검출물질을 확인하였다.

TLC 분석을 통해서 시료 성분의 극성 정도를 확인한 후 Silica gel Column Chromatography (silica gel 60, 0.040-0.063mm, 230-400 mesh ASTM, MERCK)를 수행하였다. 용출 용매로서 Hexane, Ethyl acetate, Acetone, Methanol을 단독 혹은 혼합하여 사용하였고, RP-18 Column Chromatography (RP-18, 0.040-0.063mm, 230-400 mesh ASTM, MERCK)는 이동상으로 Methanol과 증류수를 혼합하여 사용하였다.

또한 필요한 경우 Methanol-Methylene chloride(8:2)를 용매계로 한 Sephadex LH-20 Column Chromatography (Sephadex LH-20, bead size 25~100 μ m, Fluka)를 수행하였다.

최종 화합물의 정제를 위해 High Performance Liquid Chromatography를 수행하였으며, 이동상으로는 Methanol-H₂O 혼합 용매를 사용하였다.

4. 생물 활성 측정

4.1. 세포 독성

세포 독성 측정은 한국 화학 연구소에 의뢰하였고, 실험 방법은 다음과 같다.

(1) 암세포 배양

실험에 사용된 암세포주는 A549(non small cell lungcarcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2(malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF 498(central nerve system tumor), HCT 15 (colon adenocarcinoma)이며 이 암세포들은 모두 human origin tumor cell line 들로써, 미국의 국립암연구소(NCI)로부터 분양받아 한국 화학 연구소에서 계대 배양중인 것을 사용하였다. 배양액은 5% fetal bovine serum 으로부터 보강된 RPMI 1640 medium을 사용하였으며, 37°C 항온 항습 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포의 계대는 3-4일에 1회씩 하였으며, 계대시 세포를 용기 부착면으로부터 분리시키기 위하여 phosphate buffered saline(PBS) 용액에 0.25% trypsin과 3mM trans-1,2-di-aminocyclohexane-n,n,n,n,-tetraacetic acid (CDTA)를 녹인 용액을 사용하였다(36).

(2) 활성 측정법

1989년에 미국의 국립 암연구소에서 약물의 *in vitro* 항암 활성을 1차적으로 측정하기 위하여 개발된 sulforhodamine B (SRB) assay 방법을 사용하였다. 즉 계대 중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 우선 trypsin-CDTA 용액으로

용기 부착면으로부터 분리시키고, 96 well flat bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 세포수가 5×10^3 (A 549, HCT 15), 1×10^4 (SK-MEL-2, XF 498), 2×10^4 (SK-OV-3)이 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 CO₂ incubator 내에서 24시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후 aspirator 로 media를 제거하고 6농도의 log dose로 medium으로 희석한 test material 용액들을 세포가 들어 있는 well에 각각 3배수(triplicate)로 넣어주고, 48시간 동안 더 배양하였다. 검체용액들을 조제하기 위하여 필요에 따라 DMSO (dimethylsulfoxide)를 사용하였으며 이때 세포에 가해지는 DMSO 의 농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다. 또한 이렇게 희석한 검체용액은 세포에 가하기 전에 milipore filter 로 여과하여 실험의 무균 상태를 유지하였다. 세포를 약물과 48시간 배양한 후 각 well 의 medium을 제거하고 10% trichloro-acetic acid(TCA)를 100 μ l 씩 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 증류수로 5-6회 세척하여 실온에서 남아있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate 는 well 당 100 μ l 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색 용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5-6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과잉의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조시킨 후 well 당 100 μ l 의 10mM trisma base (unbuffered)용액을 가하여 titer plate shaker 로 10분간 shaking 하여 염색액을 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가하는 시점에서의 세포수 (Tz, zero time)와 약물 대신 동량 성분의 medium 만을 가하여 48시간 배양했을 때의 세포수 (C, control) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양 했을 때의 세포수 (T, test) 을 각각 측정하여 다음의 수식에 따라 항암 활성을 계산하였다.

즉 $T_z > T$ 인 경우에는 $[(T - T_z)/(C - T_z)] \times 100$ 으로 계산하였고, $T_z < T$ 인 경우에는 $[(T - T_z)/T_z] \times 100$ 의 수식으로 계산하였다.

4.2. 항산화 활성

항산화 활성은 성균관 대학교 약학 대학에 의뢰하여 측정하였으며, 그 방법을 간략히 기술하면 다음과 같다.

항산화 효과를 측정하는 방법인 radical 소거 기능 측정법으로서 형광 표지 단백질을 이용한 ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) assay를 채택하였다. ORAC assay는 총 항산화 효과를 측정하는 방법으로서, 빠르고 느린 항산화 효과의 측정이 가능하고, serum, agriculture products, food product, food ingredient, pharmaceutical products 등의 항산화 효과 측정에 이용되고 있다(37).

형광 표지 단백질인 β -phycoerythrin (β -PE)은 peroxy radical 에 의해 형광값이 시간에 따라 감소한다. buffer와 sample, fluorescence solution (FL) 을 혼합한 후, peroxy radical generator로 사용되는 2,2'-axobis(2-amindino propane)dihydrochloride (AAPH)를 첨가함으로써 반응이 시작되고, AAPH에 의해 일어나는 형광의 감소가 antioxidant 존재시 억제된다. 형광의 감소를 억제하는 정도로 항산화 효과를 측정하는데 β -PE는 생물학적 항산화제보다 100배 가량 oxygen radical과 느리게 반응하고, non-antioxidant보다 60배 가량 반응성이 높다. 항산화 효과가 있는 물질은 β -PE 가 oxygen radical에 의해 산화되기 전에 산화하므로 형광값의 감소를 억제한다. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)는 수용성 비타민 E analogue 로 control standard로 사용되었다(38,39,40).

β -PE, phosphate buffer, sample을 15분 동안 water bath 상에서 pre-incubation 하고 75mM phosphate buffer (pH 7.4), β -PE : FL (final 10 μ M), sample, radical generator (AAPH, final 50mM) 가 혼합된 반응액 200 μ l을 37 $^{\circ}$ C로 미리 평형시켰다. 형광분광광도계를 사용하여 형광의 감소 과정 60분 동안 2분 간격으로 관찰, 기록하였고, 형광이 95% loss 될 때까지 측

정하였다.

Reading 조건은 excitation $530\pm 25\text{nm}$, emission $590\pm 30\text{nm}$ (혹은 excitaion 540nm , emission 565nm) 이다. 결과의 산출은 Trolox standard curve로부터 Trolox를 standard로 사용한 기준치로부터 산출하였다.

또한 DPPH free radical 소거 활성을 이용한 항산화 활성 측정은 다음과 같은 방법으로 실험하였다.

분획 및 분리된 화합물을 EtOH 에 일정 농도로 용해시킨 다음 희석하여 최종적으로 $100\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ 의 5가지 농도로 준비하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 0.1mM 이 되도록 EtOH에 용해하고, 96well plate에 A-D를 각각 만들어 준비하였다.

A : 각 농도의 시료 용액 $100\mu\text{l}$ 와 DPPH 용액 $100\mu\text{l}$ 혼합액

B : 각 농도의 시료 용액 $100\mu\text{l}$ 에 EtOH $100\mu\text{l}$ 만 가한 액

C : DPPH 용액 $100\mu\text{l}$ 와 EtOH $100\mu\text{l}$ 의 혼합액

D : EtOH $200\mu\text{l}$

A-D를 25°C 에서 10분간 반응시킨 후 540nm 에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였으며, 그 저해율(%)은 다음과 같이 계산하였다.

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

4.3. 항균 활성

(1) 시험균

세균(*E.coli*, *S.aureus*) 및 효모(*R.rubra*, *S.cerevisiae*)에 대하여 항균 활성을 측정하였다.

(2) 실험 방법

계대 배양하여 냉장 보관 중인 세균(*E.coli*, *S.aureus*) 및 효모(*R.rubra*, *S.cerevisiae*)를 각각 NA, MM, YM 고체 평판배지에 선도말 한 후, 30℃, incubator에서 16시간 동안 배양하여 활성화시켰다. 'L' 형 시험관에 Nutrient broth, MM broth, YM broth 배지를 10 ml 씩 준비하여 121℃, 1 기압에서 15분 동안 고온 멸균하였고, 배지가 충분히 식은 다음, 상기의 활성화된 세균과 효모를 접종하여 30℃, 120rpm, shaking water bath에서 16시간 동안 배양하였다. NA, MM, YM Agar 배지를 121℃, 1기압에서 15분 동안 고온 멸균하여 45-50℃정도로 식힌 후, water bath에서 배양한 균액을 무균 상태에서 0.1% 접종하였고, 잘 흔들어 Agar 배지에 균액이 고루 섞이게 한 후 petri dish 에 2/3 만큼 분주하였으며, 1시간 동안 건조시켰다. 시료 sample은 MeOH 또는 Methylene Chloride를 사용하여 용해하였으며, Disc deeping 방법으로 시료 sample을 loading 한 6mm paper disc를 약 30분 동안 건조하여 시료 sample을 용해하였던 용매를 완전히 증발시킨 후 상기의 Agar 배지 위에 loading 하였다. 이 때, control 로는 MeOH 과 Methylene Chloride를 사용하였으며, 비교약제로는 ciprofloxacin 10ppm을 사용하였다. 시료 sample을 loading한 Agar plate를 30℃ incubator 에서 배양하였고, 48시간 경과 후 vernier caliper 로 inhibition zone 의 크기를 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

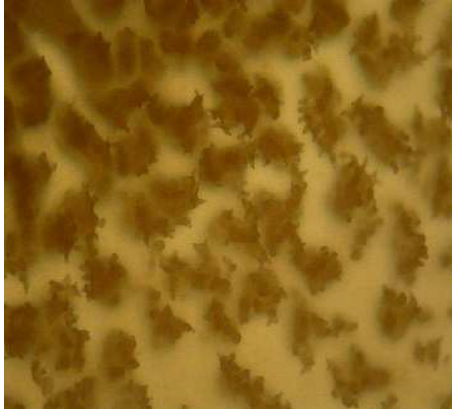
1. 점액 세균의 분리

안산, 용인, 대전, 속초, 김천, 남원, 익산, 밀양, 부산 등 국내에서 많은 토양을 채집하였고, 토양 시료를 대상으로 *E. coli* (*Escherichia coli*)의 생균체를 먹이균으로 한 Baiting method 와 Filter paper method(18)를 사용하여 다양한 점액 세균을 분리하였다. 분리된 점액 세균 중 용균성 점액 세균 (bacteriolytic myxobacteria)이 185종(75.5%), 세루로오스 용해성 점액 세균 (cellulolytic myxobacteria)이 60종(24.5%)이었는데, 용균성 점액 세균 중에서도 *Corallocooccus* sp. 52종, *Angiococcus* sp. 49종, *Myxococcus* sp. 43종으로 높은 비율로 분리되었다(Table 9).

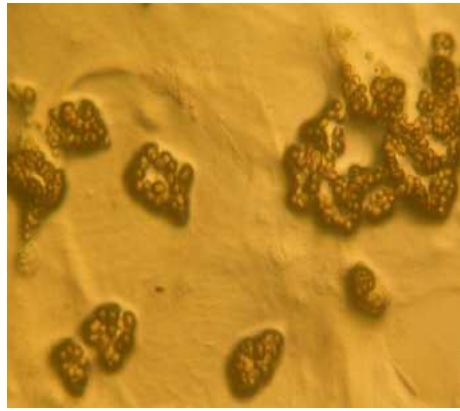
이들 점액 세균 중에서 인체 암세포주에 대한 성장 저해 활성을 시험한 결과 균주 JW480의 대사 산물에서 높은 활성이 나타났다. 뿐만 아니라 세균과 효모에 대한 항균 활성 실험에서 그람 양성 세균인 *S.aureus* 에 대한 성장 저해 활성도 높게 나타났다. 이러한 결과로부터 균주 JW480을 대상으로 분류학적 특성 및 형태학적 특성을 검토하였고, 활성 물질에 대한 화학적 규명을 시도하였다.

Table 9. Myxobacterial strains isolated from soil samples

Taxon	No. isolated strains
<i>Myxococcus</i> sp.	43
<i>Corallocooccus</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



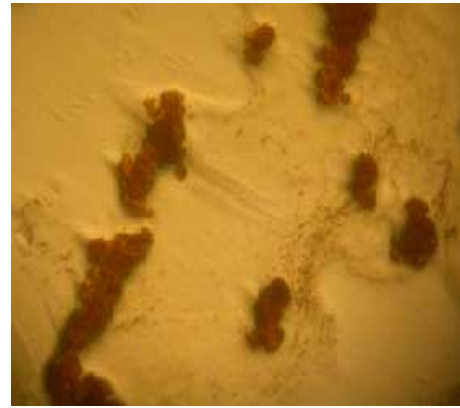
Corallococcus sp.



Angiococcus sp.



Chondromyces sp.



Archangium sp.

Fig. 4. Fruiting body of myxobacteria

2. 균주 JW 480의 동정

균주 JW480은 전북 익산시에 소재한 밭 토양 시료를 대상으로 *E. coli*의 생균체를 먹이균으로 한 Baiting method를 통해 분리되었다(18).

WCX plate상에 시료를 처리하여 30℃에서 배양하였고, 3-4일 경과 후 먹이균에 대한 용균 현상이 나타났으며, 7-10일 경과 후 자실체(fruiting body)가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다.

이 균주의 자실체는 가늘고 긴 흰색의 자루에 밝은 오렌지색의 포자낭이 군집을 이루고 있는 형태였으며, 이로 미루어 볼 때 *Chondromyces* sp.에 속하는 균주임을 확인할 수 있었다. 자루에 달려있는 각각의 포자낭은 끝부분이 가지를 이루지 않는 긴 꼬리 형태로 뻗어 있었으며(Fig. 6), 자실체가 다른 점액 세균보다 비교적 큰 편에 속하여 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있었다. 집락(swarm)은 배지의 표면이나 표면의 아래쪽을 함몰시키면서 자랐고, 집락의 가장자리는 포자낭이 밀집되어 오렌지색의 폭이 좁은 띠를 형성하였다. 0.01% Congo-red 수용액을 사용하여 균주의 염색 여부를 확인한 결과, 균주 JW 480의 집락에 Congo-red 염료가 흡착되지 않았다.

이러한 결과를 바탕으로 Bergey's Manual 및 문헌의 분류, 동정에 관한 기준에 따라 용균성을 비롯하여 자실체 및 집락의 형태적인 특성과 색소 생성 여부, Congo-red 염료의 흡착 여부 등을 판별하여 균주 JW 480을 다양한 *Chondromyces* sp. 중에서도 *Chondromyces apiculatus* (*C. apiculatus*)로 동정하였다(41,42).

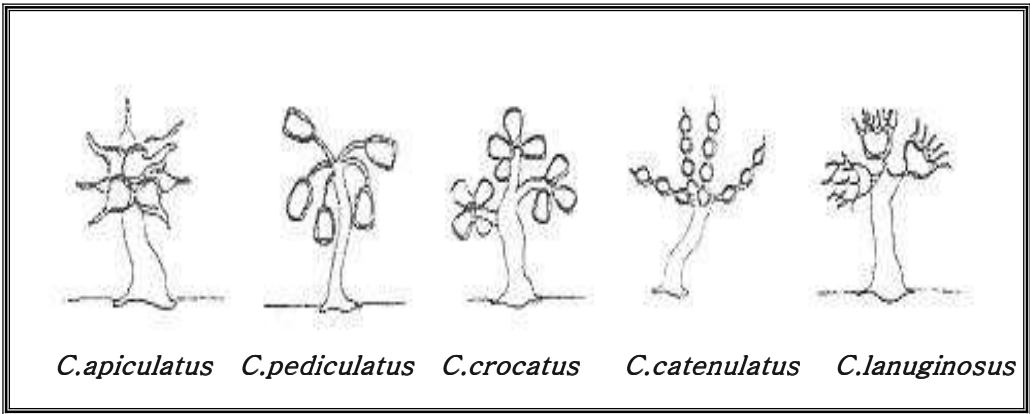


Fig. 5. Fruiting body of *Chondromyces* sp.

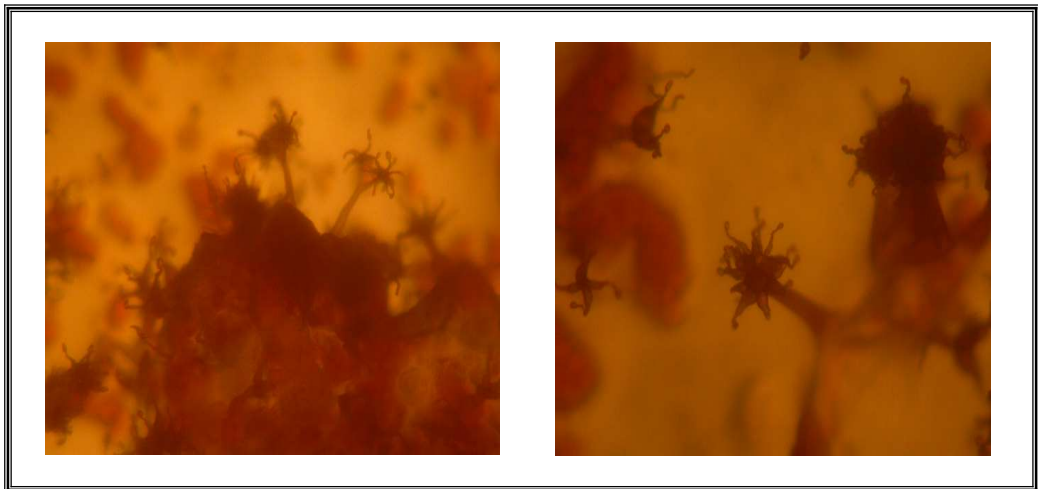


Fig. 6. Fruiting body of strain JW 480

3. *C. apiculatus* 가 생산하는 대사 산물의 분리 및 구조 결정

C. apiculatus 를 진탕 배양하여 얻은 배양액을 추출 및 분획 과정을 거쳐서 JW 480 XE 1.67g을 얻었고, Silica gel Column Chromatography, RP-18 Column Chromatography, Sephadex LH-20 Column Chromatography, semi prep HPLC를 수행하여 Compound 1과 2를 분리하였다(Fig. 7).

