



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

*Myxococcus* sp.YH667이 생산하는  
항균물질의 분리 및 구조 동정

Isolation and Identification of Antimicrobial Compound  
from, *Myxococcus* sp. YH667



지도교수 안 종 응

2009년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

정 해 슬

이학석사 학위논문

*Myxococcus* sp.YH667이 생산하는  
항균물질의 분리 및 구조 동정

Isolation and Identification of Antimicrobial Compound  
from, *Myxococcus* sp. YH667



지도교수 안 종 응

2009년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

정 해 슬

本 論 文 을 정해슬의 理學碩士 學位論文으로 認准함

위원장 이학박사 최 중 권 인

위 원 이학박사 이 희 승 인

위 원 농학박사 안 종 응 인

2008년 11월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

# 목 차

	Page
List of tables -----	v
List of figures -----	vi
Abbreviations -----	vii
List of symbols -----	viii
Abstract -----	1
I. 서론 -----	3
II. 실험재료 및 방법 -----	6
1. 시약 및 기기 -----	6
1. 1 시약 및 충전제 -----	6
1. 2 기기 -----	6
2. 용매 -----	7
3. 점액세균의 분리 -----	7
3. 1 공시토양 -----	8
3. 2 점액세균의 분리법 -----	8



3. 3 떡이균의 종류	-----	9
3. 4 선정된 떡이균의 배양	-----	11
3. 5 점액세균 배지	-----	12
3. 6 균주 분리	-----	15
4. 항생물질 생산균주의 스크리닝	-----	17
4. 1 점액세균의 스크리닝 배양	-----	17
4. 2 배지	-----	17
4. 3 생장억제활성의 측정	-----	18
5. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 정제	-----	19
5. 1 배양	-----	19
5. 2 대사산물의 추출 및 분리 정제	-----	21
6. 활성물질의 구조결정	-----	25
6. 1 TLC 등색시약	-----	25
6. 2 분광학 기기	-----	27
7. 활성물질의 생물학적 활성	-----	28

III. 결과 및 고찰	29
1. 용균성 점액세균의 분리	29
1. 1 공시토양	29
1. 2 떡이균 선정	29
1. 3 점액세균의 분리	30
2. 대사산물의 스크리닝	38
3. 균주 YH667의 동정	40
4. 균주 YH667의 대량 배양	43
5. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 분리 정제	43
5. 1 추출 및 분획	43
5. 2 분리 정제	44
6. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 구조 결정	48
7. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 항균활성	59
IV. 결론	60
V. 참고문헌	62

## 감사의 글





## List of tables

	Page
Table 1. Composition of medium used in this experiment	14
Table 2. Myxobacteria classification by Congo red staining	30
Table 3. Myxobacterial strains isolated from soil samples	31
Table 4. Screening of myxobacteria for antimicrobial activity -----	36
Table 5. Physico-chemical properties of compound 1 ----	48
Table 6. NMR data and COSY correlations of compound 1 -----	55
Table 7. Comparison of the <sup>13</sup> C NMR chemical shift of 1 and myxovirescin C <sub>1</sub> -----	57
Table 8. Antimicrobial activity of myxovirescinC <sub>1</sub> (1) -----	59

## List of figures

	Page
Fig. 1 Life cycle of myxobacteria -----	2
Fig. 2 Work-up procedure of strain YH667-----	23
Fig. 3 Morphological classification of myxobacteria ---	32
Fig. 4 Myxobacterial fruiting bodies -----	33
Fig. 5 Morphological characteristics of strain YH667 --	41
Fig. 6 Cell type of myxobacteria -----	42
Fig. 7 Isolation of compound 1 from strain YH667 -----	46
Fig. 8 HPLC profile of active fraction -----	47
Fig. 9 UV spectrum of compound 1 -----	47
Fig. 10 $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 1 -----	50
Fig. 11 HMQC spectrum of compound 1 (I) -----	51
Fig. 12 HMQC spectrum of compound 1 (II) -----	51
Fig. 13 HMQC spectrum of compound 1 (III) -----	52
Fig. 14 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY spectrum of compound 1 -----	53
Fig. 15 Partial structure A of compound 1 -----	54
Fig. 16 Partial structure B of compound 1 -----	54
Fig. 17 Structure of compound 1(myxovirescin C <sub>1</sub> ) -----	58

## List of abbreviations

c.c	:column chromatography
calcd.	:calculated
CDCl <sub>3</sub>	:deuterated chloroform
<sup>13</sup> C NMR	:carbon-13 nuclear magnetic resonance
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	:methylene chloride
COSY	:homonuclear correlation spectroscopy
DMSO	:dimethylsulfoxide
EtOAc	:ethyl acetate
MeOH	:methyl alcohol
<sup>1</sup> H NMR	:proton nuclear magnetic resonance
HMQC	:heteronuclear multiple-quantum connectivity
HPLC	:high performance liquid chromatography
FAB	:fast atom bombardment
Hz	:hertz
IR	:infrared
aq.	:aqueous
$\nu_{\max}$	:maximum frequency
UV	:ultraviolet
TLC	:thin layer chromatography
MS	:mass spectroscopy

## List of symbols

$M^+$	Molecular ion
$m/z$	Mass to charge
$R_f$	Retention factor
$\delta$	Chemical shift
$\text{cm}^{-1}$	Wave number
G	Gravity force
rpm	round per minute



Isolation and Identification of  
An Antimicrobial Compound from,  
*Myxococcus* sp. YH667

Hae-Seul Jeong

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



Myxobacteria are unique gram-negative bacteria characterized by the gliding and fruiting body forming nature. Myxobacteria especially attract many researchers, since they have many possibilities of producing undiscovered bioactive substances. Recently new antibiotics such as myxin<sup>17)</sup>, inhibitory lipid-factors<sup>1)</sup>, anbruticin<sup>20)</sup>, G1499-2<sup>11)</sup>, myxocidins<sup>2,12)</sup>, myxothiazol<sup>12)</sup>, pyrrolnitrin<sup>15)</sup>, antibiotic TA<sup>2)</sup>, myxovirescins<sup>8,22)</sup>, myxovalargins<sup>3)</sup>, corallopyronins<sup>4)</sup> were reported to be produced by these organisms.

Isolation and purification of myxobacteria from nature, however, are very difficult due to their complicated life cycle.<sup>19)</sup>

In our search for the bioactive metabolites from myxobacteria, strain

YH667, belonging to the genus *Myxococcus*, was found to produce antimicrobial compound. The producing strain, *Myxococcus* sp. YH667, was isolated from a soil sample collected at Je-ju island in Korea. The organic extracts from the culture broth and cell mass were prepared by solvent partitioning. Guided by the results of antimicrobial test and <sup>1</sup>H-NMR analysis, the moderately polar fractions were separated by silica, ODS, and sephadex LH-20 column chromatography followed by ODS HPLC to yield compound 1 as a colorless oil. The structure of compound 1 was determined as myxovirescin C<sub>1</sub> using combined spectroscopic methods and by comparison with reference data. Compound 1(Myxovirescin C<sub>1</sub>) possessed high activity against *Escherichia coli*, and weak activity against *Staphylococcus aureus*.



---

Keywords: Myxobacteria, *Myxococcus* sp., Myxovirescin C<sub>1</sub>, Antimicrobial.