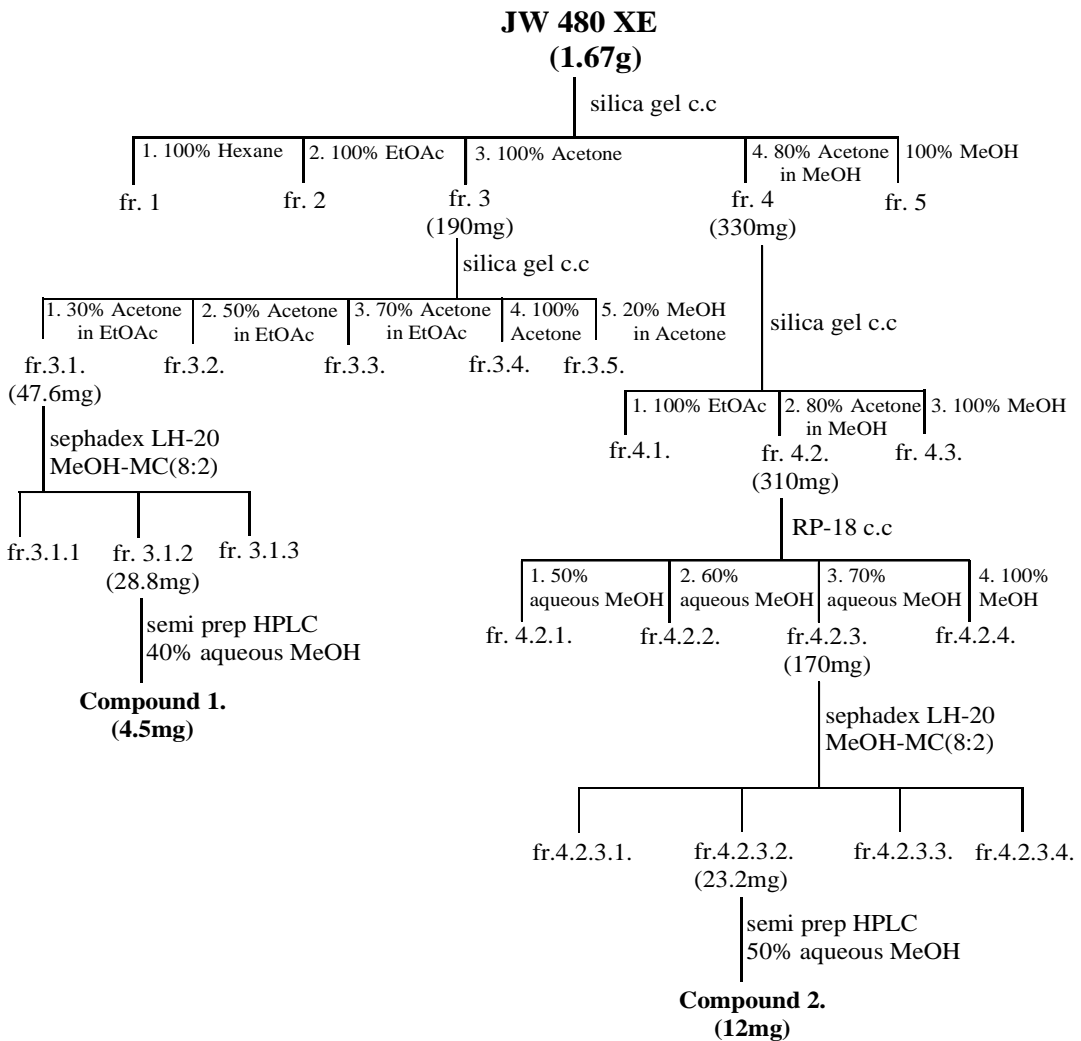


Fig. 7. Isolation of compounds 1 and 2

3.1. 항암 활성 물질의 분리 및 구조 결정

(1) 분리

균주 *C. apiculatus* 가 생산하는 대사 산물로부터 최종 화합물을 순수하게 분리하기 위하여 semi prep HPLC 실험을 수행하였다. HPLC 실험 결과 목적 물질인 compound 1은 이동상으로 40% aqueous MeOH를 사용하였을 때, retention time이 107.16min임을 확인할 수 있었고, UV spectrum에서 280nm에서 강한 흡수를 보였음을 알 수 있었다(Fig. 8).

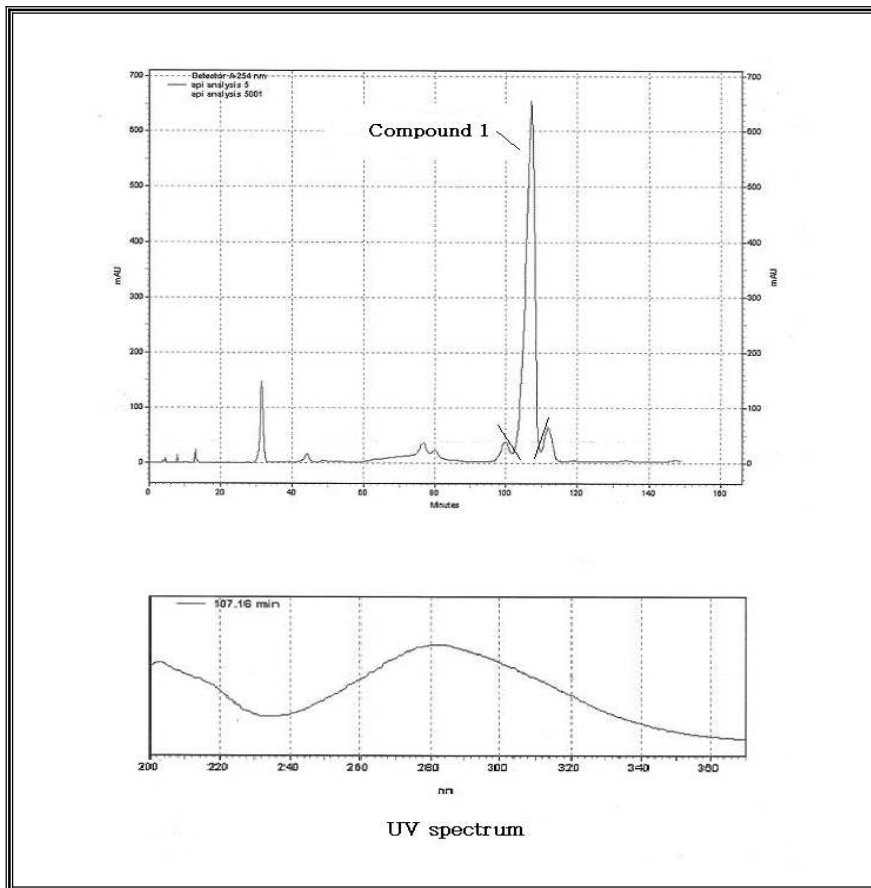


Fig. 8. HPLC profile and UV spectrum of compound 1

Compound 1의 semi prep HPLC 실험 수행시 Analytical column (CAPCELL PAK C18 : UG120Å, 5 μ m; 4.6mmI.D.x250mm, SHISEIDO) 과 Preparative column (CAPCELL PAK C18 : UG120Å, 5 μ m; 10mmI.D.x250mm, SHISEIDO), Guard column (CAPCELL PAK C18 : UG120Å, 5 μ m; 4.6mm I.D.x250mm, SHISEIDO)을 사용하였으며, 분석 조건은 Table 10 과 같다.

Table 10. HPLC condition for analysis of compound 1

Parameter	Condition
pump	LC-6AD (SHIMADZU)
column	CAPCELL PAK C18 (SHISEIDO)
detector	DAD (SPD-M10Avp, SHIMADZU) UV 254nm
mobile phase	40% aqueous MeOH
flow rate	0.6ml/min
injection volume	20 μ l

(2) 구조 결정

분리된 Compound 1의 구조를 규명하기 위하여 NMR spectroscopy를 중점적으로 구조 분석에 이용하였다. 그 외에도 IR spectral data 와 Mass spectrum data를 이용하여 구조를 결정하였고, Compound 1의 물리 화학적 특성을 검토하였다.

Compound 1은 colorless crystal 의 형태로 MeOH, Acetone, EtOAc 에 잘 용해되었으며, TLC 정색 반응은 RP-18 plate를 사용하여 H₂O과 MeOH의 혼합용매(3:7)로 실험하였고 R_f (retention factor)값은 0.31이었으며 발색 시약으로 VS를 사용하여 가열하였을 때, dark brown spot을 나타내었다.

분자식은 질량 분석과 ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectral data를 바탕으로 C₂₅H₃₁NO₆ 로 확인되었다(Table 11).

Table 11. Physico-chemical properties of compound 1

Physico-chemical properties	
Appearance	Colorless crystal
Soluble	MeOH, Acetone, EtOAc
Insoluble	H ₂ O, Heptane
TLC (RP-18, H ₂ O:MeOH=3:7)	R _f =0.31
EI-MS (m/z)	442 [M] ⁺
IR ν _{max} (KBr)cm ⁻¹	3300, 2950, 1750, 1650
Molecular formula	C ₂₅ H ₃₁ NO ₆

Compound 1의 NMR spectroscopy data를 분석한 결과, ^1H -NMR spectral data의 δ 6.6-7.3 부근에 나타난 peak(Fig. 9)들과 ^{13}C -NMR spectral data의 δ 110-150 부근에 나타난 peak(Fig. 10)들을 통해서 benzene이 존재함을 확인할 수 있었다.

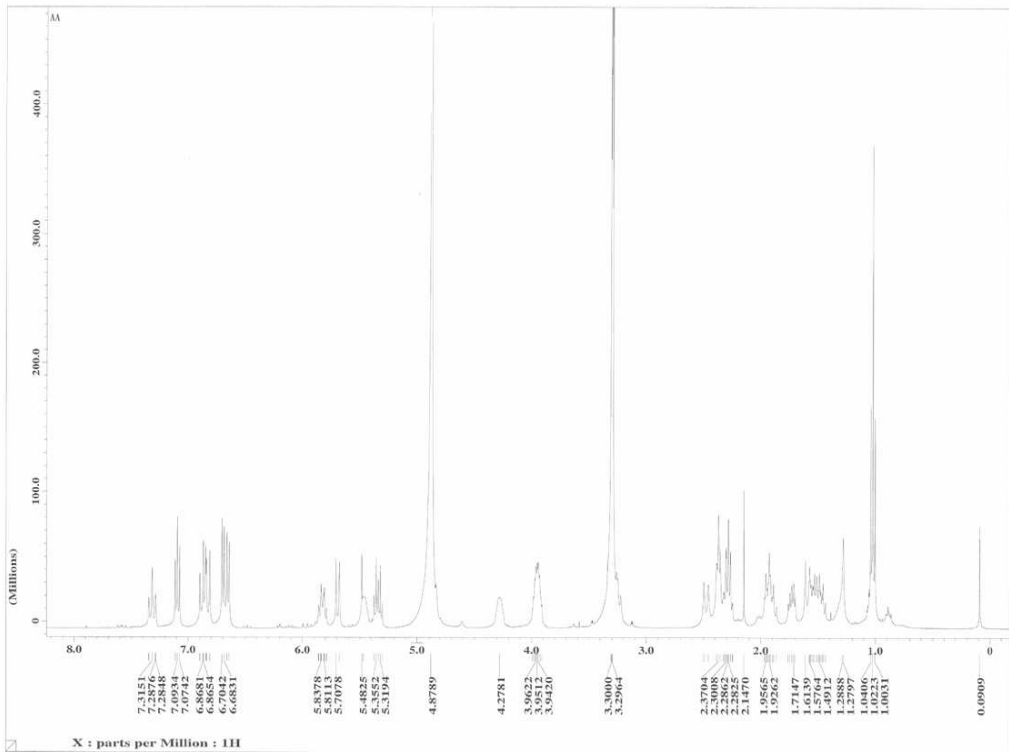


Fig. 9. ^1H -NMR spectrum of compound 1

^{13}C -NMR spectral data의 δ 193.6, 193.4, 171.5, 165.8, 155.0 에 나타난 quaternary carbon들 중에서 δ 171.5, 165.8은 carbonyl 기의 carbon임을 알 수 있었고, δ 110.0, 120.3, 125.3, 126.3, 137.6, 142.5 에 나타난 peak들을 통해서 3개의 이중 결합이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 10).

그리고 Compound 1의 분자식으로 미루어 볼 때 불포화도(IHD) 값은 11이었고, 2개의 ring 이 더 존재함을 확인할 수 있었다.

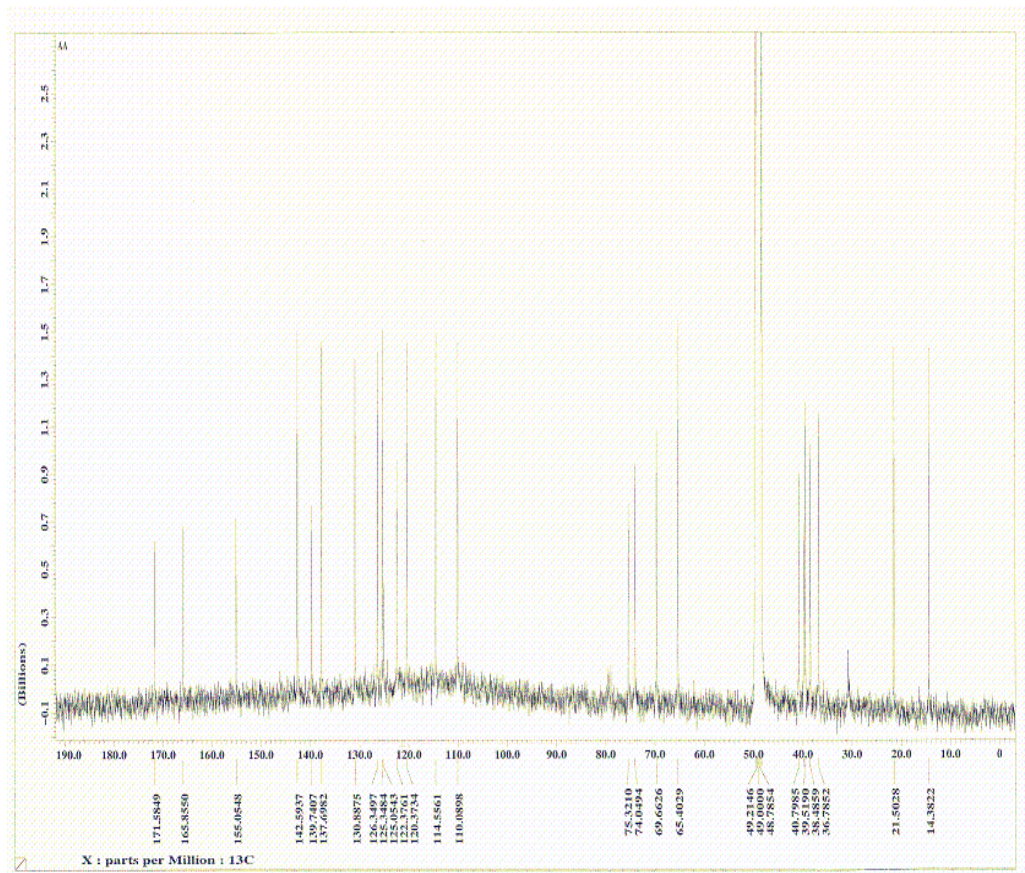


Fig. 10. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1

^{13}C -NMR spectral data에서 특히 δ 155.0의 carbon은 hydroxy 기에 의한 peak임을 확인할 수 있었고, HMBC 실험 결과 δ 122.3의 carbon과 결합한 proton과 correlation을 보였으며(Fig. 11), benzene을 이루는 carbon임을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

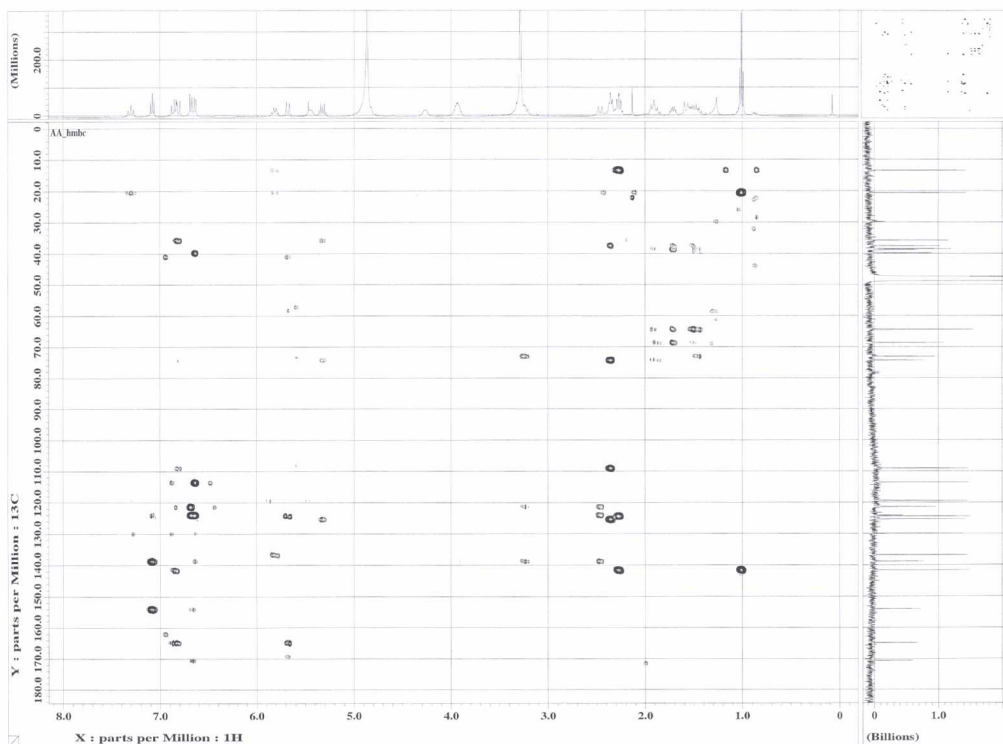
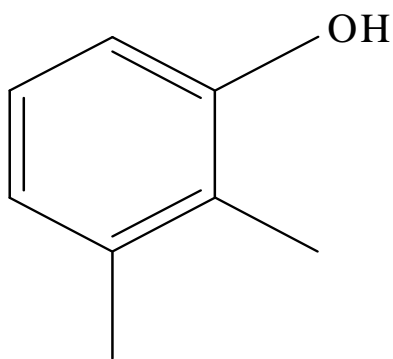
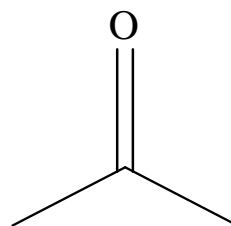


Fig. 11. HMBC spectrum of compound 1



segment (1)



segment (2)

Fig. 12. Partial structures (1) of compound 1

또한 DEPT spectral data를 분석한 결과, 13개의 methine group, 6개의 methylene group, 1개의 methyl group이 존재함을 알 수 있었고(Fig. 13), HMQC 실험을 통해서 ^1H -NMR spectral data의 peak들이 나타내는 각각의 proton들의 methine, methylene, methyl group 여부를 확인하였다(Fig. 14).