## I. 서론

하나의 새로운 화합물을 얻기 위해서는 유전자 재조합이나 유기 합성, 자연에서의 물질 탐색을 통해 다른 화합물을 기초가 되는 독창적인 선도 물질을 바탕으로 하여 얻을 수 있다. 그 중 가장 널리 쓰이는 방법은 자연에서의 물질 탐색이다. 자연에서의 물질 탐색은 주로 동물이나 식물, 미생물에서 얻은 2차대사 산물이 주요한 재료였다. 그 중에서 미생물은 화합물의 생산이 시간, 장소, 기후 등에 독립적으로 배양할 수 있기 때문에 2차대사 산물의 귀중한 생산자이다. 그러한 이유로 미생물과 그의 2차대사 산물에 관한 연구가 최근 주목받고 있다. 미생물의 2차대사 산물의 연구는 많은 종류의 미생물을 대상으로 이루어져 왔으나 주로 Actinomycetaes, *Bacillus* sp., Pseudomonads가 많이 연구 되었다. 이러한 이유로 새로운 미생물 그룹을 찾기 위해 노력한 결과 2 종류의 새로운 미생물 그룹을 얻었는데 그것이 바로 cyanobacteria와 점액세균이다.<sup>10)</sup>

점액세균은 gram 음성세균으로 막대기 모양의 간균이다. 또한 점액세균은 절대호기성균이며 다른 균에 비해 성장속도가 느리고 주로 토양에 서식하며 초식동물의 분변 및 식물의 고사부위나 껍질 등에서 발견된다. 최적생육온도는 30℃이지만 사막, 남극해, 고산지대, 고염지대 및 바다에서도 발견되는 등 다양한 서식범위를 나타내고 있다. Proteobacteria  $\delta$  group에 속하며 현재 12속 41종이 알려져 있다.<sup>14)</sup> 점액세균의 특징은 자실체를 형성하며 군집 생활을 하고 활주운동을 하며 독특한 생활사를 가진다.<sup>14)</sup> (Fig. 1) 점액세균은 용균성 점액세균과 세루로즈 용해성 점액세균 2가지 종류가 있는데 그 중 용균성 점액세균은 11속 40여종의 다양한 형태를 지니고 있다.

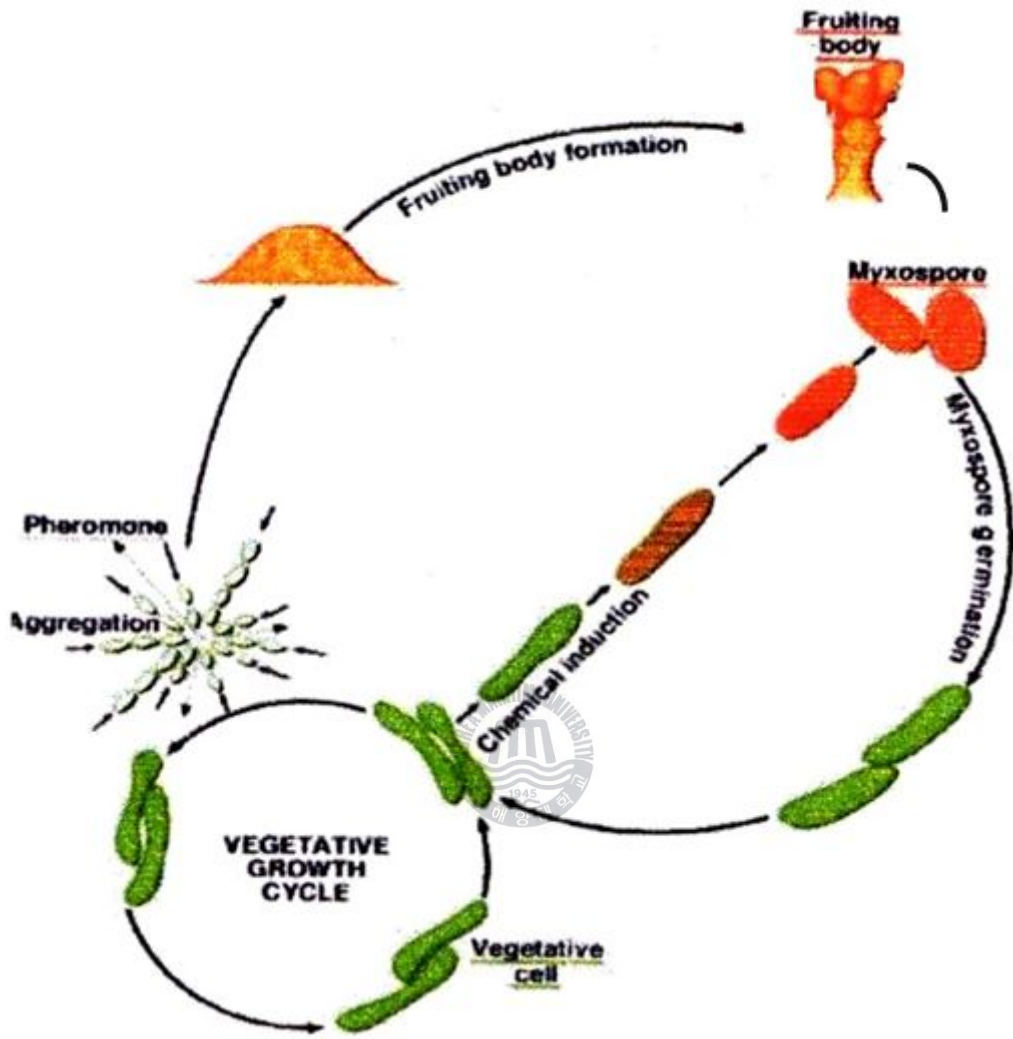


Fig. 1 Life cycle of myxobacteria



점액세균에서 유래된 생리활성물질은 기존에 알려진 50개의 기본 구조 중에서 47개의 구조가 점액세균에서 발견되었고 기존에 연구된 미생물의 경우 한 종의 미생물에서 하나의 항생물질이 생산되는 경우가 많았으나 점액세균의 경우 한 종의 점액세균에서 다양한 항생물질을 생산해낸다. 그 중 용균성 점액세균의 경우 55% 이상이 생리활성물질을 분비하는 것으로 보고되고 있다.<sup>6-8,16)</sup> 용균성 점액세균이 생산하는 항생물질은 gram negative bacteria에 대해 활성이 있는 G1499-2<sup>6)</sup>와 다양한 bacteria의 decapeptide을 억제하는<sup>2,12)</sup> Myxocidin, gram 양성과 gram 음성 bacteria 모두에 대해 저해 작용을 가진 Antibiotics TA<sup>2)</sup>, Electron transport 저해제인 myxothiazol<sup>12)</sup> 등이 있다.

다양한 특징을 가진 점액세균은 그들의 복잡한 생활사로 인해 분리 및 배양이 매우 어려워<sup>19)</sup> 통상적인 분리법으로 분리되기 어렵다는 문제점이 있다. 이러한 점액세균을 국내토양을 대상으로 하여 분리법을 확립하였고 용균성 점액세균을 분리에 성공하였다. 분리한 점액세균을 대상으로 스크리닝 배양을 실시하여 2차대사 산물을 얻었고, 이들에 대해 항균활성 실험을 실시하였다. 분리한 점액세균의 2차대사 산물 중 일부가 항균활성 실험 군에 대해 저해 활성을 보였다. 그 중에 *E. coli*에 대한 저해 활성이 강한 점액세균의 2차대사 산물의 수가 다른 실험 군에 저해 활성을 보인 2차대사 산물 수에 비해 적어 *E. coli* 저해 활성이 높은 균주를 찾던 중 가장 높은 활성을 보인 YH667을 주목하게 되었다. 그리 하여 YH667이 생산해내는 2차대사 산물 중 *E. coli*에 활성을 보인 화합물을 찾는 것에 초점을 맞추어 YH667의 균 동정과 배양, 추출 및 분리 정제, 구조결정에 이르는 과정을 수행하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

#### 1. 1 시약 및 충전제

배지를 제조하기 위해 사용되는 시약들은 EP급으로 DIFCO사의 Beef Extract, Casitone, Malt Extract, Raffinose, Soluble Starch, Yeast Extract와 JUNSEI 사의 Agar,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Sucrose, SIGMA 사의 Congo-red, ALDRICH 사의 D-Galactose, YAKURI 사의 Dextrose를 구입해 사용하였다. 또한 Baker's Yeast는 BRUGGEMAN 사에서 구입하였고 cyano cobalamine는 SIGMA사의 것을 사용하였다. Cycloheximide는 ACROS사에서 항균활성테스트 시 대조약물로 사용되는 Nystatin은 SIGMA사의 것을 사용하였다. Ciprofloxacin는 한국화학연구원으로부터 분양받아 사용하였다.

Silica gel 60( $40\mu\text{m}$ - $60\mu\text{m}$ )과 Lichroperp. RP-18( $40\mu\text{m}$ - $60\mu\text{m}$ ) 및 silica TLC plate, RP-18 TLC plate은 MERCK 사의 것을 이용하였다. Sephadex LH-20는 Fluka에서 구입하였으며 XAD-16은 Rohm & Haas의 것을 사용하였다.

#### 1. 2 기기

##### 1. 2. 1 배양기기

배지 제조에 Autoclave SJ-220A45 (SEJONG), Clean bench SHIMADZU BL220H(SHIMADZU), pH meter BUCHI R-200 (BUCHI), Electronic balance Orion 420A(Orion), Voltex (Barnsted/Thermolyne)를 사용하였으며 B.O.D incubator SJ-250B(SEJONG), Shaking incubator (Mono-TECH ENG CO MSB-1511D), Shaking waterbath (circulator, Mono-TECH ENG CO MSB-1511D)등을 이용하여 배양하였다. 또한 균체의 분리에는 High speed refrigerator centrifuge(Supra22K, Hanil)를 사용하였다.

## 1. 2. 2 분리·정제 기기

물질의 분리 정제에 Fraction collector (PHarmacia Biotech), UV detector(254nm, 2238UVICORD SⅡ, LKB BROMMA), Recoder(Pharmacia Biotech)를 사용하였으며, photo diode array detector가 장착된 SHIMADZU(LC-6AD)사의 HPLC를 사용하였다.

## 2. 용매

실험에 쓰이는 모든 시약급 용매는 재증류하여 사용하였다.

## 3. 점액세균의 분리

### 3. 1 공시토양

본 대학 주변 및 금정산, 충청북도 옥천, 김천, 대전, 경기도 안산 및 용인, 강원도 속초, 제주도의 토양을 채집하여 점액세균을 분리하기 위한 시료로 하였다. 이때 시료 채집 방법은 지표면의 흙을 걷어낸 후 5cm 정도의 깊이까지의 흙을 일정한 간격으로 이동하면서 채취하였다.

채취한 시료를 바로 사용하지 않을 경우, 곰팡이의 증식을 억제하기 위하여 그늘지고 서늘한 곳에서 충분히 건조시켜 보관하였다.

### 3. 2 점액세균의 분리법

분액세균을 분리하기 위한 방법으로는 토양 또는 부식토를 modified SP agar 배지에 바르고 자실체 형성을 관찰하는 Agar medium method와 WCX agar 배지에 먹이 균을 희석하여 circular patch를 만든 후 patch 가장자리에 토양이나 부식토를 올려 자실체를 관찰하는 Baiting method, 거름종이 조각을 Stanier's agar 배지에 올린 후 그 위에 토양과 부식토를 올려 자실체를 관찰하는 Filter paper method, petridish에 깊이 10-15mm 정도에 토양을 깔고 멸균 증류수를 뿌려 적신 뒤 스팀 멸균한 즉시 actidone 용액에 담근 토끼 똥을 토양 위에 올린 뒤 일주일 이 지난 후에 점액세균의 자실체를 관찰하는 Rabbit dung method<sup>10)</sup>가 있다.

용균성 점액세균을 분리하기 위해서 위에 언급한 방법 중 Baiting method를 선택하였다. Baiting method의 경우 먹이균 선정을 위한 실험이 필요하다는 단점이 있으나 배지의 제조가 용이하고 실험 방법이 단순하며 자실체 형성 유무를 관찰하는 관찰 기간이 짧다는 장점이 있다는 점에서 선택되었다.

### 3. 3 먹이균의 종류

#### 3. 3. 1 먹이균 선정대상

Baiting method에 사용되는 먹이균을 선정하기 위한 실험을 실시하였다. 용균성 점액세균은 타 세균을 먹이로 사용하기 때문에 먹이균을 선정이 중요한데 Gram(+)인 *S. aureus*와 Gram(-)인 *E. coli*, 효모균 중 포자형성균인 *S. cerevisiae*, 무포자형성균인 *R. rubra*을 대상으로 실시하였다. 먹이균 선정 기준은 대상 실험균을 희석하여 circular patch를 만든 후 토양 시료를 올려 정치 배양하고 동일한 관찰 기간을 준 후 용균성 점액세균의 종에 관계없이 점액세균의 출현 수가 많은 실험균을 먹이균으로 선정하였다.



#### 3. 3. 2 먹이균 선정을 위한 실험 방법

##### 1) 배지

##### ① NA (Nutrient agar) medium

Nutrient agar 배지는 증류수 1L 기준에 Tryptone(1%), Yeast extract(0.5%), NaCl(1%), Glucose (0.1%)를 넣고 2% NaOH를 이용하여 pH를 조절한 후 autoclave한 후 petridish에 분주하였다. 배지를 분주한 petridish을 건조 시킨 후에 사용하였다.

##### ② NB (Nutrient broth) medium

NB배지는 ①의 배지에서 agar를 첨가하지 않은 배지로 ①의 배지와 동일한 조건에서 제조 및 멸균 처리하여 사용하였다.

### ③ *Micrococcus* medium

*Micrococcus* medium은 증류수 1L 기준에 Peptone(0.5%), Yeast extract(0.3%), Beef extract(0.15%), Glucose(0.1%)를 넣고 2% NaOH를 사용하여 pH7.2에 맞췄다. autoclave 한 후 petri dish에 분주하여 건조 시킨 후에 사용하였다.

### ④ YM medium

YM배지는 증류수 1L 기준에 Yeast extract(0.3%), Malt extract(0.3%), Peptone(0.5%), Glucose(1%)를 넣고 2% NaOH를 사용하여 pH7.2에 맞췄다. autoclave한 후 petri dish에 분주하고 건조시킨 후에 사용하였다.

## 2) 먹이균의 배양

냉장보관 되어있던 *E. coli*는 Nutrient agar배지에 *S. aureus*는 *Micrococcus* agar 배지에 *S. cerevisiae*, *R. rubra*는 YM배지에 각각 streak culture하여 30℃의 incubator에서 24시간 활성화 시킨 다음, 멸균한 Nutrient broth배지, *Micrococcus* broth 배지, YM broth배지 1ℓ에 해당 균을 한 백금이 씩 접종하고, 30℃, 160 rpm shaking incubator에서 36시간 배양 후 수확하였다.

### 3) 수확

36시간 배양 후에 원심분리기를 이용하여 4℃, 10,000g, 20분 동안 원심분리 하였다. 상등액은 버리고 균체를 하나의 통에 모은 다음 0.2% NaCl로 세척한 후 다시 원심분리 하였고, 위의 과정을 두 번 더 반복한 뒤 상등액을 버리고, 물기를 제거하여 균체만을 냉장보관 하였다.

### 4) 실험 방법

다른 균의 성장을 억제하는 Cycloheximide를 첨가한 WCX agar 배지 위에 희석한 각 실험균을 직경 12-15mm의 circular patch를 만들어 올린 후 patch 가장 자리에 토양시료를 올려 30℃, incubator에 정지 배양하였다. 24시간 후 자실체를 관찰하였다.

### 3. 4 선정된 먹이균의 배양



선정된 먹이균 *E. coli*는 냉장 보관되어있는 균을 streak하여, 30℃, 24시간 동안 incubator 에서 정지 배양하여 활성화 시켰다. 'L'자 tube에 NB 배지를 10ml 넣어 멸균한 후, 활성화 시켜둔 *E. coli*를 NB배지에 접종하여 shaking waterbath에서 30℃, 120rpm으로 16시간(overnight)동안 진탕 배양하였다. 1L의 NB 배지가 든 2L Erlenmeyer flask을 고온 멸균한 후 진탕 배양한 균 10ml(0.1% seed culture)을 무균적으로 접종하였다. 30℃, 160rpm, 16시간 동안 shaking incubator에서 배양 후 수확하였다.

수확은 원심분리 (4℃, 10000G, 20min)를 통하여 상등액과 균체를 분리하였다. 균체를 모은 다음 0.2% NaCl로 세척한 후 물기를 제거한 후 냉장 보관하였다.