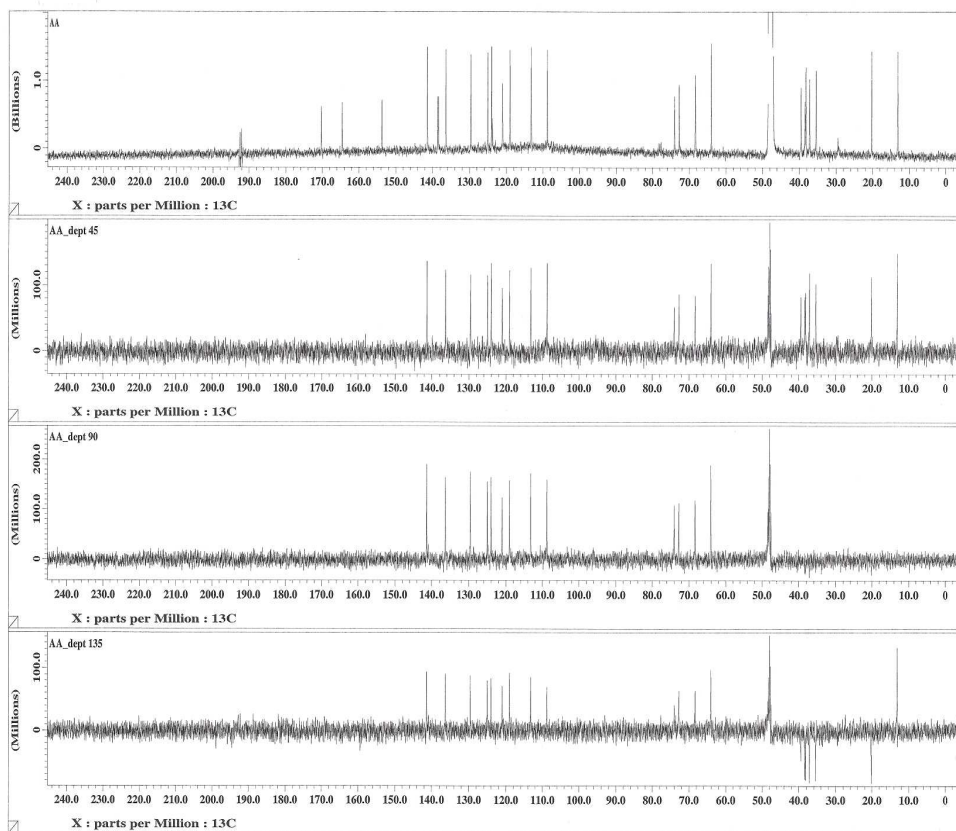


Fig. 13. DEPT spectrum of compound 1

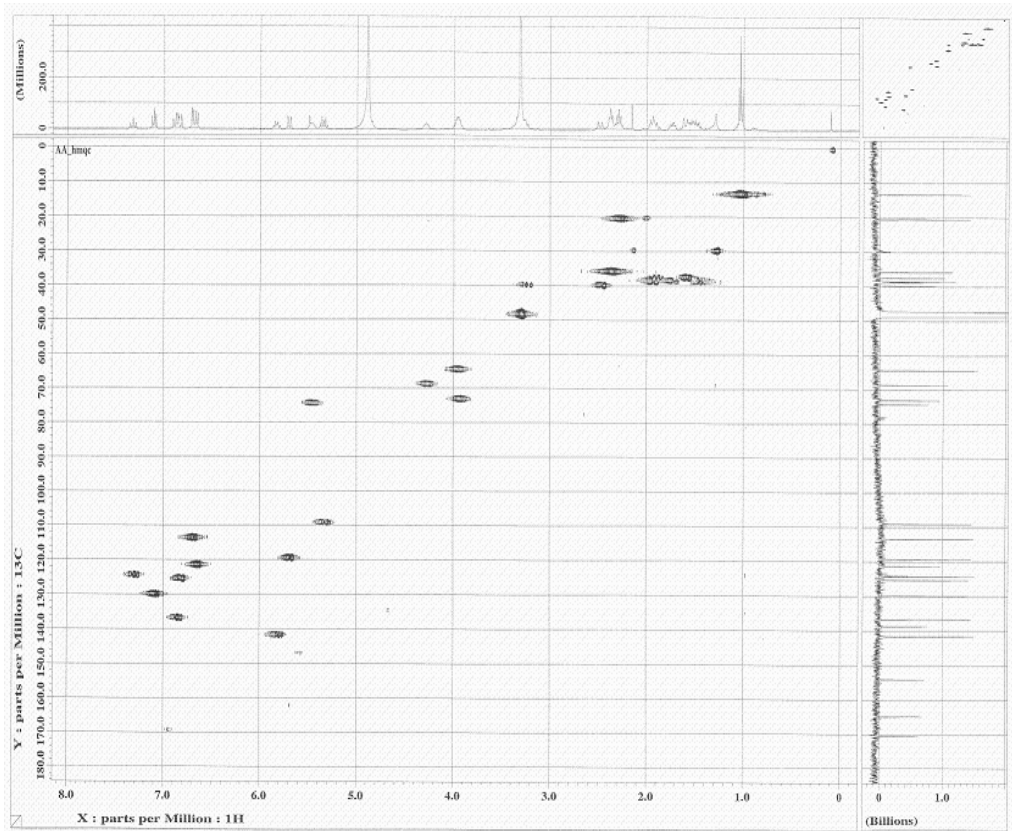


Fig. 14. HMQC spectrum of compound 1

이 뿐만 아니라, ^1H - ^1H COSY 실험을 통해서 C-12, 13, 14, 15, 16, 17번에 위치한 proton 들은 서로 correlation 보였음을 확인하였고(Fig. 15), 15번 carbon과 proton은 ^{13}C -NMR spectral data 와 ^1H -NMR spectral data 에서 각각 δ 69.6, δ 4.2 위치에 peak가 나타나는 것으로 보아 hydroxy기가 연결되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 13번, 17번 carbon은 ^{13}C -NMR spectral

data의 δ 74.0, 65.4 위치에서 각각 peak가 나타나고, ^1H -NMR spectral data 의 δ 3.95 위치에서 peak가 나타나는 것으로 보아 oxygenated carbon임을 확인할 수 있었다(Fig. 10,11). C-8, 9, 10, 11번과 결합한 proton 과 C-1, 2, 3, 4, 5, 6번 carbon의 proton 역시 ^1H - ^1H -COSY 실험을 통해 correlation 보였음을 확인하였다.

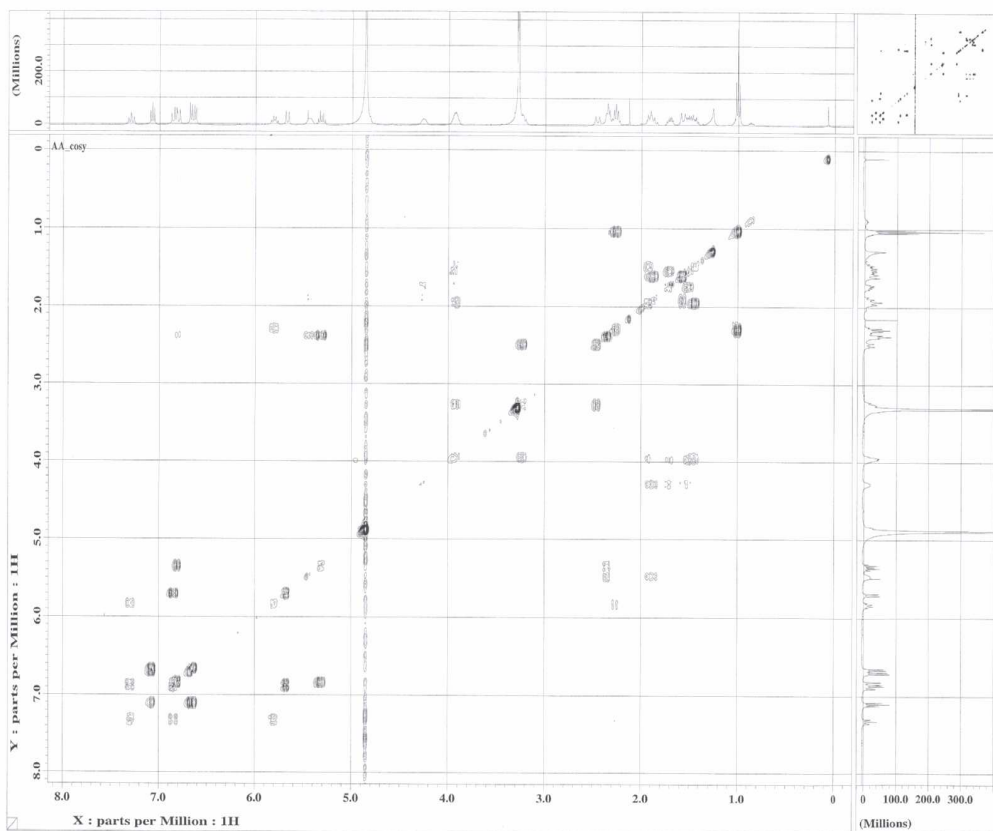


Fig. 15. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 1

이러한 $^1\text{H-NMR}$ spectral data와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data 및 DEPT spectral data, $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 실험을 바탕으로 일차적으로 Compound 1의 부분 구조들을 추정할 수 있었다(Fig. 16).

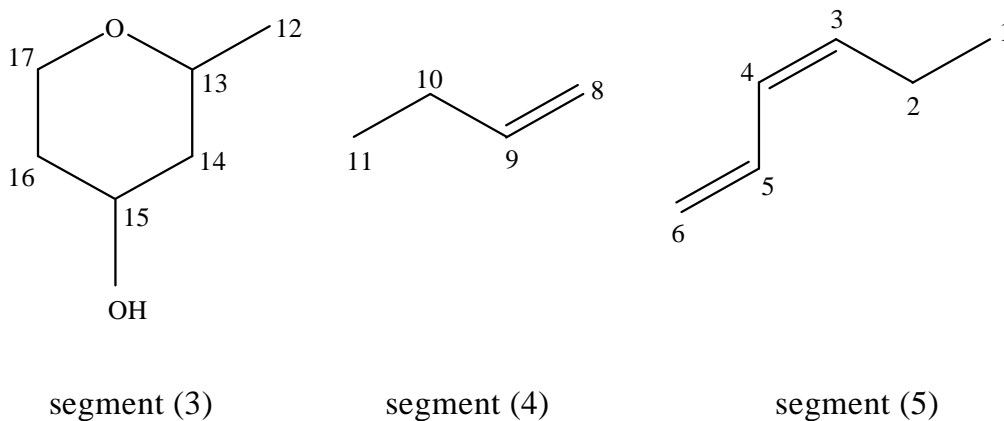


Fig. 16. Partial structures (2) of compound 1

Compound 1의 부분 구조들은 HMBC 실험을 통해서 C-6의 proton이 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data에서 δ 165.8 위치에서 peak가 나타나는 carbonyl 기의 carbon(C-7)과 correlation 보여 C-6 과 C-7 은 서로 연결되어 있음을 확인하였고, C-12의 proton은 C-11의 carbon과 correlation 보여 서로 연결됨을 확인하였다(Fig. 17).

C-20과 C-22 에 결합하고 있는 proton 역시 HMBC 실험을 통해서 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data의 δ 171.5 위치에서 peak가 나타나는 C-25과 correlation 보였음을 알 수 있었고, C-19, 20, 21, 22, 23, 24 가 이루는 benzene과 C-25 의 carbonyl 기가 서로 연결되어 있음을 확인할 수 있었다.

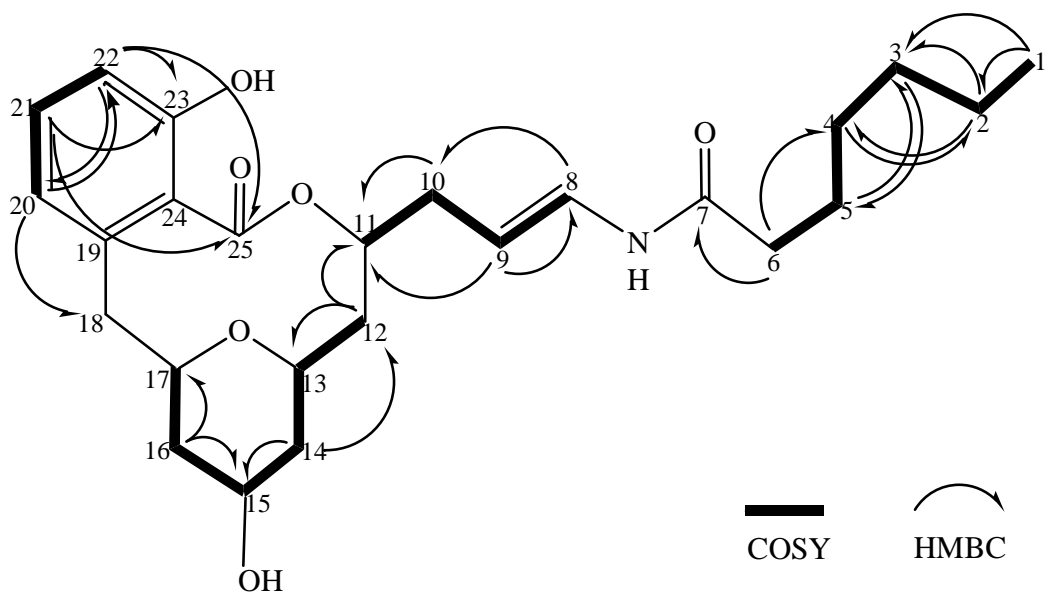


Fig. 17. ^1H - ^1H COSY(—) and HMBC(↷) correlations of compound 1

또한 C-11은 ^{13}C -NMR spectral data의 δ 75.3 위치에서 peak가 나타나고, 이 carbon 에 연결된 proton은 ^1H -NMR spectral data의 δ 5.4 위치에서 peak가 나타나는 것으로 보아 하나의 oxygen이 연결되어 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 C-20에 결합하고 있는 proton 은 ^{13}C -NMR spectral data의 δ 40.7에서 peak를 나타내는 C-18과 correlation 보여 서로 연결됨을 알 수 있었고, IR spectrum에서 3300 cm^{-1} 부근에서 흡수를 보이는 것으로 보아 2 차 amide bond가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 18).

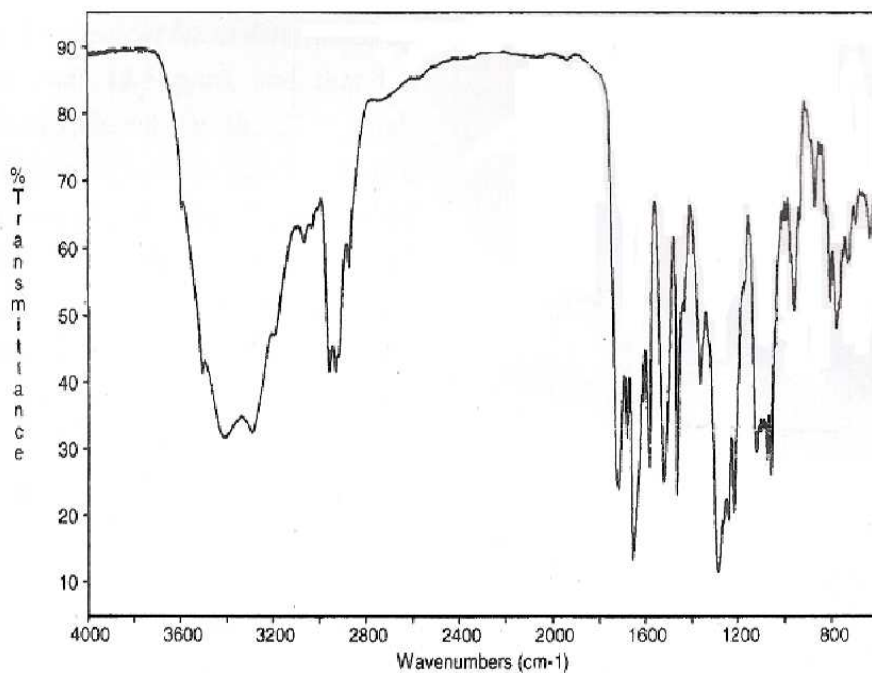


Fig. 18. IR spectrum of compound 1

Compound 1의 구조는 앞서 살펴본 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data와 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HMBC, HMQC 등 2D-NMR 실험에 의해서 결정되었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 Table 12.에 나타내었다.

이러한 실험 결과를 바탕으로 Compound 1은 10-membered lactone ring을 지닌 macrolide계의 화합물 Apicularen A임을 확인할 수 있었다(Fig. 19).

Table 12. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of compound 1

position	^1H	^{13}C
1	1.02 (3H, t)	14.3, q
2	2.28 (2H, m)	21.5, t
3	5.82 (1H, q)	142.5, d
4	7.31 (1H, t)	125.3, d
5	6.86 (1H, t)	137.6, d
6	5.70 (1H, d)	120.3, d
7	-	165.8, s
8	6.86 (1H, d)	126.3, d
9	5.33 (1H, m)	110.0, d
10	2.3 (2H, t)	36.7, t
11	5.48 (1H, m)	75.3, d
12	1.57 (2H, m)	36.7, t
13	3.95 (1H, m)	74.0, d
14	1.71 (2H, m)	38.4, t
15	4.27 (1H, m)	69.6, d
16	1.93 (2H, m)	39.5, t
17	3.95 (1H, m)	65.4, d
18	2.50 (2H, d)	40.7, t
19	-	193.4, s
20	6.68 (1H, d)	114.5, d
21	7.10 (1H, t)	130.8, d
22	6.70 (1H, d)	122.3, d
23	-	155.0, s
24	-	193.6, s
25	-	171.5, s

^1H and ^{13}C NMR spectra are measured in CD_3OD at 400 and 125MHz, respectively.