### 3. 5 점액세균 배지

#### 3. 5. 1 WCX agar medium

용균성 점액세균의 분리 및 순화에 쓰이는 WCX agar 배지는 증류수 1L 기준에  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 0.1% 넣고 0.2%NaOH을 사용해 pH7.2로 맞춘 후 autoclave하였다. 멸균된 배지를 분주하는데 이때 용균성 점액세균 이외의 곰팡이의 번식을 억제하기 위해서 Cycloheximide(5ml/L)을 syringe filter하여 첨가한다. 완성된 배지를 분주하고 충분히 건조시킨 후에 사용한다.

#### 3. 5. 2 Vy/2 agar medium

용균성 점액세균의 순화와 계대에 사용하였으며, 증류수 1L에  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 0.1%넣은 후 0.2%NaOH로 pH7.2에 맞추었다. Baker's yeast 0.5%은 100℃, 5분간 처리한 후 첨가하여 autoclave하였다. 멸균된 배지를 식힌 뒤 Cyanocobalamin 5mg/L를 syringe filter하여 첨가하였고, petri dish에 분주하여 실온에서 1시간 건조시킨 후에 사용하였다.

#### 3. 5. 3 CAS medium

순화된 균주의 보관에 사용하였으며, 증류수 0.1L 기준으로 Casitone 1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, DMSO 5%를 첨가한 배지를 Nunc tube에 1ml씩 분주한 후 멸균하여 사용하였다.



Table 1. Composition of medium used in this experiment

Nutrient agar	Tryptone 1% Yeast extract 0.5% NaCl 1% Glucose 0.1 Agar 1.5% pH 7.2
WCX agar	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.1% Cycloheximide 5mg/ ℓ Agar 1.5% pH7.2
CAS liquid	Casitone 1% MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.1% DMSO 5%
Vy/2 agar	Baker's yeast 0.5% CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.1% Cyanocobalamin 0.5mg/ ℓ Agar 1.5% pH 7.2
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
MD1 liquid	Casitone 0.3% MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.2% Cyanocobalamin 0.5mg/ ℓ pH7.2

### 3. 6 균주분리

#### 3. 6. 1 토양시료 처리

적당히 희석한 먹이균(*E. coli*) 용액을 무균 상태에서 WCX agar 배지 상에 100 $\mu$ l씩 올려 4개의 patch(직경 12-15mm)을 만든 후 건조시켰다.

이렇게 만든 patch의 가장자리에 직경 5mm의 크기로 시료 토양을 묻쳐 한 점씩 올려놓은 후 B. O. D incubator (30 $^{\circ}$ C)에서 정치 배양하였다. 배양 후 쌍안실체현미경으로 균의 출현과 성장 유무를 관찰하였다.

#### 3. 6. 2 용균성 점액세균의 순화

토양 시료로부터 용균성 점액세균의 자실체가 관찰되면, 자실체를 떼어내어 WCX agar 배지상의 patch(*E. coli*)의 가장자리에 옮겨 30 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

위 과정을 여러 차례 반복한 후, 최종적으로 멸균 처리한 *E. coli* 로 만든 patch에 균주를 옮겨 위와 동일한 방법으로 배양, 순화하였다.

최종적으로 Vy/2 배지 plate로 옮겨 B.O.D incubator(30 $^{\circ}$ C)에서 계대 배양하였다.

#### 3. 6. 3 분리균주의 보관

제조된 CAS medium가 들어있는 Nunc tube에 순화과정을 마친 균주를 1 loop씩 넣고 액체질소에 보관하였다.

### 3. 6. 4 그람 염색(Gram stain)

증류수를 1~2방울 떨어뜨린 슬라이드 글라스에 미리 활성화 시켜둔 균체를 골고루 분산시켜, 건조가 지나쳐 태우거나 충분하지 않아 고정이 안 되는 경우가 없도록 주의하며 화염고정 시켰다. crystal violet과 phenol 이 섞인 염색체 용매를 1~2방울 떨어 뜨려 세균을 1분간 염색하였다. PVP-IOD+KI인 매염제 용액을 1~2방울 떨어뜨려 1분간 반응시킨후, 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.

### 3. 6. 5 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.

## 4. 항생물질 생산균주의 스크리닝

### 4. 1 점액세균의 스크리닝 배양

대량 배양에 사용할 균 선정을 위해 순화를 마친 균을 대상으로 스크리닝 배양을 실시하였다. 스크리닝 배양을 통하여 균체의 색과 배양상의 특징 및 성장 속도 등을 관찰하여 성장 속도가 빠르거나 균체량이 많거나 배양상 특징을 지니거나 2차 대사산물에 대하여 항균활성 실험을 실시하였을 때 뚜렷한 활성을 가진 균주를 선별하였다. 스크리닝 배양은 2L Erlenmeyer flask 2개에 각각 0.4L씩 총 0.8L의 standard MD1 liquid 배지를 넣고 개체 성장으로 인한 성장 억제를 방지하기 위하여 XAD-16 6g을 첨가하여 autoclave한 후 접종하였고 shaking incubator에서 30℃, 160rpm, 5일간 배양했다. 스크리닝 배양을 통하여 얻은 균체와 XAD-16을 수확하였고 추출한 후 분획하여 TLC pattern을 관찰과 항균활성 실험을 실시하였다.

### 4. 2 배지

용균성 점액세균의 배양에 쓰이는 액체배지인 standard MD1 liquid 배지는 증류수 1L 기준에 Casitone 0.3%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.07%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%을 넣고 2% NaOH를 사용하여 pH7.2에 맞춘 후 autoclave하였다. 멸균한 배지에 Cyanocobalamin (0.5ml/L)을 syringe filter하여 첨가한 다음 사용하였다.

### 4. 3 생장억제활성의 측정

#### 4. 3. 1 공시균

항균 활성 측정에 사용된 균주는 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였으며 분양받은 균주는 다음과 같다.

---

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

---

#### 4. 3. 2 항균활성

##### 1) 검정균의 순화



한국생명공학연구원 유전자은행에서 *S. aureus*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *R. reubra*, *C. albicans*를 구입 또는 분양받았다. 동결 건조된 상태로 분양받은 각 균의 앰플을 clean bench안에서 줄칼로 중간부분에 금을 긋고 앰플 외부를 70%알코올을 적신 거즈로 잘 닦아낸 다음 알코올램프로 가볍게 화염 살균한 후 부러뜨렸다. 여기에 세균 현탁액을 Nutrient Agar나 MM, YM Agar 배지에 300 $\mu$ l씩 도말하여 1일간 30 $^{\circ}$ C에서 배양하여 활성화시켰다. 활성화된 세균 일부를 streak culture하여 단일 colony를 떼어 Nutrient Agar, YM Agar 배지에 옮겨 배양한 후 사면 배지로 옮겨 냉장 보관하였다.

##### 2) 시료 처리

각종 점액세균의 대사산물의 MeOH추출액을 MeOH와 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>에 녹여 50,000ppm(시료1mg/20 $\mu$ l용매)으로 조제하여 처리하였다. 시료 추출액을 6mm paper disk에 주사하여 clean bench에서 건조시킨 후 항균활성 실험군이 도말된 plate위에 올려 실험군의 생장 저해도를 측정하였다.

### 3) 항균활성측정

활성 시킨 세균 및 효모의 콜로니를 멸균 증류수에 희석하였다. 희석된 균액 100 $\mu$ l를 Nutrient agar, YM agar MM agar 배지에 각각 loading한 후, 화염 멸균한 도말봉으로 도말하였다. 6mm paper disc에 희석한 물질 20 $\mu$ l(50000ppm)을 loading한 후, clean bench에서 20분간 건조시켜 배지 위에 paper disc간의 간격이 3.0cm정도 되도록 올려 주었다. 이때 control은 MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1 : 1을 사용하였으며, 대조 물질로는 Ciprofloxacin 10ppm과 Nystatine 100ppm을 사용하였다. 그리고 incubator (30 $^{\circ}$ C)에서 48시간 배양 후 vernier caliper로 inhibition zone의 크기를 측정하였다.