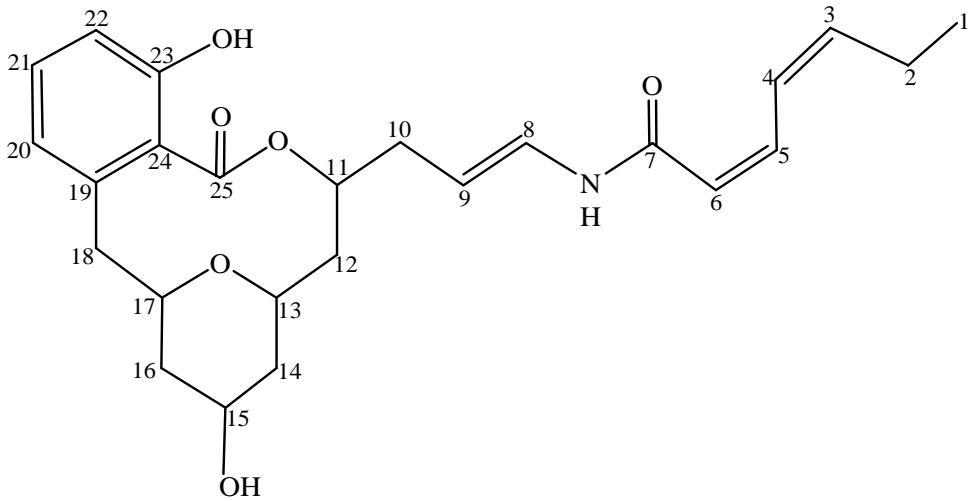


Fig. 19. Structure of compound 1

Apicularen A는 1997년 독일 GBF의 Reichenbach group 에 의해 용균성 점액 세균인 *Chondromyces* sp.의 대사 산물에서 분리된 세포 독성 물질로서 human 및 animal의 종양 세포에 대해 매우 우수한 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(4,21,43,44,45). 또한 독일 연구진에 의해 1999년에 물질 특허 등록이 되었고, 최근에 비로소 입체 구조가 밝혀졌으며 우수한 항암 활성과 특이성으로 인해 선진국을 중심으로 극히 최근에 연구가 시작된 화합물로서 그 구조는 해양 동물인 해면(*Haliclona* sp.)로부터 분리된 Salicylihalamide A 와 매우 유사한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 20).

Salicylihalamide A는 미국 암연구소(NCI)의 연구 결과에 의하면 human cancer cell에 대해 활성과 선택성이 높고, 특히 종양세포에 대한 활성 양상이 NCI가 지난 50년 동안 구축하여온 그 어떤 항암 활성 물질의 screening profile과도 일치하지 않는 특이한 것임이 밝혀져 새로운 항암제 선도 물질로

상당히 관심을 끌고 있지만, 이 물질의 생산자인 해면이 수심 10-15m의 해저에 서식하기 때문에 채취하기가 어렵고 또 대량 사육의 곤란으로 인해 물질의 대량 확보가 곤란한 실정이었다. Apicularen A는 그 구조 뿐만 아니라 활성 또한 Salicylihalamide A 와 매우 유사한 것으로 보고되어 있다(46).

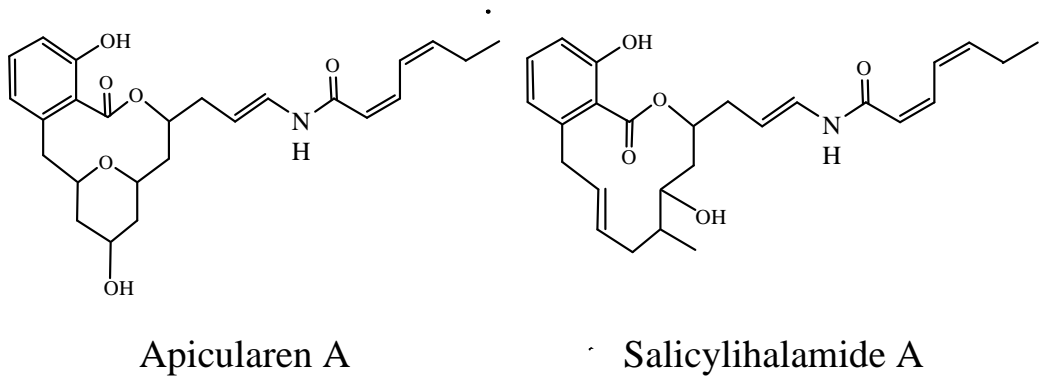


Fig. 20. Structures of Apicularen A and Salicylihalamide A

(3) 세포 독성

실험에 사용된 암세포주는 모두 인체 기원의 암세포주들로서, 폐암세포주인 A549, 자궁암세포주인 SK-OV-3, 피부암세포주인 SK-MEL-2, 중추신경계 암세포주인 XF498, 대장암세포주인 HCT15 를 사용하였고, 비교 약제로는 폐암, 소화기암, 방광 종양 등에 광범위하게 사용되는 항종양제 Doxorubicin을 사용하였다. 용균성 점액세균 *C.apiculatus* 로부터 분리된 Apicularen A의 암세포주에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 공시된 암세포주들에 대해 모두 강한 세포 독성을 나타내었으며, 이는 항종양제 Doxorubicin 보다 효과가 월등히 우수함을 확인할 수 있었다.

Table 13. Cytotoxic activity of compound 1

	ED ₅₀ (μM)				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
Apicularen A	0.0002	0.0003	0.0038	0.0007	0.0021
Doxorubicin	0.024	0.048	0.031	0.037	0.183

(4) 항균 활성

항균 활성 측정 실험에는 2종의 세균 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* 와 2종의 효모 *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*를 검정종으로 사용하였다. *C.apiculatus* 로부터 분리된 Apicularen A의 항균 활성을 측정한 결과, 2종의 세균과 2종의 효모에 활성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

Table 14. Antimicrobial activity of compound 1

Inhibition zone (mm)				
	Bacteria		Yeast	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>R.rubra</i>
Apicularen A	-	-	-	-
Reference	12.6/12.4	12.3/12.2	X	

Control : MeOH- CH₂Cl₂ (1:1)

Reference : Ciprofloxacin (10ppm)

3.2. Diketopiperazine 화합물의 분리 및 구조 결정

(1) 분리

최종 화합물을 순수하게 분리하기 위하여 semi prep HPLC 실험을 수행하였고, 균주 *C. apiculatus* 가 생산하는 대사 산물로부터 순수하게 분리 정제된 Compound 2를 얻을 수 있었다. HPLC 실험 결과 compound 2는 이동상으로 50% aqueous MeOH를 사용하였을 때, retention time이 28.37min이었고, UV spectrum에서 202nm에서 강한 흡수를 보였음을 알 수 있었다(Fig. 21).

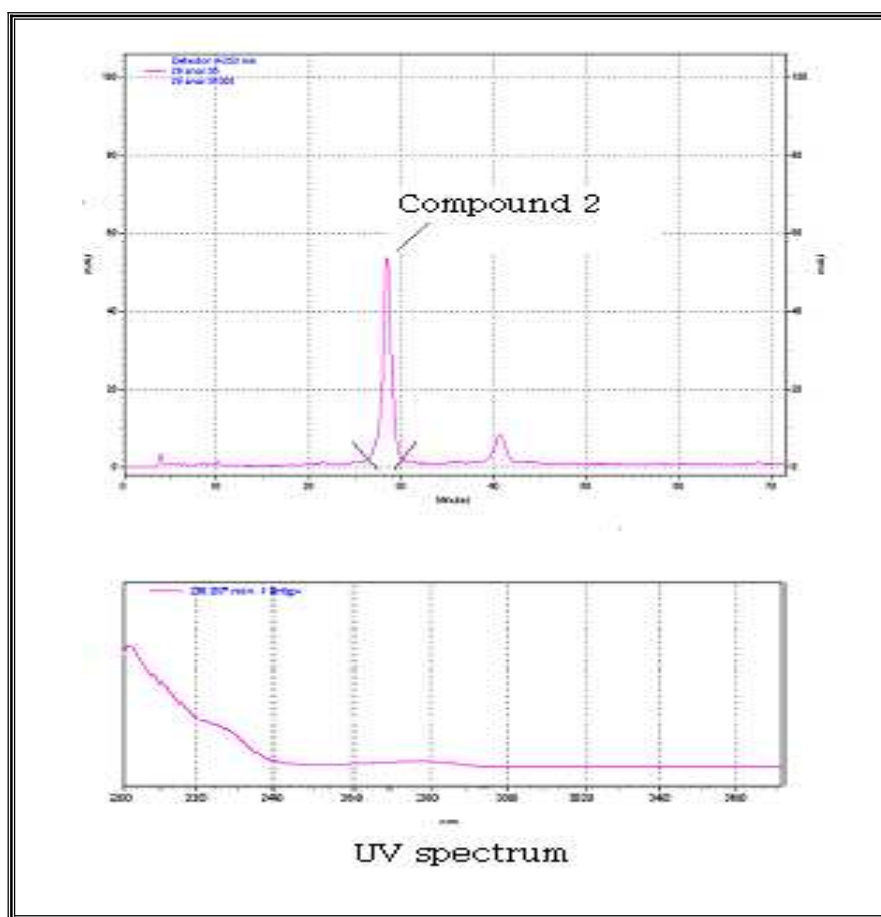


Fig. 21. HPLC profile and UV spectrum of compound 2

semi prep HPLC 실험 수행시 Analytical column (CAPCELL PAK C18: UG120Å, 5 μ m; 4.6mm I.D. x 250mm, SHISEIDO)과 Preparative column (CAPCELL PAK C18 : UG120Å, 5 μ m; 10mm I.D. x 250mm, SHISEIDO), Guard column (CAPCELL PAK C18 : UG120Å, 5 μ m; 4.6mm I.D. x 250mm, SHISEIDO)을 사용하였으며, 분석 조건은 Table 15 과 같다.

Table 15. HPLC condition for analysis of compound 2

Parameter	Condition
pump	LC-6AD (SHIMADZU)
column	CAPCELL PAK C18 (SHISEIDO)
detector	DAD (SPD-M10Avp, SHIMADZU) UV 254nm
mobile phase	50% aqueous MeOH
flow rate	0.6ml/min
injection volume	20 μ l

(2) 구조 결정

Compound 2의 구조를 규명하기 위하여 NMR spectroscopy와 IR spectral data 와 Mass spectrum data를 중점적으로 이용하였고, Compound 2의 물리 화학적 특성을 검토하였다(Table 16).

Compound 2는 white solid 의 형태로 MeOH, EtOAc, MC 에 잘 용해되었으며, TLC 정색 반응은 RP-18 plate를 사용하여 H₂O과 MeOH의 혼합 용매(5:5)로 실험하였고 R_f값은 0.30이었으며 발색 시약으로 VS를 사용하여 가열하였을 때, bright white spot을 나타내었다. Compound 2의 편광 측정 실험 결과 $[\alpha]_D^{20}$ 값은 -29.8° 로 측정되었고, 분자식은 high resolution ESI-MS spectrum 분석을 통해서 C₁₁H₁₈N₂O₂ 로 확인되었다.

Table 16. Physico-chemical properties of compound 2

Physico-chemical properties	
Appearance	White solid
Soluble	MeOH, EtOAc, MC
Insoluble	H ₂ O, Heptane
TLC (RP-18, H ₂ O:MeOH=5:5)	R _f =0.30
$[\alpha]_D^{20}$	-29.8° (c=1.1, MeOH)
ESI-MS (m/z)	211.1441 [M+H] ⁺
IR _{vmax} (KBr)cm ⁻¹	3259, 2951, 1685, 1668, 1633
Molecular formula	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂

Compound 2의 $^1\text{H-NMR}$ spectral data에서 δ 0.98 에 나타나는 peak는 2개의 methyl group을 나타냄을 확인할 수 있었고(Fig. 22), $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 downfield δ 4.11(H3), 4.01(H6), 3.56(H9) 에 나타나는 peak들과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 downfield δ 53.3(C3), 58.9(C6), 45.4(C9) 에 나타난 peak들을 통해서 C-3, 6, 9 는 Nitrogen에 연결되어 있는 carbon임을 확인할 수 있었다(Fig. 23).

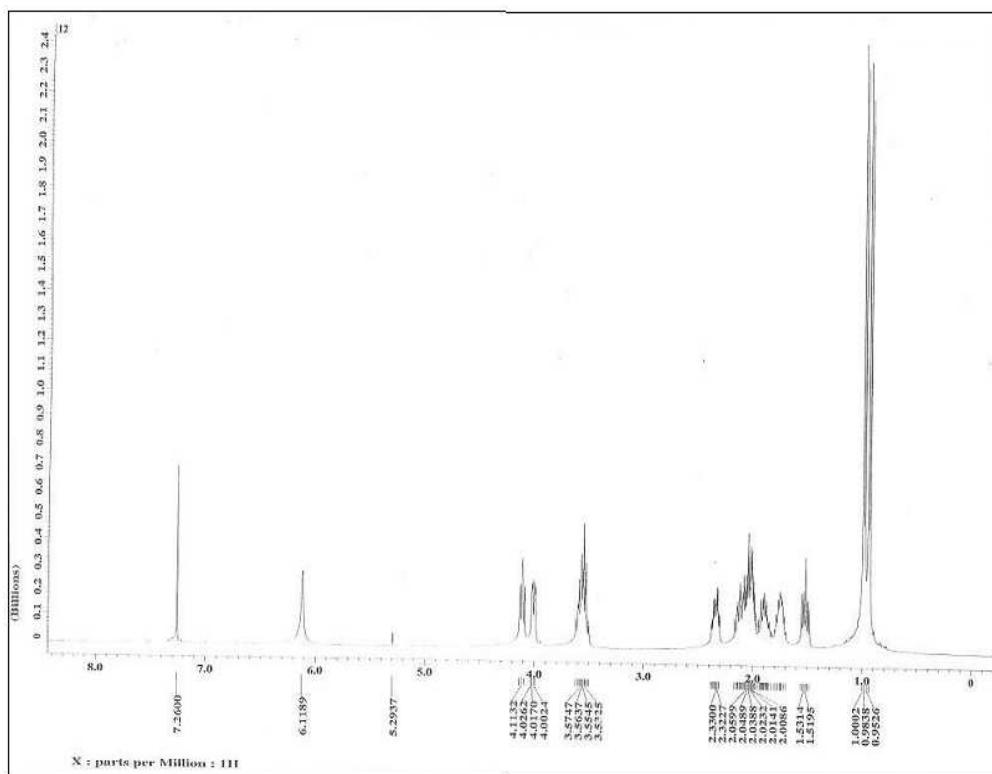


Fig. 22. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2

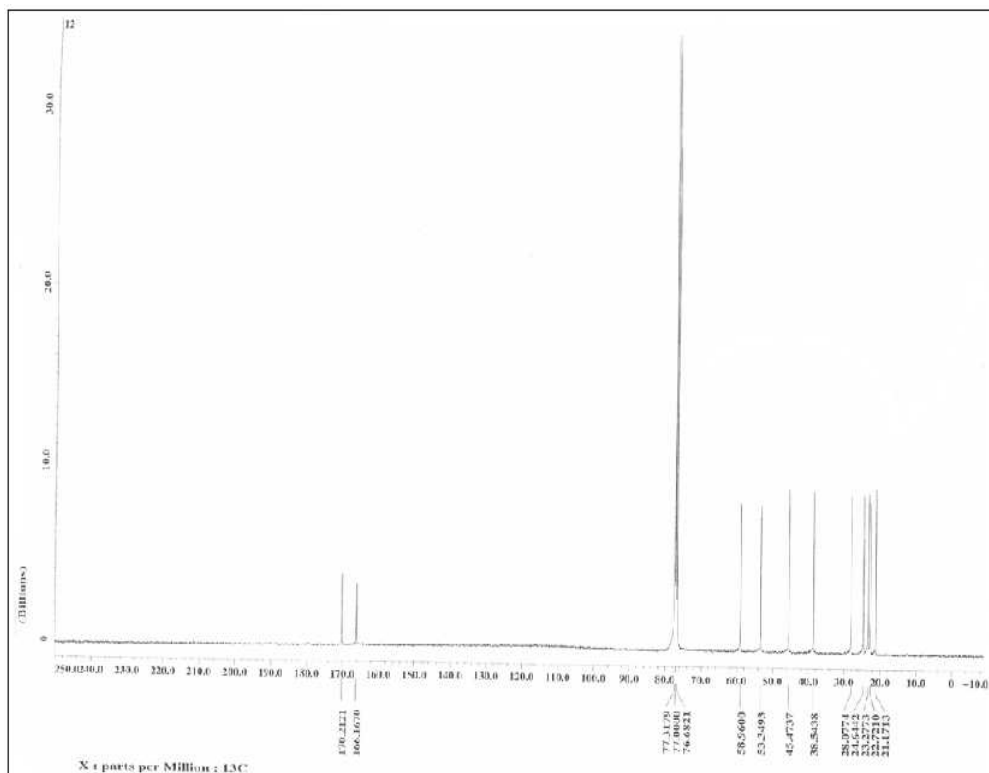


Fig. 23. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2

또한 ^{13}C -NMR spectrum의 δ 170.2, 166.1에 나타나는 peak들로 보아 2개의 carbonyl 기가 존재함을 확인할 수 있었고, DEPT spectral data를 통해서 3개의 methine group (C-3, 6, 11)과 4개의 methylene group (C-7, 8, 9, 10), 2개의 methyl group (C-12, 13)의 존재를 확인할 수 있었다(Fig. 24).

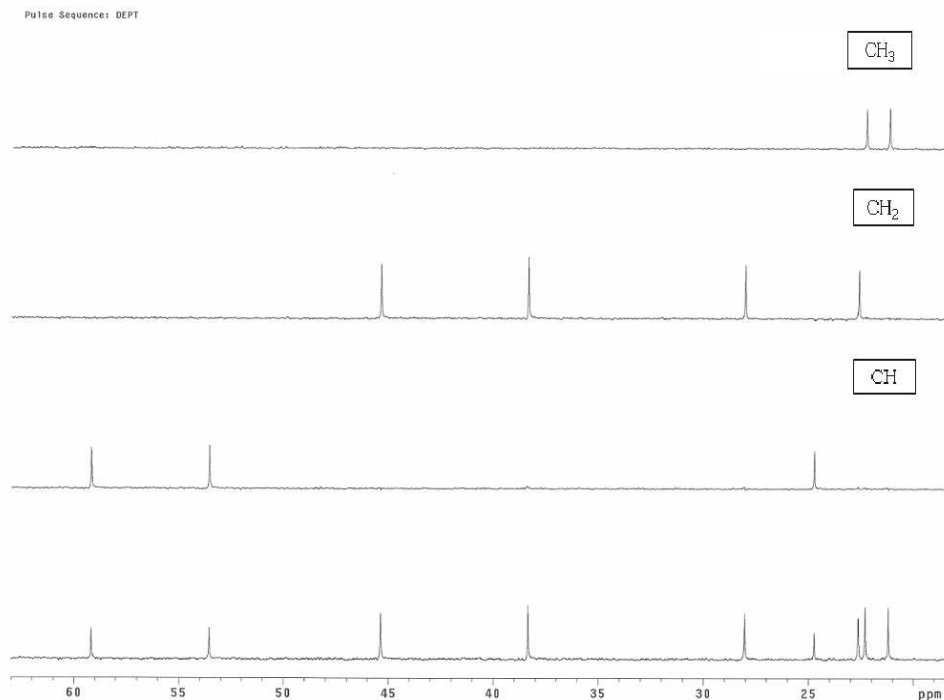


Fig. 24. DEPT spectrum of compound 2

^1H - ^1H COSY spectral data를 통해서 ^1H -NMR spectrum의 δ 4.11(C-3), δ 2.03(C-10), δ 1.52(C-11), δ 0.98(C-12), δ 0.98(C-13)의 peak가 나타내는 proton들이 correlation 보였음을 알 수 있었다(Fig. 25).

^1H -NMR spectrum에서 δ 4.01(C-6), δ 2.33(C-7), δ 2.05(C-8), δ 3.56(C-9)의 peak가 나타내는 proton 역시 ^1H - ^1H COSY 실험에서 correlation 보였음을 확인할 수 있었으며, 이를 바탕으로 Compound 2의 부분 구조를 추정하였다(Fig. 26).

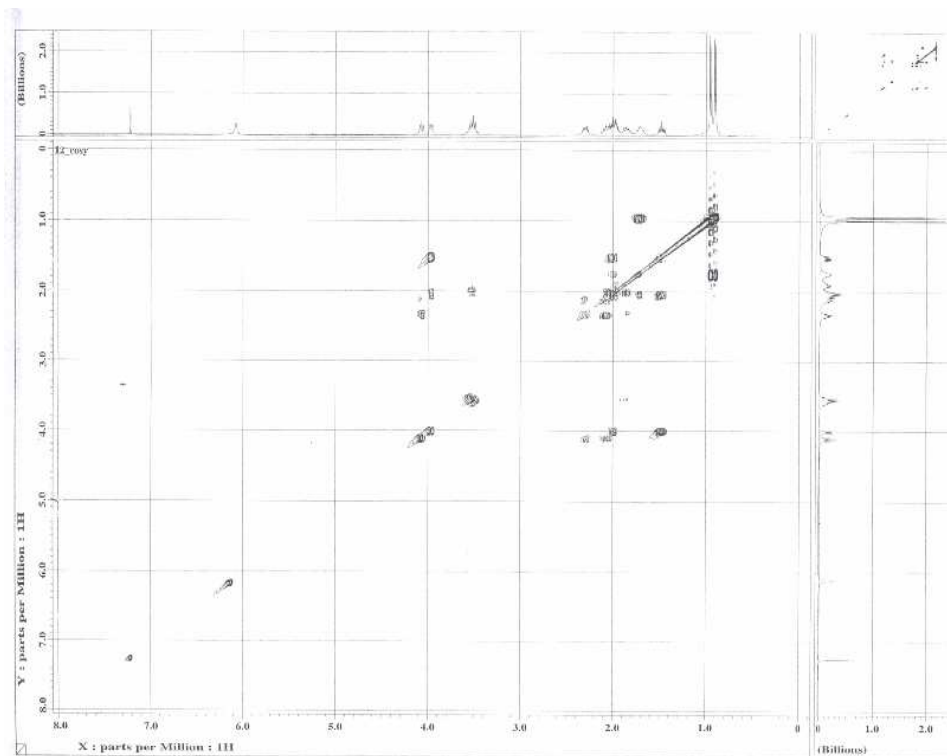


Fig. 25. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 2

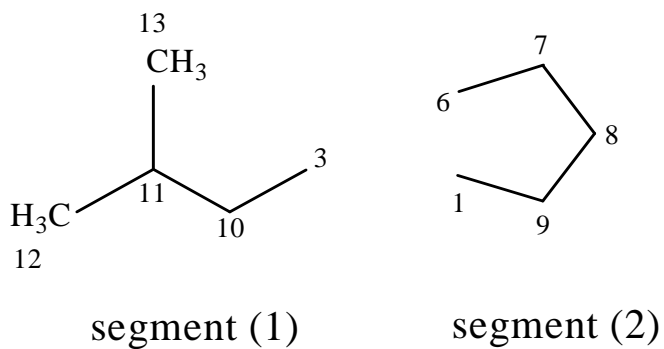


Fig. 26. Partial structures of compound 2

Compound 2의 HMBC spectrum의 long range correlation을 통해서 이 부분 구조들은 ^1H -NMR spectrum의 δ 2.05, 2.03에서 peak를 나타내는 H8, H10 과 ^{13}C -NMR spectrum의 δ 166.1에서 peak를 나타내는 carbonyl carbon C-5 이 correlation보이는 것을 확인하였고, 또한 ^1H -NMR spectrum의 δ 4.11에 peak를 나타내는 H3과 ^{13}C -NMR spectrum의 δ 38.5에 peak를 나타내는 C-10 그리고 ^1H -NMR spectrum의 δ 1.5에 peak를 나타내는 H11 과 ^{13}C -NMR spectrum의 δ 53.3에 peak를 나타내는 C-3 이 HMBC correlation에 의해서 서로 연결되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 27).

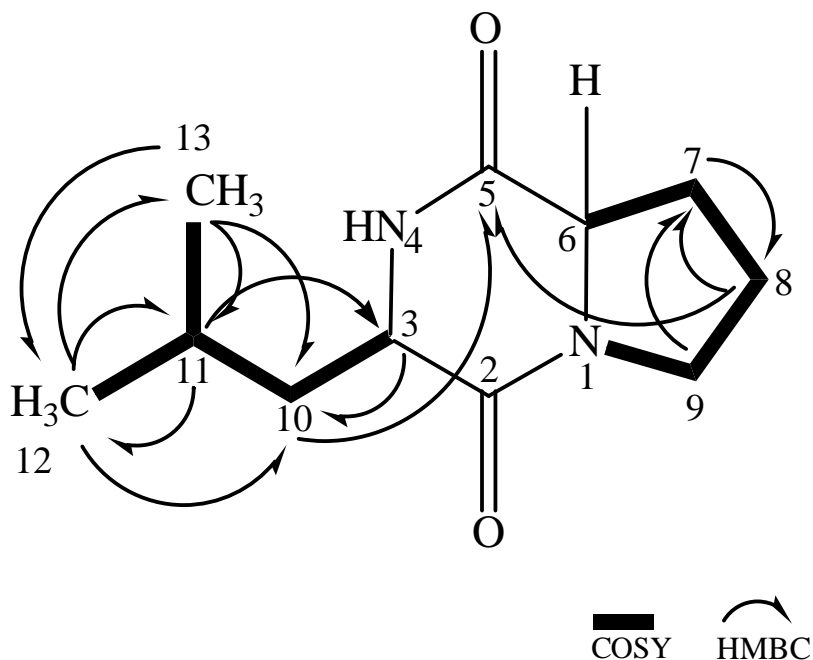


Fig. 27. ^1H - ^1H COSY(—) and HMBC(---) correlations of compound 2

Compound 2의 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectral data를 Table 17 에 나타내었다.

Table 17. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of compound 2

position	^1H	^{13}C
1	-	-
2	-	170.2, s
3	4.11 (1H, t)	53.3, d
4	-	-
5	-	166.1, s
6	4.01 (1H, dd)	58.9, d
7	2.33 (2H, m)	28.0, t
8	2.05 (2H, m)	23.2, t
9	3.56 (2H, m)	45.4, t
10	2.03 (2H, m)	38.5, t
11	1.52 (1H, m)	24.6, d
12	0.98 (3H, d)	21.1, q
13	0.98 (3H, d)	22.7, q

^1H and ^{13}C NMR spectrums are measured in CDCl_3 at 400 and 125 MHz, respectively.

Compound 2의 구조는 앞서 살펴본 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data와 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HMBC, HMQC 등 2D-NMR 실험 결과를 바탕으로 결정하였고, 최종적으로 Cyclo-leucylproryl임을 알 수 있었다(Fig. 28).

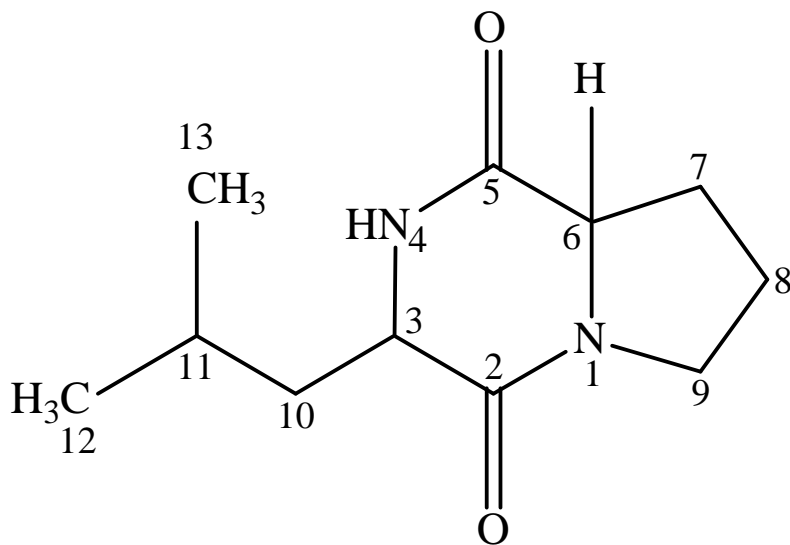


Fig. 28. Structure of compound 2

(3) 항산화 활성

Compound 2의 생물 활성에 대한 예비 실험 결과 ORAC assay에서 약한 항산화 활성이 나타남을 알 수 있었다.

ORAC assay는 peroxy radical 에 의해 형광값이 시간에 따라 감소하는 형광 표지 단백질 β -phycoerythrin (β -PE)에 peroxy radical generator인 2,2'-axobis(2-amindino propane) dihydrochloride(AAPH) 를 첨가함으로써 반응을 일으키고, sample의 항산화 효과를 검토하는 실험으로서 실험 결과, Compound 2는 대조 물질인 Trolox (water soluble Vitamin E analogue) 의 약 1/2 수준의 항산화 활성을 나타내었다(Table 18).

Table 18. Antioxidant activity

Sample No.	ORAC _{PE} value	DPPH IC ₅₀
Compound 2 (Cyclo-leucylproryl)	0.545	200<

ORAC value : standard - Trolox, Vitamin E analogue

DPPH IC₅₀ : standard - Ascorbic acid

IV. 결론

점액 세균은 자실체를 형성하는 그람 음성의 활주 세균으로서 원핵 생물 중 가장 복잡한 life cycle 과 까다로운 생육 조건으로 인해 통상의 세균 분리 방법으로는 자연계로부터 분리되지 않고 인공 배양이 어려워 그동안 학문적으로나 산업적으로 연구가 제한되어 온 특이한 미생물이다. 그러나 바로 그러한 이유로 현재는 신물질 분야의 미개척자원으로서 집중적인 관심과 표적의 대상이 되고 있어 가까운 장래에 이들에 대한 산업적 이용연구를 포함해 다방면에 걸쳐 대단히 활성화될 것으로 기대된다. 점액세균은 다양한 구조의 물질들을 생산할 뿐만 아니라 대부분 타 미생물로부터 생산된 적이 없는 그들 특유의 물질을 생산한다는 점으로 미루어 점액세균은 방선균에 필적하는 생리 활성 물질의 새로운 보고임을 나타낸다. 또한 현재까지 점액 세균에서 분리되어 보고된 화합물은 500여종에 불과하지만 향후 다양한 분리 source와 점액 세균의 분리 기술의 향상으로 인해 새로운 균주들과 함께 새로운 타입의 활성 물질이 계속 보고될 것으로 전망된다.

항균 작용에 역점을 둔 초기의 연구와는 달리 최근 점액 세균의 대사물질에 관한 연구 동향은 항암, 항바이러스제 및 각종 의약, 농약 활성, 기능성 식품 보조제 등으로 그 범위가 확대되고 있는데 특히 epothilone, tubulysin, Apicularen A가 항암제 분야에서 가장 유망한 선도 물질로 부상하고 있으며 선진 제약 기업들을 위주로 이들에 대한 신규 항암제로의 개발 경쟁은 활발히 진행되고 있다.

Apicularen A는 1997년 독일 GBF의 Reichenbach group 에 의해 용균성 점액 세균인 *Chondromyces* sp.의 대사 산물에서 분리된 10-membered lactone ring을 지닌 macrolide 계의 세포 독성 물질로서 human 및 animal의 종양 세포에 대해 매우 우수한 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다.(4,21,43,44,45) 이 화합물이 세계적 관심사가 된 것은 그 구조와 활성이

salicylhalamide A와 매우 유사하기 때문인데(46), salicylhalamide A는 해양 동물인 해면에서 분리된 것으로 미국 암연구소(NCI)의 결과에 의하면 human cancer cell에 대해 활성과 선택성이 높고, 특히 종양 세포에 대한 활성 양상이 미국 암연구소가 지난 50년 동안 구축하여온 그 어떤 항암 활성 물질의 screening profile과도 일치하지 않는 특이한 것임이 밝혀져 새로운 항암제 선도 물질로 상당히 관심을 끌고 있지만, 이 물질의 생산자인 해면이 수심 10-15m 의 해저에 서식하기 때문에 채취가 어렵고 또 대량 사육의 곤란으로 인해 물질의 대량 확보가 어려워서 더 이상의 개발 연구는 진전하지 못하였다. 이러한 상황에서 대량 배양이 가능한 점액 세균(Myxobacteria)의 대사 산물로부터 Salicylhalamide A를 대체할 Apicularen A가 분리됨으로서 이를 이용한 새로운 항암제 개발 연구는 다시 시작되었고, 생산 균주를 확보하고 있는 독일, 일본, 미국 등은 이 물질의 유도체 합성 및 특허 경쟁에 이미 뛰어 들어 있는 상태이다.

본 실험에서는 다양한 국내 토양에서 분리된 점액 세균으로부터 생산되는 생리 활성 물질을 탐색하던 도중 *Chondromyces apiculatus*의 배양물로부터 항암 활성 물질로서 Apicularen A를 분리 정제하여 그 구조를 규명하고 인체 기원의 암세포주에 대한 항암 활성을 조사하였다.

즉, 용균성 점액세균 *C.apiculatus* 로부터 분리된 Apicularen A 는 인체 기원의 폐암세포주인 A549, 자궁암세포주인 SK-OV-3, 피부암세포주인 SK-MEL-2, 중추신경계 암세포주인 XF498, 대장암세포주인 HCT15 에 대하여 모두 강한 세포 독성을 나타내었으며, 대조 물질로서 폐암, 소화기암, 방광종양 등의 치료에 광범위하게 사용되는 Doxorubicin 보다 효과가 월등히 우수함을 확인할 수 있었다.

또한 Apicularen A를 분리하는 과정에서 Diketopiperazine 화합물인 Cyclo-leucylproryl 를 분리 정제하여 그 구조를 규명하였으며, 생리 활성을 검토한 결과, 약한 항산화 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

V. 참고 문헌

1. Koch, AL., White, D., 1998. The social lifestyle of myxobacteria. *BioEssays*, **20**,1030-1038.
2. Wolgenuth, Ch., Hoiczyk, E., Kaiser, D., Oster, G., 2002. How myxobacteria glide. *Current Biology*, **12**,369-377.
3. Iizuka, T., Tokura, M., Jojima, Y., Hiraishi, A., Yamanaka, S., Fudou, R., 2006. Enrichment and phylogenetic analysis of moderately thermophilic myxobacteria from hot Springs in Japan. *Microbes Environ.* **21**,189-199.
4. 정권호, 김동훈, 심중섭, 안종웅, 2002. Apicularen A, a macrolide from *Chondromyces* sp., inhibits growth factor induced in vitro angiogenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**,702-705.
5. Anderson, ARA., Vasiev, BN., 2005. An individual based model of rippling movement in a myxobacteria population. *J. Theor. Biol.* **234**,341-349.
6. Ward, MJ., Zusman, DR., 1999. Motility in *Myxococcus xanthus* and its role in developmental aggregation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**,624-629.
7. Igoshin, OA., Oster, G., 2004. Rippling of myxobacteria. *Mathematical Biosciences*, **188**,221-233.
8. Oster, G., 2004. Clocks and patterns in myxobacteria ; a remembrance of a remembrance of Art Winfree. *J. Theor. Biol.* **230**,451-458.
9. Karwowski, JP., Sunga, GN., Kadam, S., McAlpine, JB., 1996. A method for the selective isolation of *Myxococcus* directly from soil. *J. Ind. Microbiol.* **16**,230-236.
10. Thaxter, R., 1892. On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot. Gaz.* **17**,389-406.