## 5. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 정제

### 5. 1 배양

#### 5. 1. 1 고체 배양

WCX agar 배지의 circular patch에서 순화된 용균성 점액세균을 Vy/2 agar 배지의 한가운데 무균적으로 loading한 후 균체를 증식시키면

서 swarm의 색과 자실체의 형태 등 그 특징을 관찰 하였다. 일정한 양으로 자란 균은 균체량을 확보하기 위해서 새로운 Vy/2 agar 배지에 선 도말 하였으며, B. O. D incubator(30℃)에서 배양하였다. 이 중 타 균으로부터 오염이 없고 성장속도가 우수한 균주를 선발하여 액체 질소에 보관 하였다.

### 5. 1. 2 대량 배양

대량 배양은 스크리닝 배양을 통해 선발된 균주를 대상으로 실시하는데 1, 2차 종배양 및 14L 대량배양으로 구성되어 있다. Strain YH667의 대량 배양은 다음과 같다.

#### 1) 종배양

1차 종배양은 300ml Erlenmeyer flask 20개에 각각 standard MD1 liquid 배지 50ml을 넣고 121℃, 1기압, 15분간 고온 멸균한 후 Cyanocobalamin 25 $\mu$ l를 flask에 각각 첨가하였다. 미리 Vy/2 agar 배지에서 배양한 종균을 2 loop접종한 후 shaking incubator에서 30℃, 160rpm, 2일간 배양하였고 1차 종배양한 균체 2ml을 상기 언급한 방법대로 제조한 standard MD1 liquid 배지에 접종하여 1차 종배양과 동일한 조건으로 배양하였다.

#### 2) 대량배양

대량배양은 종배양에 사용한 standard MD1 liquid 배지에 자가 독성 방지와 2차대사산물의 획득을 용이하게 하기 위해 흡착 합성수지인

XAD-16을 6g첨가하여 사용하였으며, 2L Erlenmeyer flask에 standard MD1 liquid 배지 400ml씩 14L을 준비하였다. 멸균방법은 종배양과 동일한 조건으로 진행하였고 멸균 후 Cyanocobalamin  $200\mu\text{l}$ 을 첨가하고 종배양한 균체를 8ml접종하여 shaking incubator에서  $30^{\circ}\text{C}$ , 160rpm, 5일 간 배양하였다.

### 5. 1. 3 수확

5일간 배양한 배양액의 pH를 측정한 후 100mesh 채에 걸러 XAD-16과 균체를 배양액과 분리시켰다. 배양액은 원심분리 ( $10000\text{G}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20분)하여 상등액은 버리고 배양액에 남아 있는 균체를 모았으며, sieving을 통하여 모은 균체, XAD-16와 함께 추출 하였다.

## 5. 2 대사산물의 추출 및 분리정제



### 5. 2. 1 추출 및 분획

#### 1) 추출

Sieving과 원심분리로 얻어진 균체와 XAD-16을 Acetone과 MeOH을 1 : 1로 섞은 용매를 이용하여 실온에서 12시간 동안 1차 추출한 다음 다시 Acetone으로 3시간동안 2차 추출하였으며 동일한 방법으로 여러 차례 반복한 후 rotary evaporator로 농축하여 crude extract를 획득하였다.



## 2) 분획

획득한 crude extract를 H<sub>2</sub>O와 EtOAc층으로 분획하였다. EtOAc층은 anhydrous Na<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>로 건조시켰다. 건조된 EtOAc층을 rotary evaporator로 농축한 후 MeOH와 n-Heptane으로 분획하여 무극성의 세포 성분을 제거하였다. 이 중 MeOH 층을 분석시료로 사용하였다. (Fig. 2)



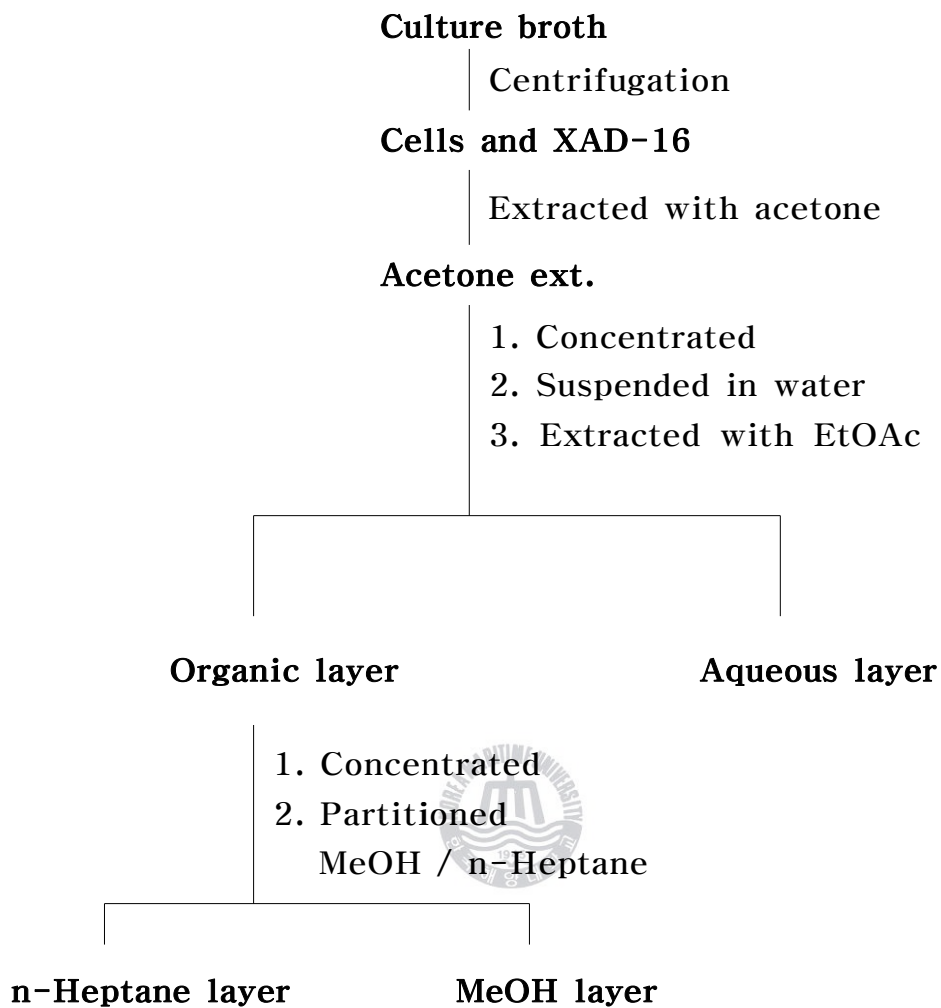


Fig. 2 Work-up procedure of strain YH667.

## 5. 2. 2 Column chromatography에 의한 분리정제

### 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 관찰한 다음 발색 시약을 처리하여 화합물의 분리 형태를 관찰하였다. 사용된 발색시약의 종류와 조제법은 아래와 같다.

### (2) Column chromatography

실험에 사용된 칼럼은 Silica gel (Silica gel 60, 40-63 $\mu$ m, MERCK)을 충전제로 사용하였으며 용매는 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, Acetone, MeOH등을 이용하였다. 역상크로마토그래피로는 LiChroprep RP-18 (40-63 $\mu$ m, MERCK)를 사용하였으며 MeOH, H<sub>2</sub>O을 용매로 사용하였다. 이외에 Sephadex LH-20 (bead size 25~100 $\mu$ m, Fluka) column chromatography를 사용하였고 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.

## 5. 2. 3 HPLC에 의한 정제

### 1) Analytical HPLC

Analytical HPLC는 혼합물의 분리 조건을 정하거나 분리한 화합물의 순수도의 평가 및 기존 화합물과 동일 여부를 확인하기 위해 사용되었다. 본 실험에서는 Diode array detector HPLC를 사용하였으며, 분석 용 칼럼은 CAPCELL PAK C18(UG120,  $5\mu\text{m}$ ; 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)를 사용하였다.

## 2) Semi-preparative HPLC

분취 칼럼은 CAPCELL PAK C18(UG120 Å,  $5\mu\text{m}$ ; 10mm I.D.x250 mm, 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.



## 6. 활성물질의 구조결정

### 6. 1 TLC 등색시약

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

#### 6. 1. 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 성분을 확인 하였다.

#### 6. 1. 2 Dragendorff reagents (DRG)

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

#### 6. 1. 3 Ninhydrin reagent (NIH)

0.3g의 ninhydrin을 10ml의 *n*-butanol에 녹인 다음 3ml의 98% 빙초산을 가한 용액을 분무하여, 110°C에서 5-10분 동안 가열한 후 TLC plate 상에 나타나는 성분을 확인하였다.

#### 6. 1. 4 Iron(III) chloride reagent (FeCl<sub>3</sub>)

시료를 점적한 TLC plate에 10% FeCl<sub>3</sub> 용액을 분무하여, TLC plate 상에 나타나는 성분을 확인하였다.

#### 6. 1. 5 Anisaldehyde-sulphuric acid reagent (AS)

0.5ml의 Anisaldehyde 를 10ml의 빙초산에 첨가한 후, 85ml의

methanol과 5ml의 진한 황산 용액과 함께 분무하여, 100℃ 에서 5-10 분 동안 가열한 후 TLC plate 상에 나타나는 성분을 확인하였다.

## 6. 2 분광학 기기

### 6. 2. 1 IR

본 실험실 소재의 FT/IR spectrometer (Jasco, FT/IR 4000)을 사용하였다.

### 6. 2. 2 NMR

한국기초과학지원연구원에 의뢰하였으며, 사용된 용매는  $\text{CDCl}_3$  이고, 800MHz NMR spectroscopy(Bruker, Avance800)를 사용하였다.

### 6. 2. 3 MS

한국기초과학지원연구원에 의뢰하였으며 High Resolution Mass Spectrometer(JEOL, JMS-700 Mstation)를 사용하였다.

## 7. 활성물질의 생물학적 활성

항균활성 시험균 및 방법은 항생물질 생산균주의 스크리닝에서 항균활성의 측정에서 언급되었다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 용균성 점액세균의 분리

##### 1. 1 공시 토양

본 대학 주변 및 금정산, 충청북도 옥천, 김천, 대전, 경기도 안산 및 용인, 강원도 속초, 제주도의 토양을 채집 하였으며, 타 세균 및 곰팡이를 억제하기 위해 1주일간 햇빛이 들지 않는 서늘한 곳에서 충분히 건조시켜 지역별로 분리한 약 3000점의 샘플을 준비하였다.

##### 1. 2 먹이균의 선정

Baiting method에 사용되는 먹이균 선정을 위한 실험을 2회 반복하였다. 각 실험군에 따른 점액세균 출현 수를 합산한 결과 *E. coli*에서 31균주, *R. rubra* 22균주, *S. cerevisiae* 16균주, *S. aureus* 1균주로 각각 나타났다.

각 먹이균에 대한 점액세균의 출현 수를 비교하였을 때 *E. coli*와 *R. rubra*에서의 점액세균 출현 수가 많았으나 *R. rubra*의 경우 다른 실험군에 비해 swarm부분이 초기에는 뚜렷하게 보이지 않아, 점액세균의 출현유무를 판단하기 위한 시간이 상대적으로 오래 걸린다는 점에서 *E. coli*가 먹이균으로 적합함을 알 수 있었다.

### 1. 3 점액세균의 분리

토양 시료를 WCX agar배지 사의 patch(*E. coli*)에 처리한 후 현미경을 통해 관찰하며 점액세균을 분리하였다. 점액세균의 분류는 Congo red 염색과 WCX agar와 Vy/2 agar 배지에서의 swarm과 자실체의 형태를 기준으로 삼았다. (Table. 2, Fig. 5)

Table 2. Myxobacteria classification by Congo red staining<sup>9)</sup>

Congo red		
	positive	negative
Suborder	Cystobacterineae	Sorangineae
Family	Myxococcacea Cystobacteraceae	Polyangiaceae 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>

분리된 점액세균은 총 285종으로 세루오즈 용해성 점액세균이 91종, 용균성 점액세균이 194종, 기타가 2종이었다. (Table. 3) 분리된 용균성 점액세균은 *Angiococcus* sp., *Archangium* sp., *Chondromyces* sp., *Corallocooccus* sp., *Cystobacter* sp., *Melittangium* sp., *Myxococcus* sp., *Nannocystis* sp., *Polyangium* sp., *Stigmatella* sp.로 11속의 용균성 점액세균 중 10속이 분리되었다. (Fig. 4) 또한 같은 속의 점액세균이라도 그 형태가 다양함을 알 수 있었다. 특히 *Chondromyces* sp.의 경우 기존에 알려진 형태가 아닌 다른 형태가 발견되었음을 알 수 있

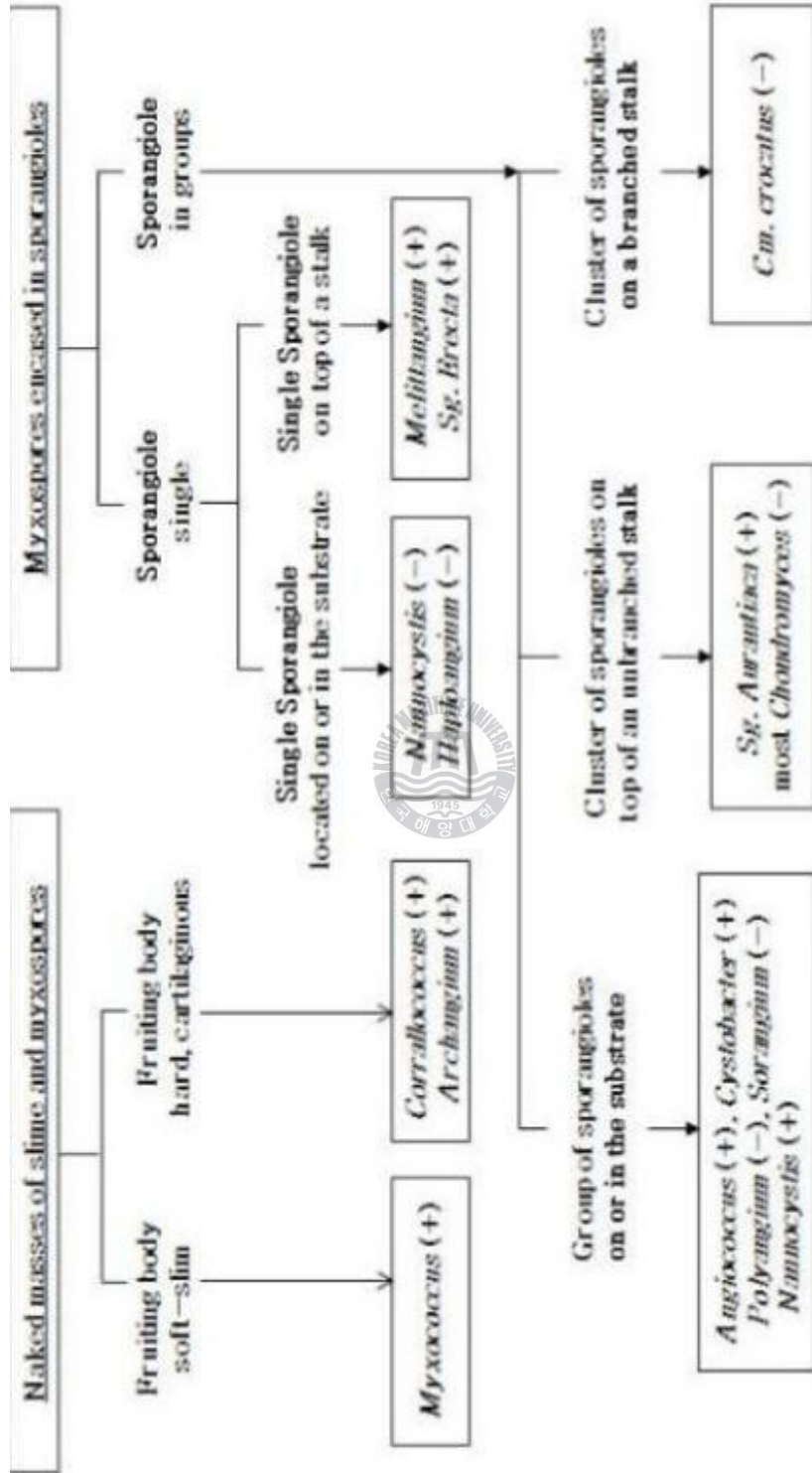


었다.