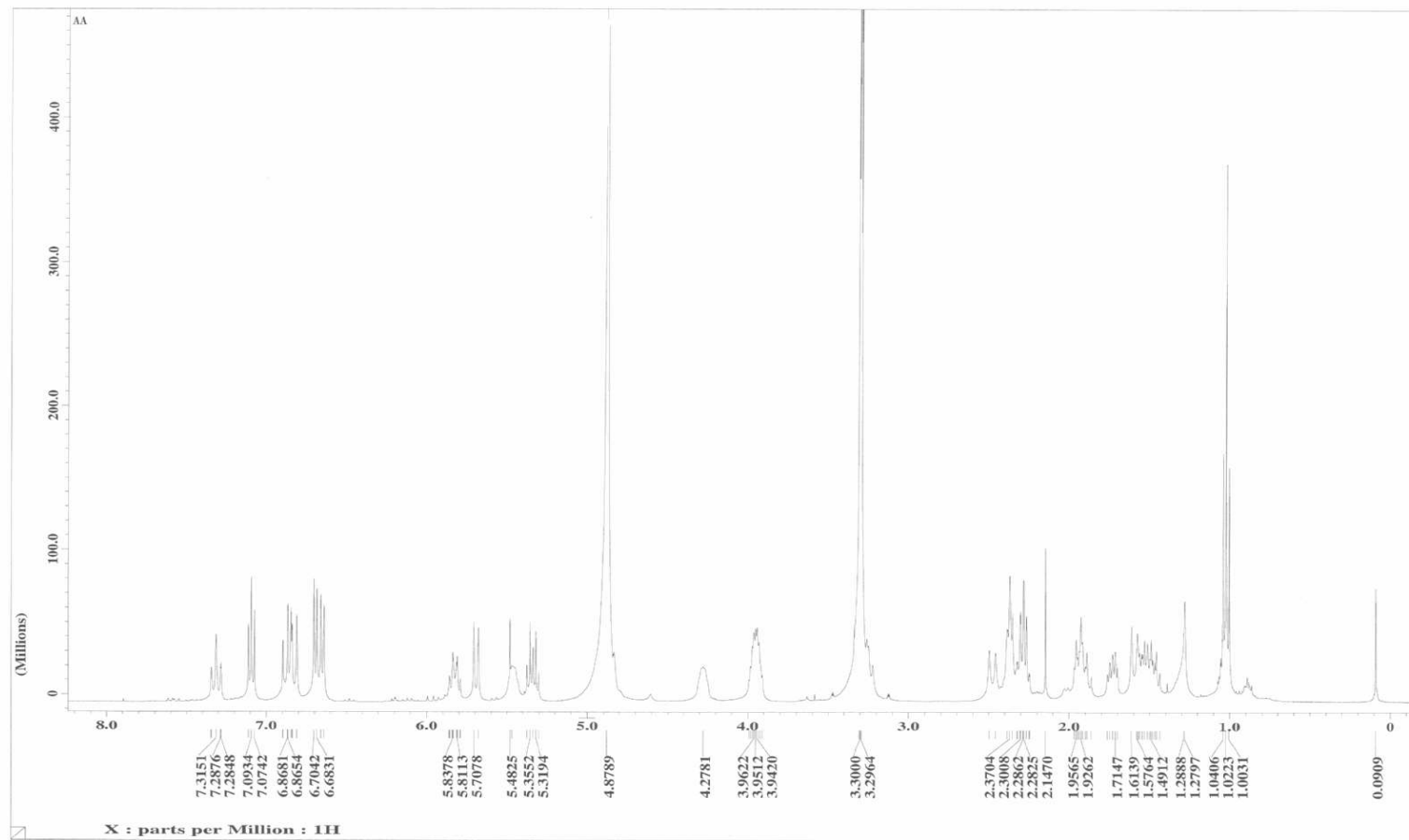
11. McCURDY, HD., 1963. A method for isolation of myxobacteria in pure culture. *Can. J. Microbiol.* **9**,282-284.
12. McCURDY, HD., 1969. Studies on the taxonomy of the myxobacteriales. *Can. J. Microbiol.* **15**,1453-1461.
13. McCURDY, HD., 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**,283.
14. McCURDY, HD., 1971. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**,40.
15. McCURDY, HD., 1971. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**,50.
16. MASUDA, 1959. *Nagaoa.* **6**,44.
17. Abe, N., Watanabe, T., Izaki, K., Takahashi, H., 1986. *Nippon Biseibutsu Seitaiigaku Kaiho.* **1**,1.
18. Yamanaka, S., Kawaguchi, A., Komagata, K., 1987. Isolation and identification of myxobacteria from soils and plant materials, with special reference to DNA base composition, quinone system, and cellular fatty acid composition, and with a description of a new species, *Myxococcus flavescens*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**,247-265.
19. Kundim, BA., Itou, Y., Sakagami, Y., Fudou, R., Yamanaka, S., Ojika, M., 2004. Novel antifungal polyene amides from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*: isolation, antifungal activity and absolute structure determination. *Tetrahedron.* **60**,10217-10221.
20. Niege, AJC., Furtado, MT., Pupo, IC., Vanessa, LC., Marta, CTD., Jairo, KB., 2005. Diketopiperazine produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. *J. Braz. Chem. Soc.* **16**,1448-1453.
21. Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Höfle, G., 1998. Reichenbach., Apicularen A and B, new cytostatic macrolides from *Chondromyces* species(Myxobacteria) : Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **51**,1075-1080.
22. Galinis, DL., McKee, TC., Pannell, LK., Cardellina II, JH., Boyd, MR.,

1997. Lobatamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the tunicate *aplidium lobatum*. *J. Org. Chem.* **62**,8968-8969.
23. 김용석, 배우철, 백성진, 2003. Myxobacteria의 생리활성 물질. *Kor, J. Microbiol. Biotechnol.* **31**,1-12.
24. Schulz, S., fuhlendorff, J., Reinchenbach, H., 2004. Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Tetrahedron.* **60**,3863-3872.
25. 조경연, 2001. Myxobacteria의 군집생활, 자실체 형성 및 생리활성물질의 생산. *생물 산업*, **14**,11-16.
26. 안종용, 정영훈, 정유섭, 지옥표, 2002. The Discovery of Promising New Leaders for Anticancer Drug Development from Myxobacteria. 21세기 바이오 천연물 과학 심포지움, 서울 대학교.
27. Yan, ZC., Wang, B., Li, YZ., Gong, X., Zhang, HQ., Gao, PJ., 2003. Morphologies and phylogenetic classification of cellulolytic myxobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **26**,104-109.
28. Reichenbach, H., 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**,149-156.
29. Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H., Trowitzsch, W., 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Antibiot.* **12**,1474-1490.
30. Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, TMA., Reichenbach, H., 1998. The Chondramides: Cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton. *J. NCI.* **90**,1559-1568.
31. Rachid, S., Krug, D., Kunze, B., Kochems, I., Scharfe, M., Zabriskie, TM., Blöcker, H., Müller, R., 2006. Molecular and biochemical studies of Chondramide formation-highly cytotoxic natural products from *Chondromyces crocatus* Cm c5. *Chem. Biol.* **14**,667-681.

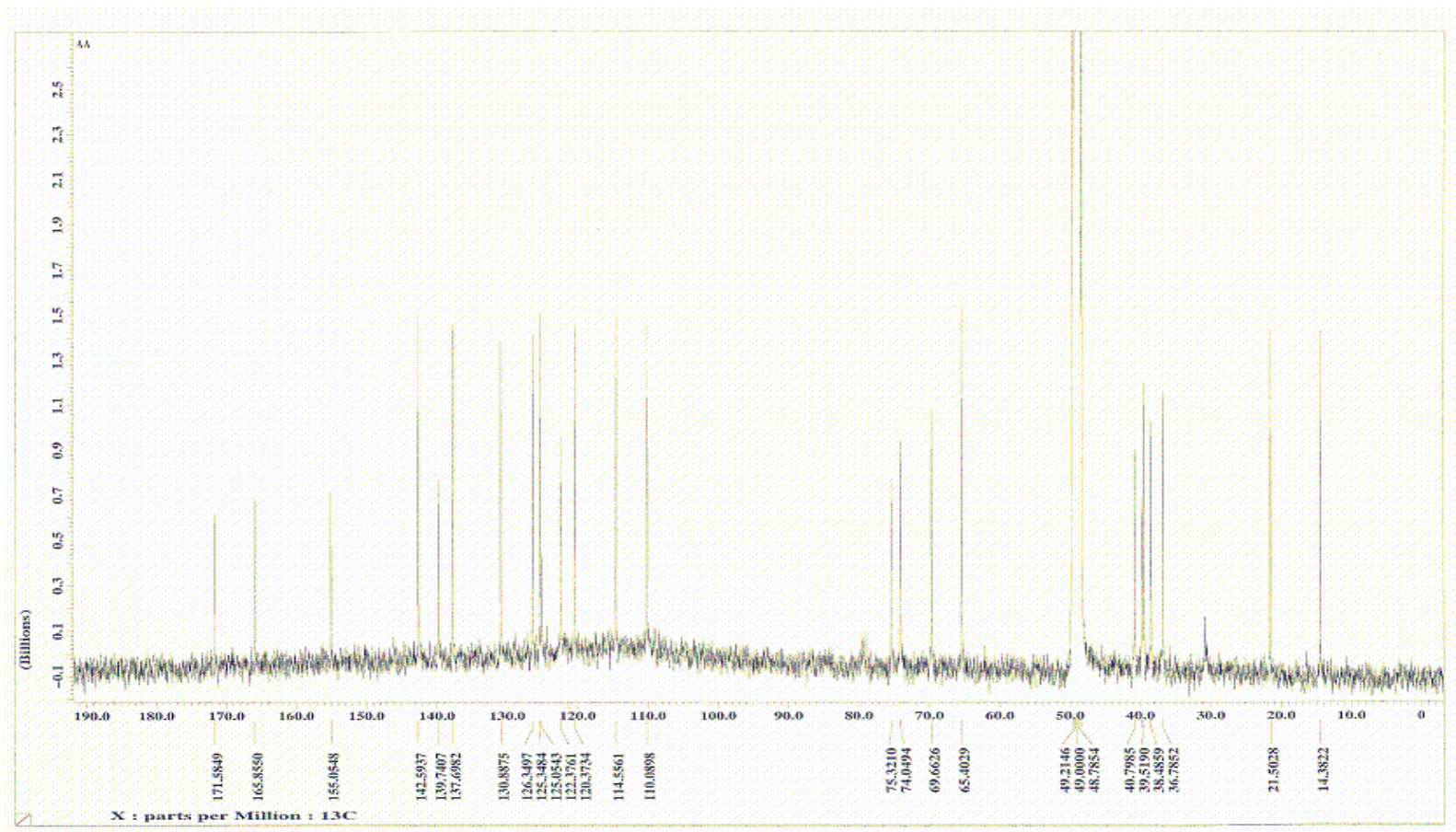
32. Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H., Reichenbach, H., 1996. Epothilones A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria) Production, Physico-chemical and Biological Properties. *J. Antibiot.* **49**,560-563.
33. Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, EM., 1984. Plant Drug Analysis. Springer Verlag.
34. Zhang, Li., Wang,Hai., Fang, Xiao., Stackebrandt, Er., Ding, Yan., 2003. Improved method of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains. *J. Microbiol. Method.* **54**,21-27.
35. Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Höfle, G., Reichenbach, H., 1995. Chondramides A-D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production,physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **48**,1262-1266.
36. 안중웅, 이정옥, 2002. *Myxococcus stipitatus* JW150이 생산하는 세포 독성 물질의 분리 및 특성. *Kor, J. Pharm. Soc.* **46**,108-112.
37. Bisby, RH., Brooke, R., Navaratnam. S., 2007. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assy. *Food chemistry.* S0308-8146.
38. Cao, G., Alessio, HM., Culter, R., 1991. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Fadical Biol. Med.* **14**,303-311.
39. Cao, G., Verdon, CP., Wu, AHB., Wang, H., Prior, RL., 1995. Automated assy of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin. Chem.* **41**,1738-1744.
40. Ou, B., Maureen, HW., Prior, RL., 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* **49**,4619.

41. J.H. Faull., 1916. *Chondromyces thaxteri*, a new myxobacterium. *Bot. Gaz.* **62**,226-232.
42. Holt, J., krieg, N., Sneath., Staley, J., Williams, S., 1994. Williams&Wilkins. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. 515-525.
43. Hong, J., Yamaki, K., Ishihara, K., Ahn, JW. Zee, O., Ohuchi, K., 2003. Induction of apoptosis of RAW 264.7 cells by the cytostatic macrolide apicularen A. *J. Pharmacy. Pharmacology.* **55**,1299-1306.
44. Hong, J., Ishihara, K., Zee, O., Ohuchi, K., 2005. Induction of apoptosis by apicularen A in human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Planta medica*, **71**,306-312.
45. Hong, J., Sasaki, H., Niikura, K., Yanai, M., Nakano, Y., Yokomakura, A., Ishihara, K., Hiraswa, N., 2007. Inhibition of bone resorption in cultures of mouse calvariae by apicularen A. *Planta medica*, **73**,173-175.
46. Erickson, KL., Beutler, JA., Cardellina II, JH., Boyd, MR., 1997. Salicylihalamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp. *J. Org. Chem.* **62**,8188-8192.