Table 3. Myxobacterial strains isolated from soil samples

Taxon	Number of isolated strains
<i>Myxococcus</i> sp.	45
<i>Corallocooccus</i> sp.	58
<i>Angiococcus</i> sp.	1
<i>Archangium</i> sp.	50
<i>Cystobacter</i> sp.	18
<i>Chondromyces</i> sp.	2
<i>Nannocystis</i> sp.	5
<i>Polyangium</i> sp.	10
<i>Stigmatella</i> sp.	2
<i>Melittangium</i> sp.	1
<i>Sorangium</i> sp.	91
Unspecified	2
Total isolated	285

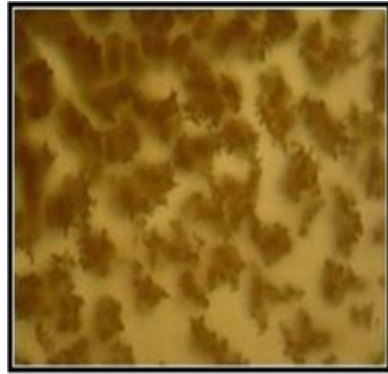




Fr. 3 Morphological classification of myxobacteria22)



*Cystobacter* sp.



*Corallocooccus* sp.



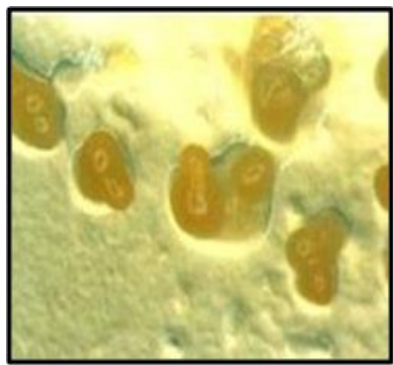
*Archangium* sp.



*Nannocystis* sp.



*Stigmatella* sp.



*Polyangium* sp.

Fig. 4 Myxobacteria fruiting bodies

분리된 용균성 점액세균 194종중에서 *Corallococcus* sp.가 약 29%로 가장 많았으며 그 뒤로 *Archangium* sp. 25%, *Myxococcus* sp. 23% 순으로 분리되었다. 독일 GBF에서 각 국의 토양을 대상으로 분리된 점액세균 중 용균성 점액세균만을 대상으로 비교 해보면 *Archangium* sp. 은 4.6%인데 반하여 국내 토양에서는 *Archangium* sp.가 25%가 분리되어 국내 토양에서의 *Archangium* sp. 출현비율이 매우 높다는 것을 알 수 있다. 반면, *Nannocystis* sp.의 경우 GBF에서 분리한 결과 18.8%로 출현비율이 높았으나 국내 토양에서는 2%로 *Archangium* sp.의 경우와 반대로 매우 낮은 비율로 분리되었음을 알 수 있다. 이러한 결과에서 Myxobacteria의 출현은 기원이 되는 토양에 따라 그 출현종의 비율이 다르다는 것을 알 수 있다. (Tale. 3)



## 2. 대사산물의 스크리닝

최종 분리된 점액세균은 screening 배양을 통하여 2차 대사산물이 흡착된 XAD와 배양물을 수확하였다. 이 중 XAD와 균체를 모아 MeOH, Acetone으로 추출하였고 EtOAc, H<sub>2</sub>O로 1차 분획한 후 다시 EtOAc, 층 분획물을 MeOH, n-Heptane으로 최종 분획하여 세포벽과 배지성분을 제거한 2차 대사산물을 얻었다. 여기에서 얻어진 2차 대사산물을 screening하였다.

Screening은 TLC을 이용한 화학적 screening과 항균활성검사인 disc 확산법을 이용한 screening을 실시하였다. screening한 균주 106 균주 중 disc 확산법으로 inhibition zone이 나타난 *Myxococcus* sp.은 37균주로 *E. coli*에서 inhibition zone이 나타난 균주는 5종으로 10mm미만 4종, 10mm이상 1종, *S. aureus*은 14종으로 10mm미만 11종, 10mm이상 3종, *R. rubra*은 10종으로 10mm미만 3종, 10mm 이상 6종, *S. cerevisiae*은 5종으로 10mm미만 4종, 10mm이상 1종, *C. albicans*은 3종으로 10mm이상 3종으로 나타났다.

따라서 본 연구는 항균활성실험 결과에서 *E. coli*에 10mm이상의 활성을 보인 균주인 YH667을 대상으로 *E. coli*에서의 활성 본체 및 대사산물에 관한 연구를 수행하기로 하였다.

Table 4. Screening of myxobacteria for antimicrobial activity

Strain Taxon		Inhibition zone (mm)				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>R. rubra</i>	<i>S. cerevisiae</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	Cd	-	++	-	-	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	Nn	-	-	-	+	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.	-
667	Mx	++	-	n.t.	n.t.	-

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

n.t. = not tested

Mx : *Myxococcus* sp., Cb : *Cystobacter* sp.,

Ar : *Archangium* sp., Cd : *Chondromyces* sp.,

Cc : *Corrallococcus* sp., Nn : *Nannocystis* sp.,

Pl : *Polyangium* sp.



### 3. 균주 YH667의 동정

제주도 토양에서 분리한 균주 YH667은 Congo red 염색에서 양성으로 나타났다.

YH667은 WCX agar와 Vy/2 agar에서 노란색 색소를 내는 특징을 가졌으며 자실체는 짙은 노란색 또는 주황색을 띠었다. 자실체의 모양은 구형으로 돌기처럼 튀어나와 있음을 확인할 수 있었다. (Fig. 5)

WCX agar와 Vy/2 agar에 균체를 옮겼을 때 배지는 본연의 색을 가지고 있었으나 시간이 지날수록 노란색으로 변하는 것을 보아 YH667이 성장할수록 노란색의 색소를 분비하는 것임을 알 수 있었다. 또한 myxobacteria의 특징인 액체 배양 시 flask 벽면에 띠를 두르는 특징과 균체가 둥글게 뭉쳐 있는 특징을 확인할 수 있었다.(Fig. 5)

YH667의 자실체 형태와 영양세포, 포자의 형태를 “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology” 9 Edition(1994)에서 참고하여 각각의 특징을 비교한 결과 YH667이 *Myxococcus* sp. 임이 추정되었다.