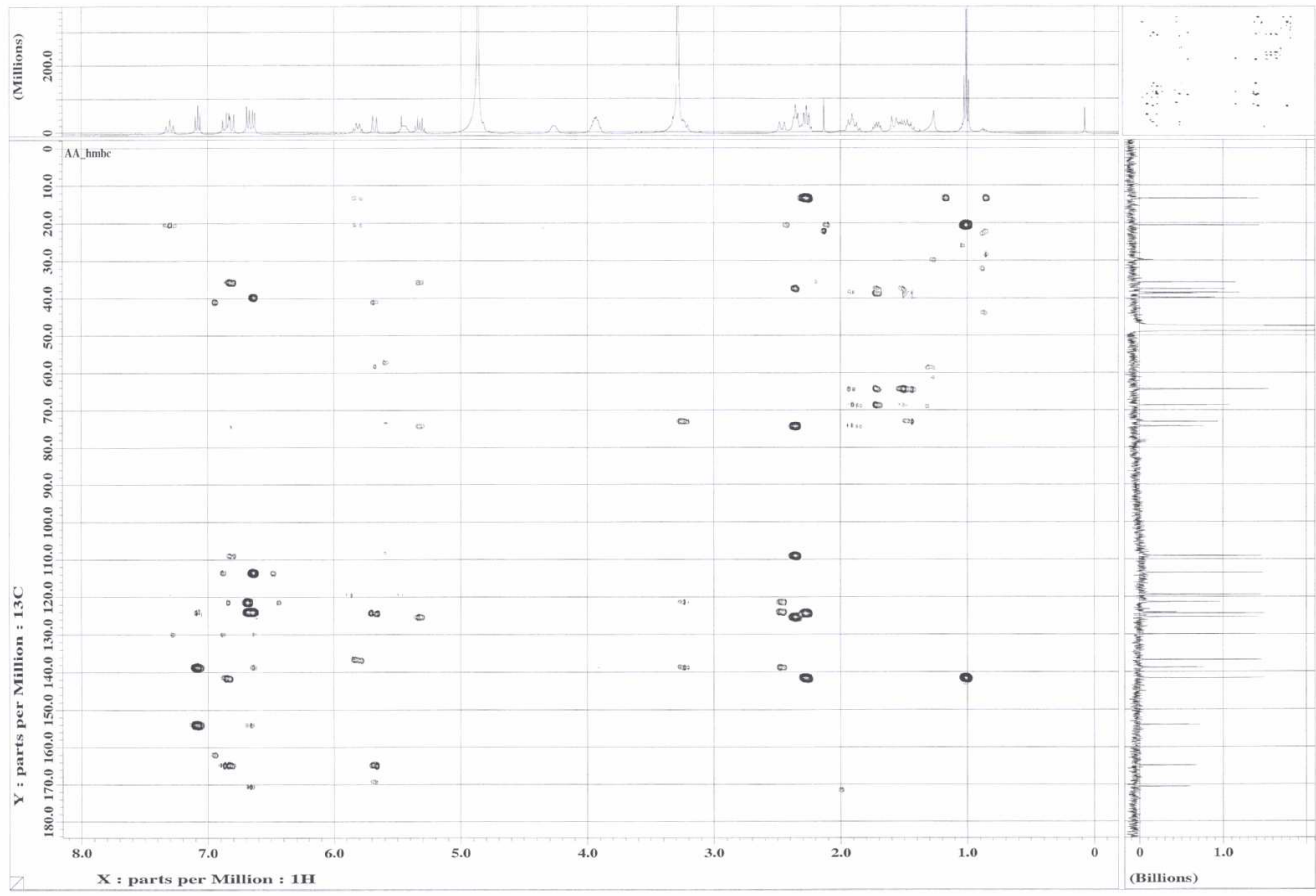
부 록



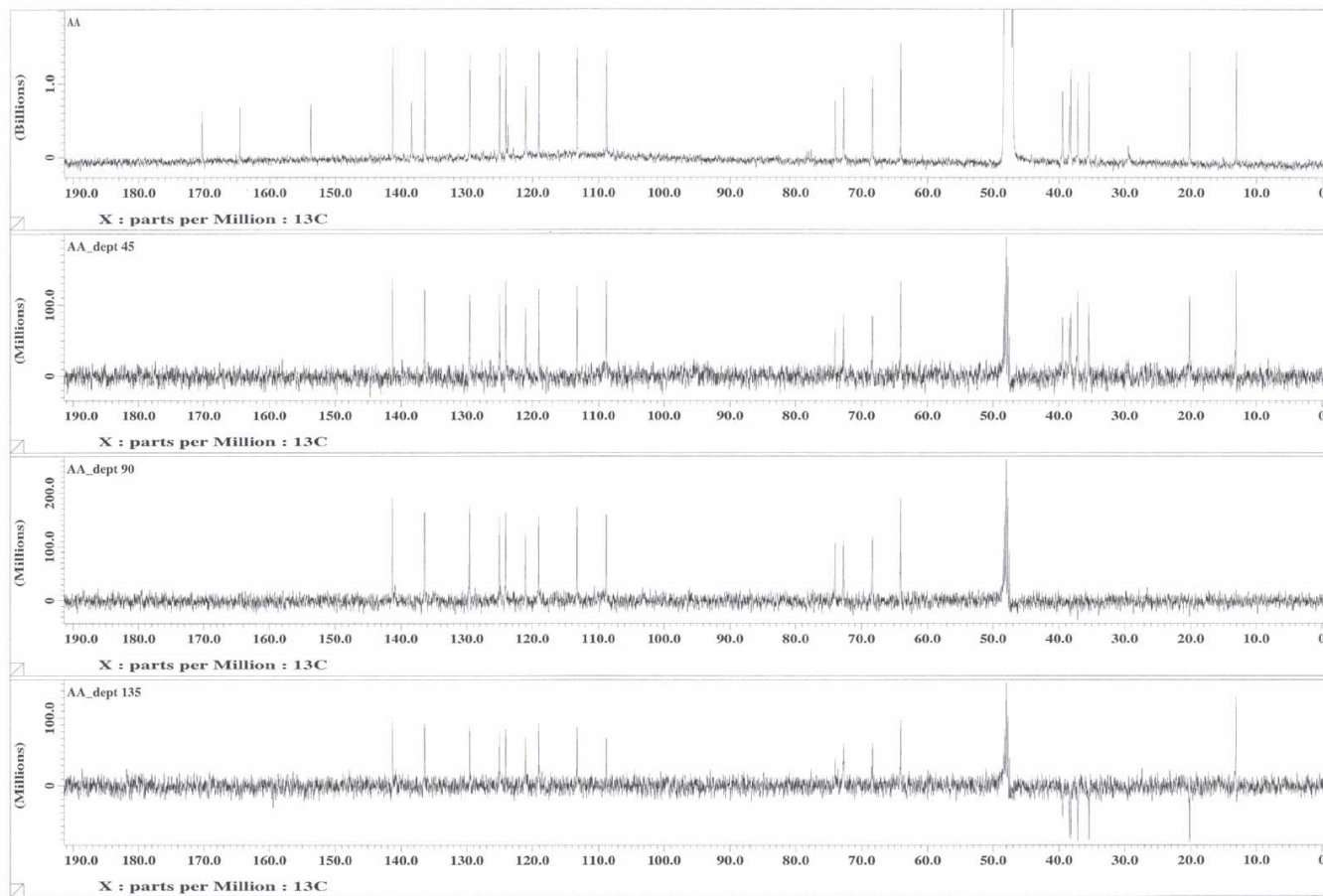
^1H -NMR spectrum of compound 1



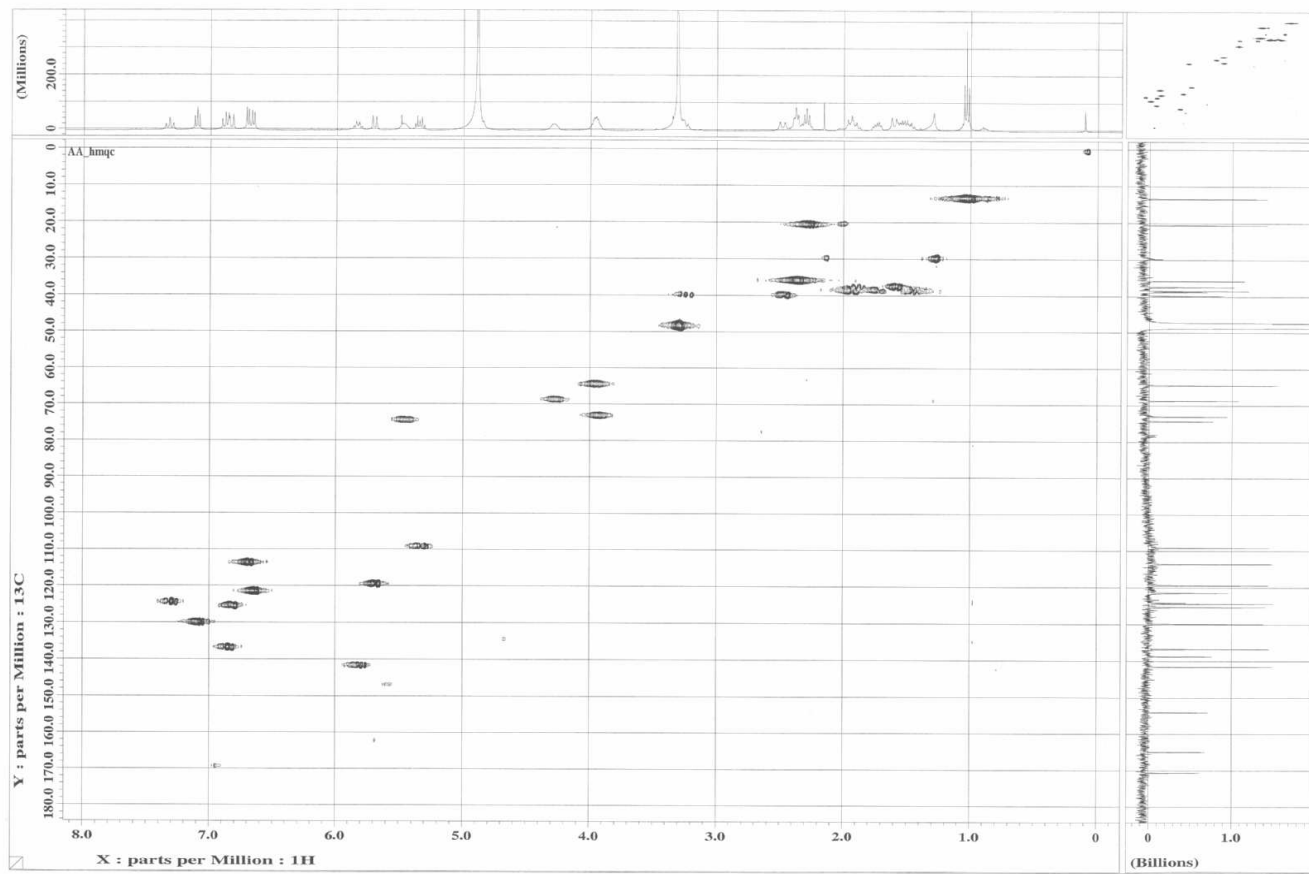
^{13}C -NMR spectrum of compound 1



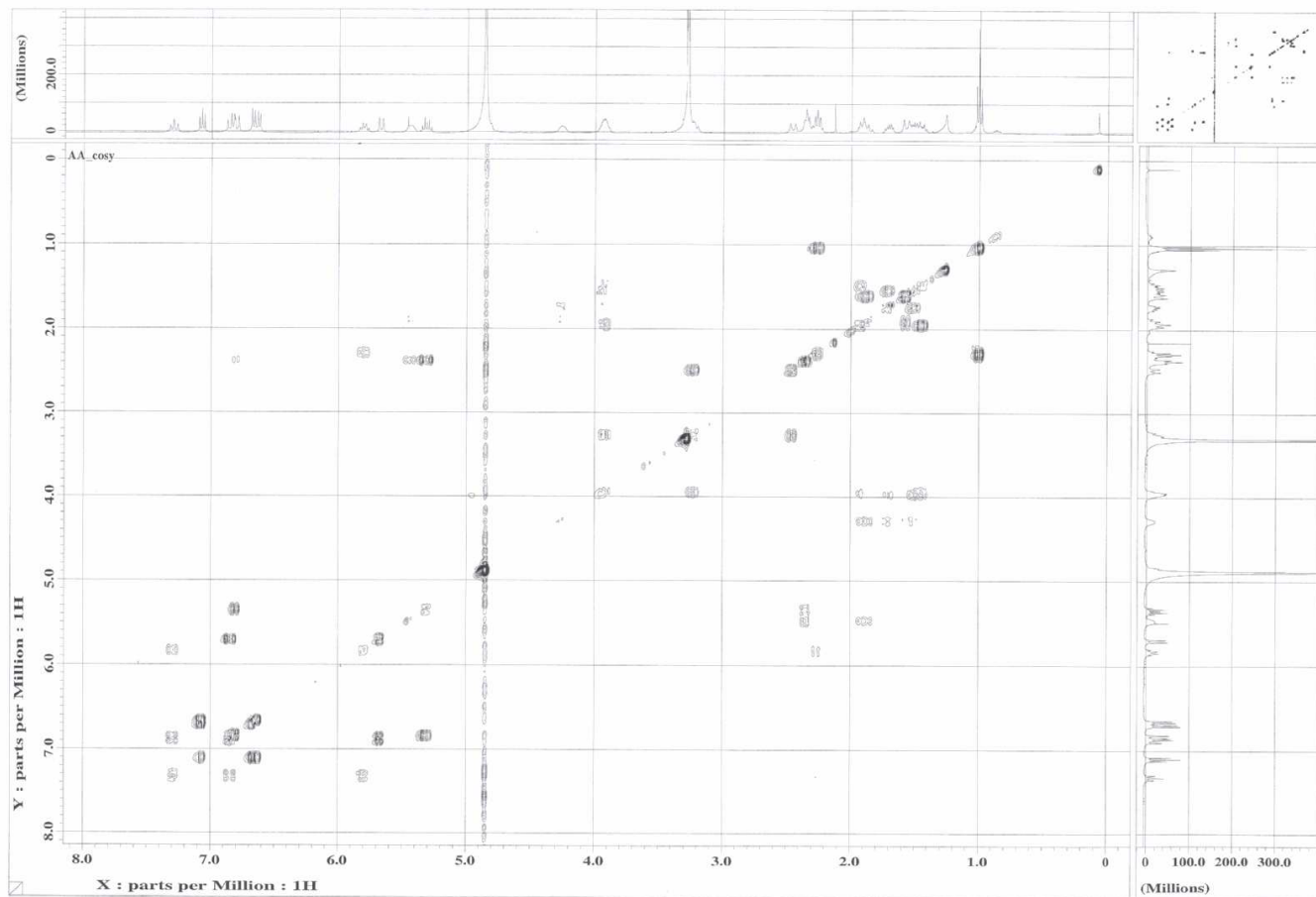
HMBC spectrum of compound 1



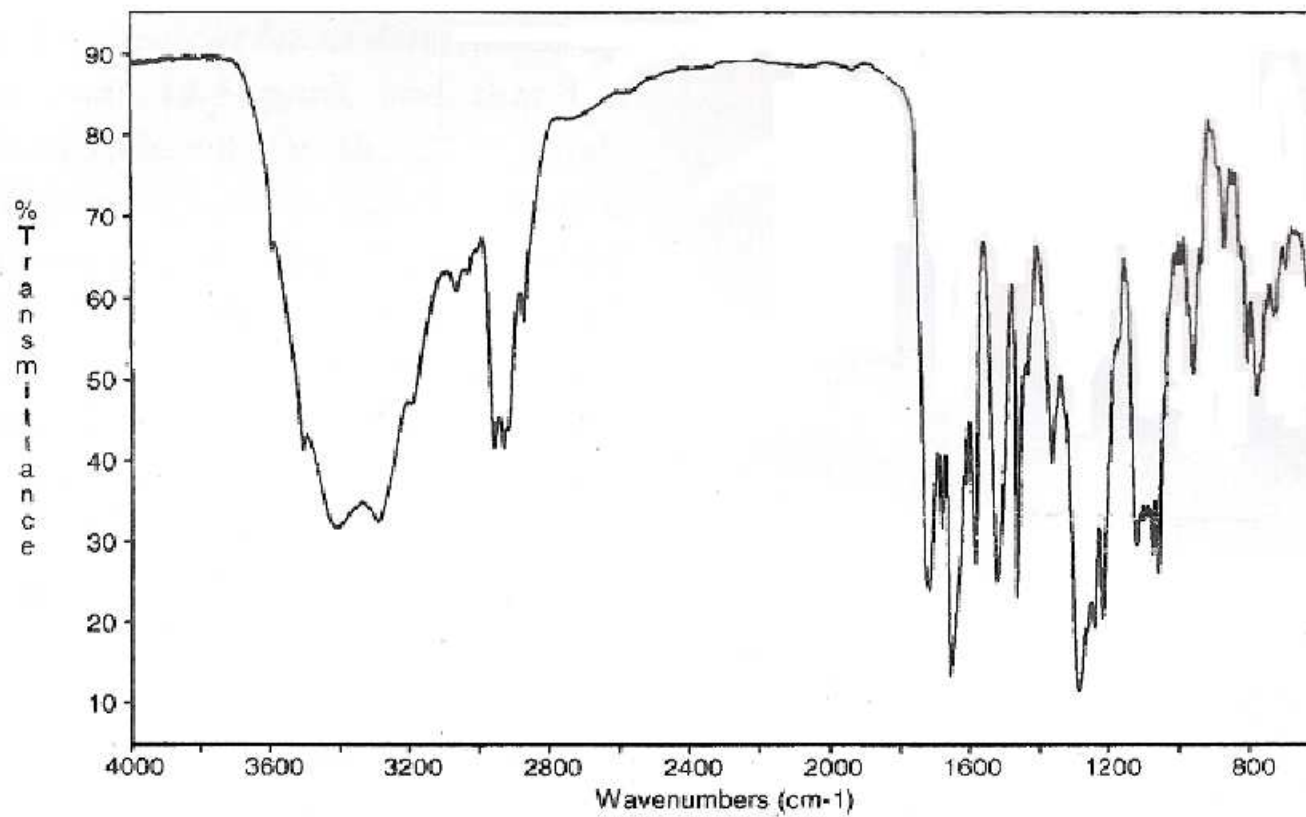
DEPT spectrum of compound 1



HMQC spectrum of compound 1

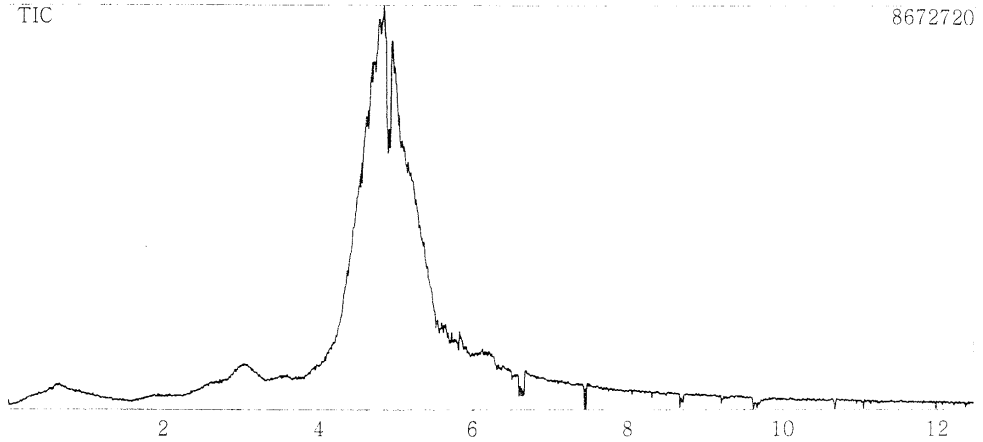


^1H - ^1H COSY spectrum of compound 1

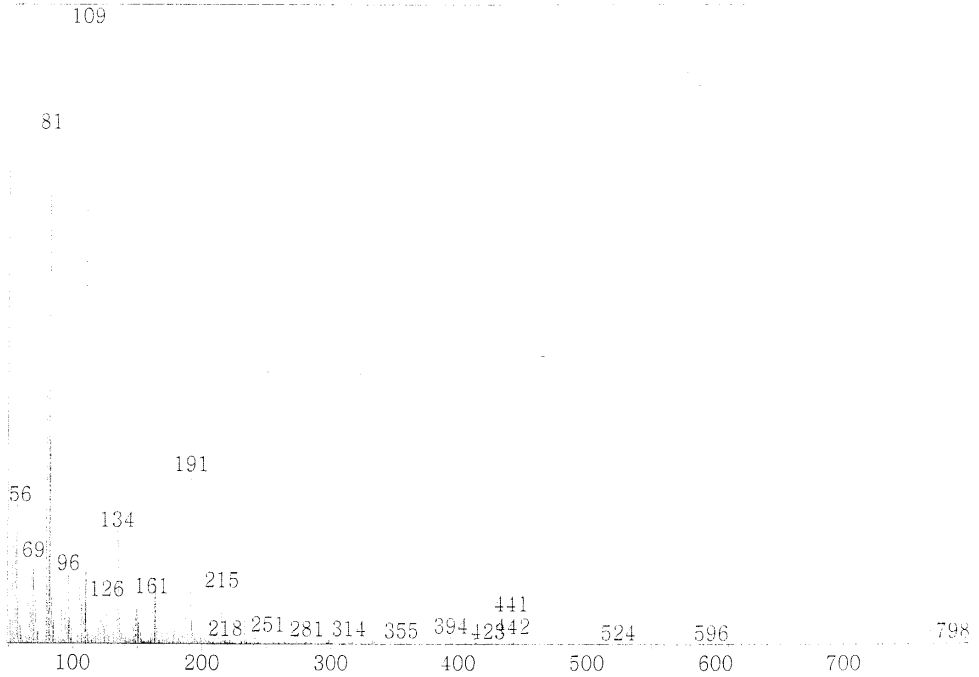


IR spectrum of compound 1

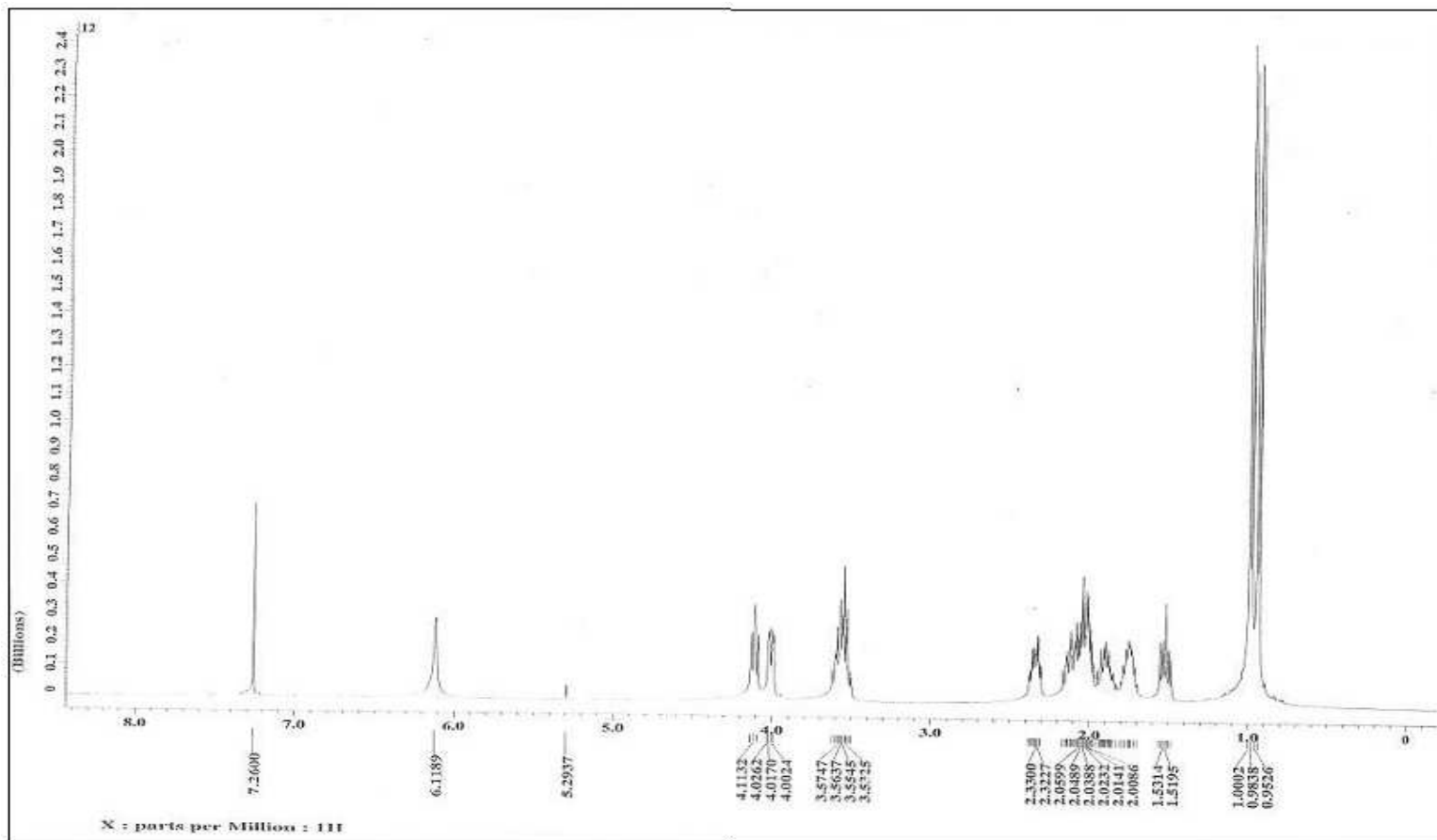
*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : 071101A.D01 07/11/01 14:39:55
Sample : 071101A
ID : 071101A
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Type : Unknown
Operator :
Method File Name : DLM00



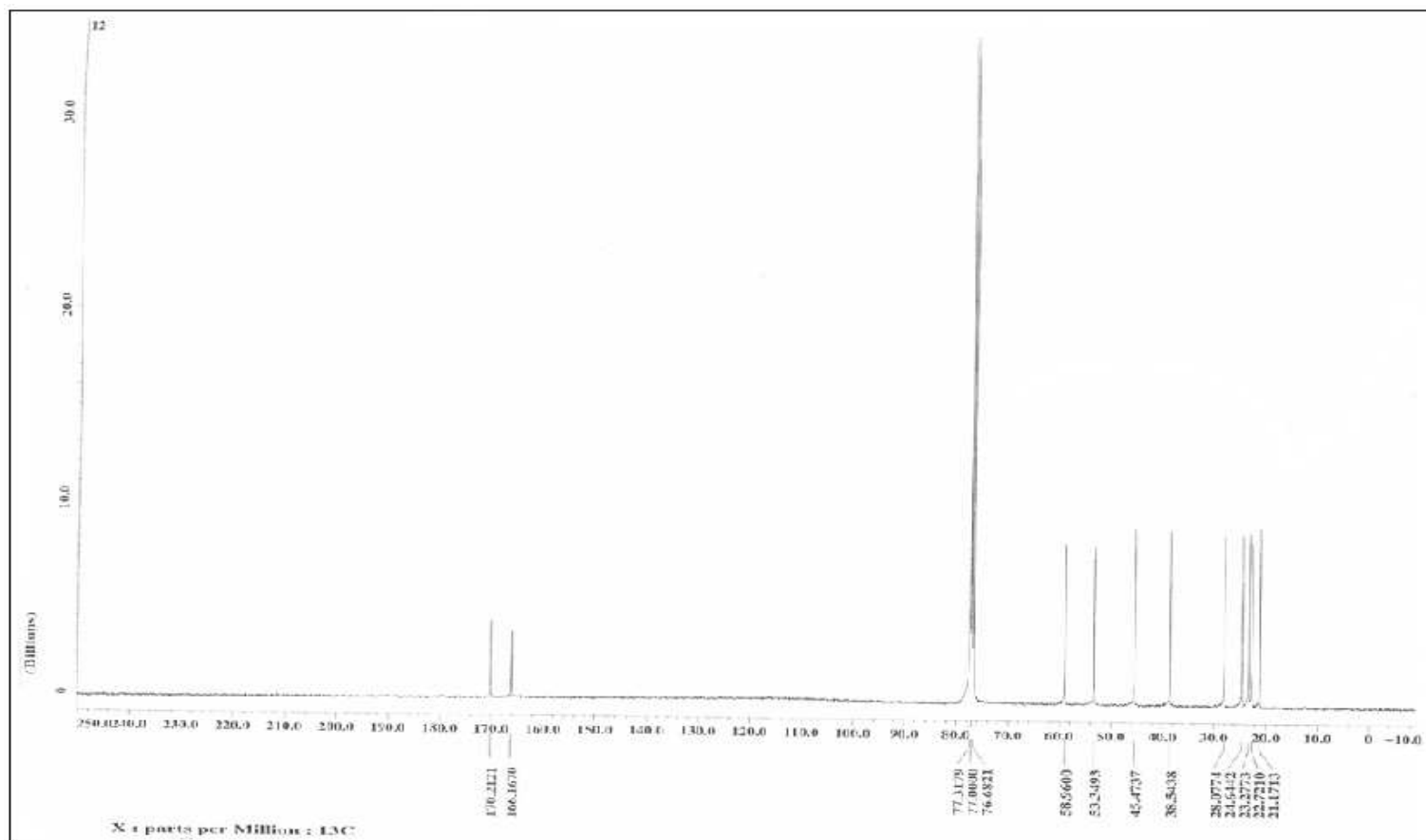
Scan # : 551 B.G. Scan # : 1173
Mass Peak # : 262 Ret. Time : 4.592
Base Peak : 109.15 (679216)



Mass spectrum of compound 1

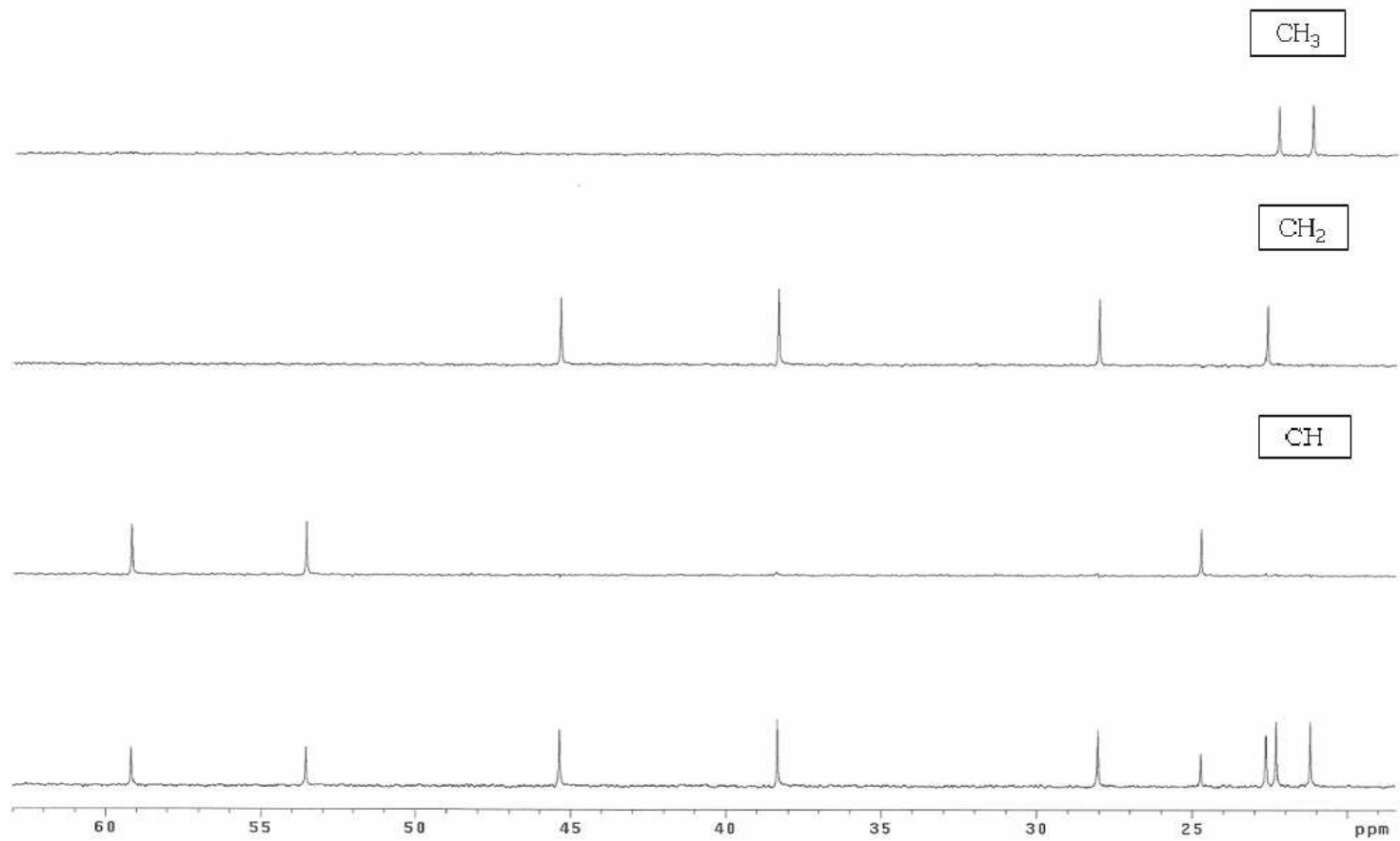


$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2

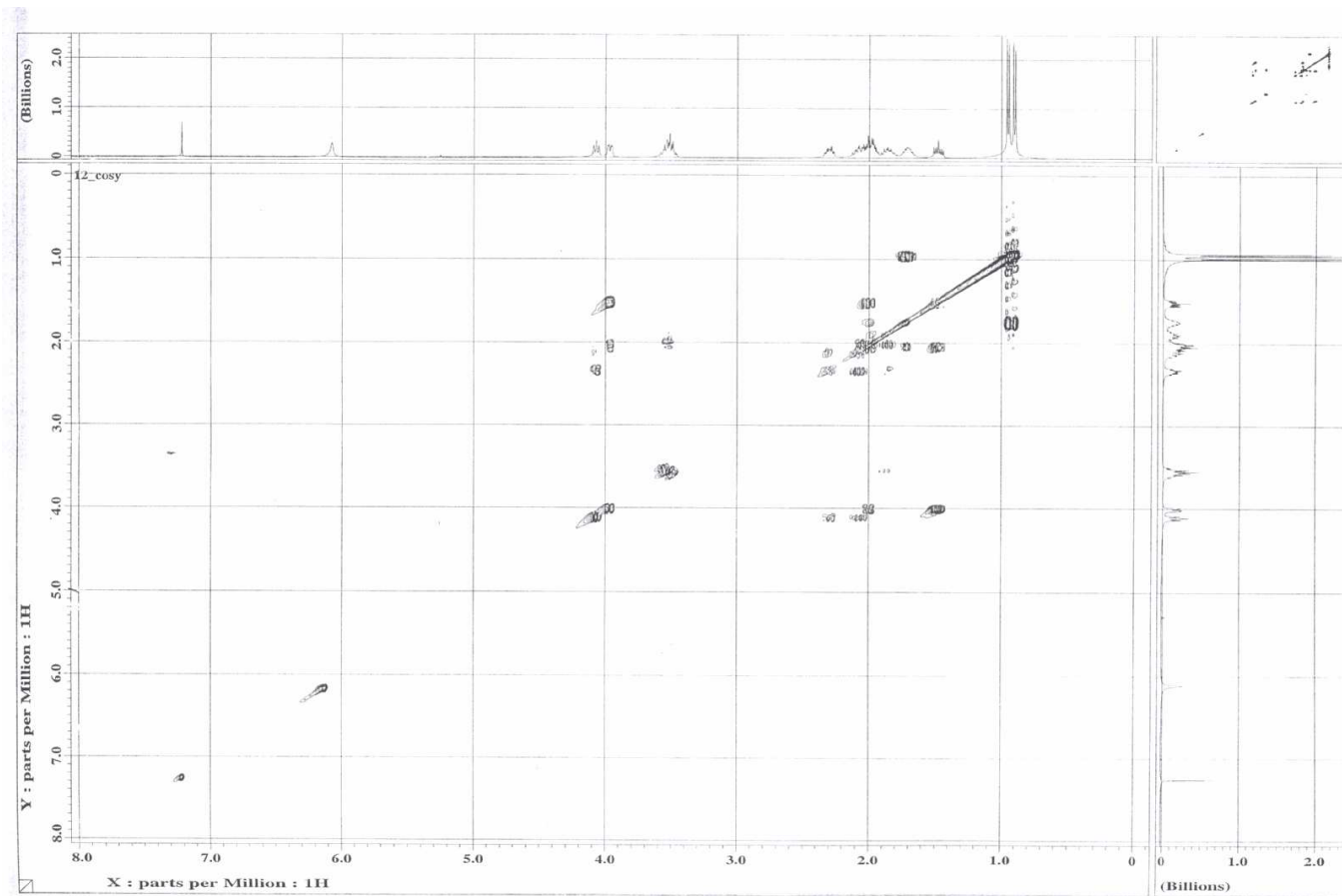


^{13}C -NMR spectrum of compound 2

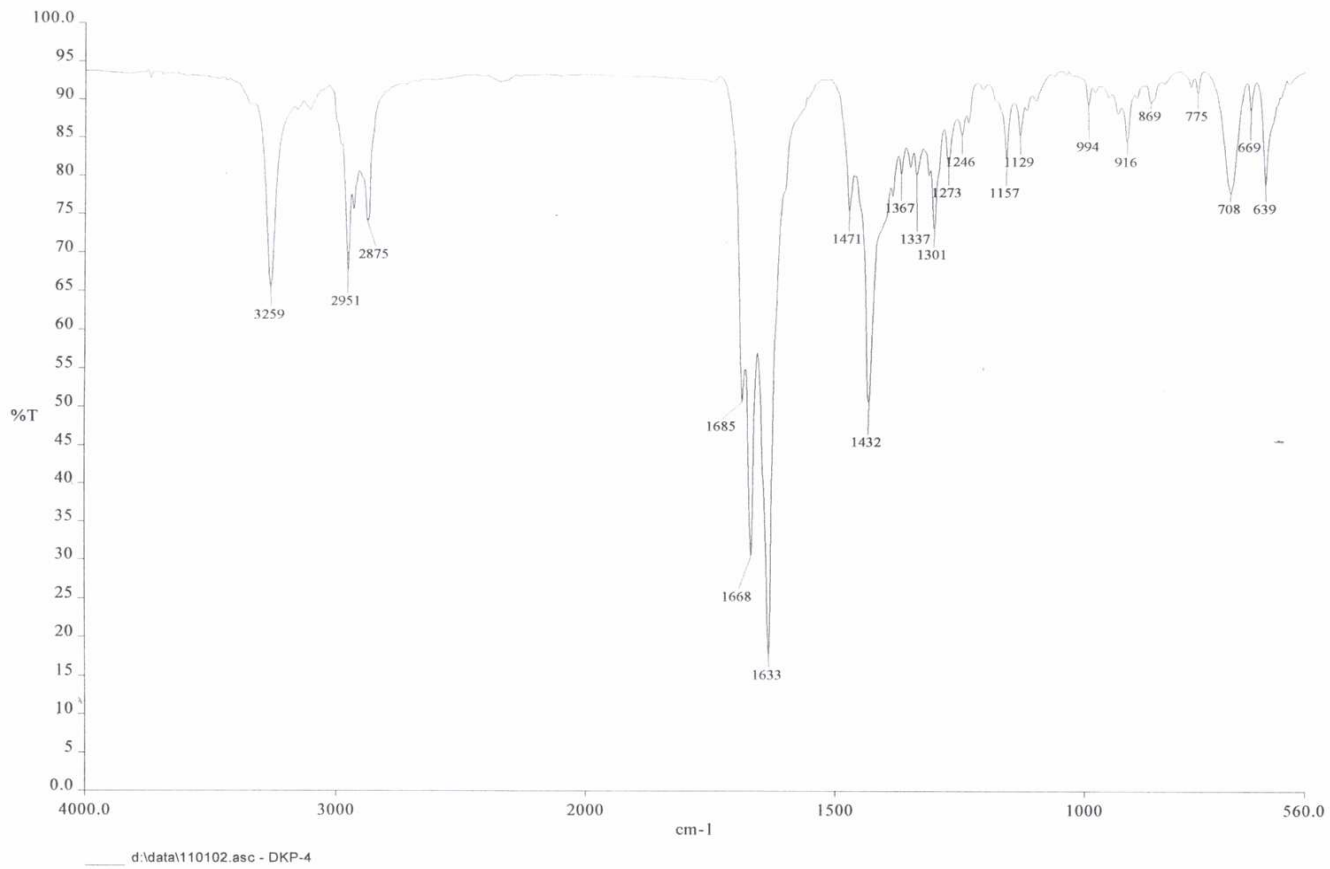
Pulse Sequence: DEPT



DEPT spectrum of compound 2

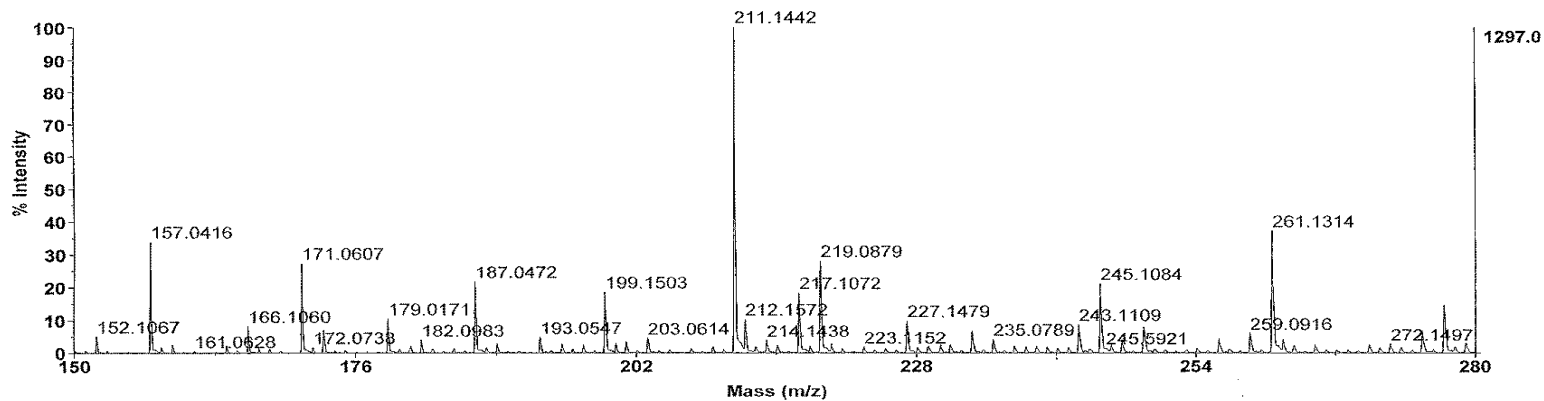


^1H - ^1H COSY spectrum of compound 2

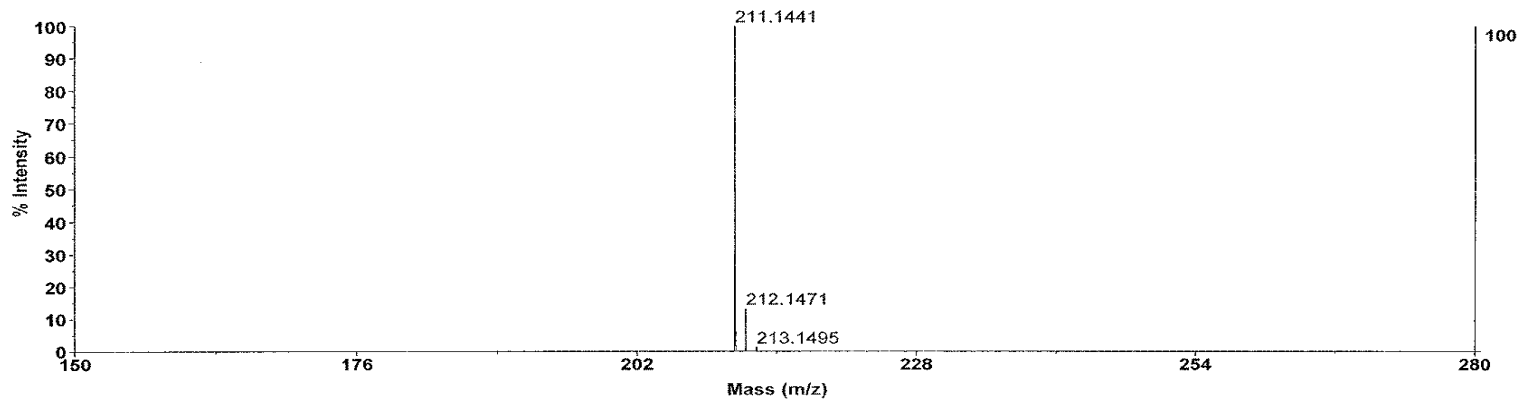


IR spectrum of compound 2

Mariner Spec /73:75 (T /5.17:5.31) ASC=>SM3=>MC[BP = 211.1, 1297]



ISO:C11H18N2O2H



Mariner Mass Spectrum
\\...061013_...001.dat
Acquired:

Mass spectrum of compound 2