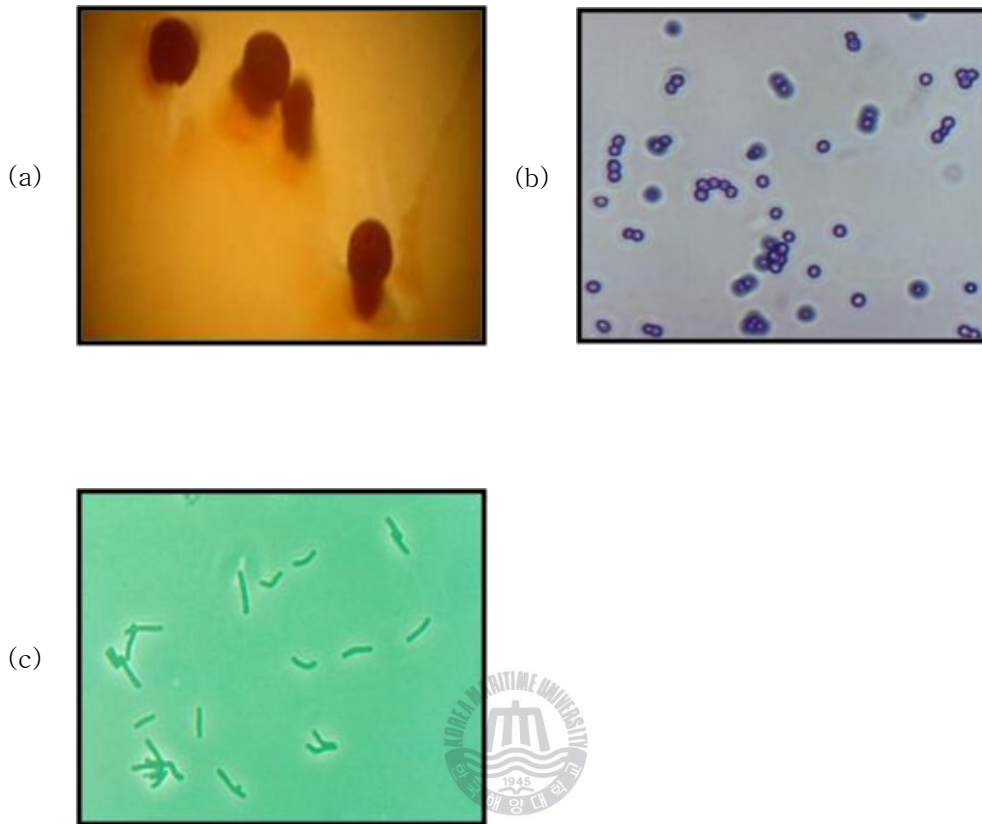
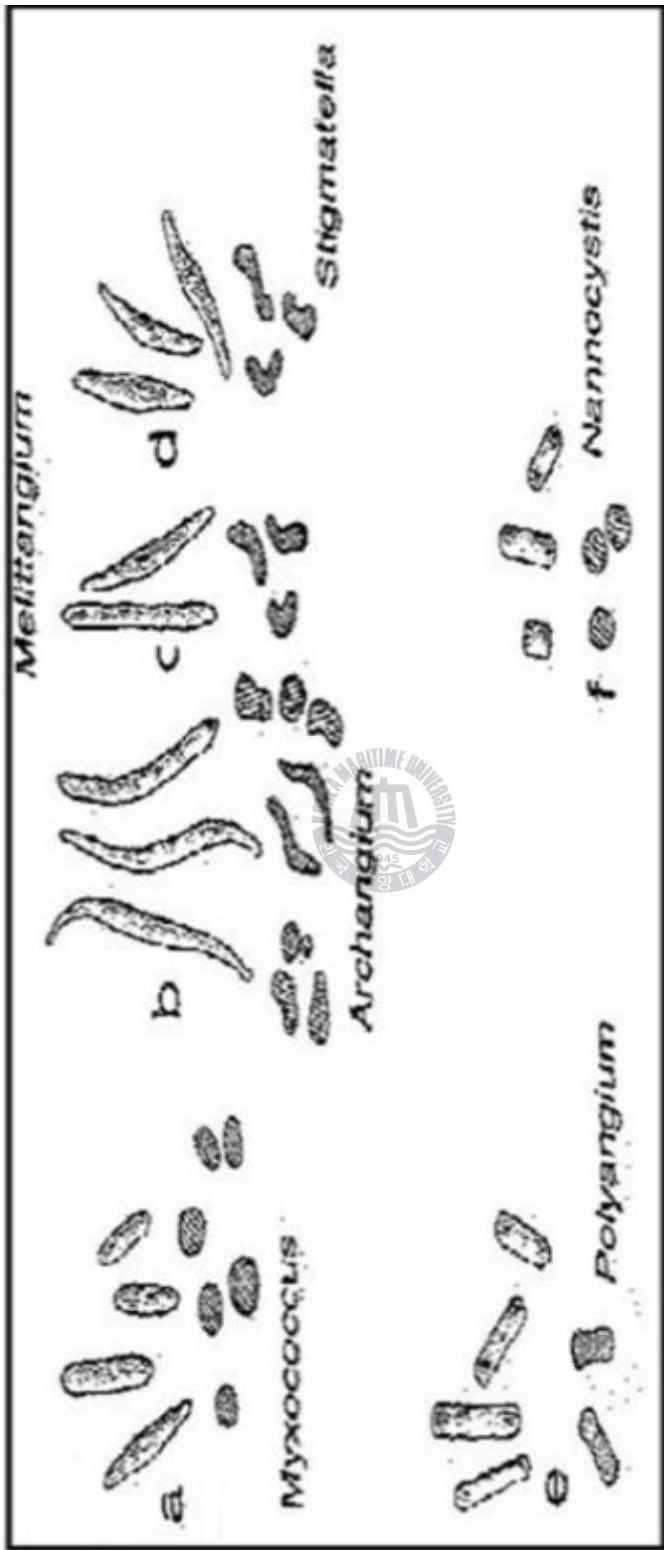


Fig. 5 Morphological characteristics of strain YH667

- (a) Fruiting body
- (b) Myxospores
- (c) Vegetative cell



Fr. 6 Cell type of myxobacteria 9)

## 4. 균주 YH667의 대량 배양

균주 YH667의 배양은 Vy/2 agar 배지에 streak한 균체를 standard MD1 liquid를 사용하여 shaking incubator에서 30℃, 160rpm의 조건하에서 84L을 10L, 120시간씩 총 10번 배양하였다. YH667의 액체 배양 시 배양액은 전체적으로 맑고 투명하였으며 균체의 성장에 따라 옅은 노란색에서 노란색을 띠었다. 균체는 노란색 또는 주황색을 띠었고 XAD은 짙은 노란색을 띠었다. 배양 동안의 평균 pH는 7.3 이었고 점액세균을 shaking incubator에서 배양했을 때 flask 벽면에 균체가 띠를 둘러 부착되어 있는 현상이 관찰 되었다. 배양 후 100mesh 체를 이용해 sieving하여 균체와 XAD를 배양액과 분리하였고 배양액에 남아 있는 균체는 원심분리를 통하여 균체의 손실을 최소화 하였다.

## 5. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 분리 정제



### 5. 1 추출 및 분획

#### 5. 1. 1 추출

sieving을 통해 걸러진 균체와 XAD, 원심분리를 통해 얻은 균체를 MeOH:Acetone=1:1로 1차 추출한 후 2차 추출부터 Acetone으로 추출하여 농축하였다.

#### 5. 1. 2 분획

추출을 통해 획득한 농축물을 분액여두를 이용해 EtOAc층과 H<sub>2</sub>O층으로 나눈 후 EtOAc 층을 농축하였다. 농축한 EtOAc층을 다시 MeOH와 n-Heptane으로 분획하여 MeOH층을 농축하여 분리 시료를 획득하였다. 이렇게 획득된 시료는 1g 이었다.

## 5. 2 분리 정제

분획을 통해 획득한 시료를 silica gel column chromatography 하였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 와 MeOH을 용매계로 사용하였고 이때 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>에서 MeOH의 비율이 0%, 5%, 10%, 20%, 100%씩 증가 하도록 하였다. 그리하여 총 5개의 fraction을 얻었고 그 중 5% MeOH인 fr.2을 사용하였다. (Fig. 7)

Fr.2는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>와 Acetone을 사용하여 silica gel column chromatography하였다. 이때 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>에서 Acetone의 비율이 5%, 10%, 30%, 50%, 70%, 100%로 증가하도록 하여 총 7개 fraction을 얻었고 이 중 Acetone 70%인 fr. 2-5 을 사용하였다.

Fr. 2-5 은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 2 : 8을 이동상으로 하여 sephadex LH-20을 하였다. UV 254nm에서 모니터하여 총 5개 fraction을 얻었으며, 이 중 fr. 2-5-3을 사용하였다.

Fr. 2-5-3을 H<sub>2</sub>O와 MeOH을 용매계로 하는 RP-18 column chromatography을 실시하였다. H<sub>2</sub>O에서 MeOH의 비율이 75%, 80%, 85%, 90%, 100%로 증가하도록 하였으며 이 중 100% fraction을 사용하였다.

Fr. 2-5-3-5은 semi prep. HPLC을 통하여 H<sub>2</sub>O : MeOH = 17 : 83을 사용하여 compound 1를 얻었다.



YH667XE

Si C. C  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=95:5

Fr. 2

Si C. C  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Acetone=30:70

Fr. 2. 5

Sephadex LH-20  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=20:80

Fr. 2. 5. 3

RP-18 C. C  
MeOH

Fr. 2. 5. 3. 5

RP-18 HPLC  
83% aq. MeOH

Compound 1 (1.3mg)

Fig. 7 Isolation of compound 1 from strain YH667



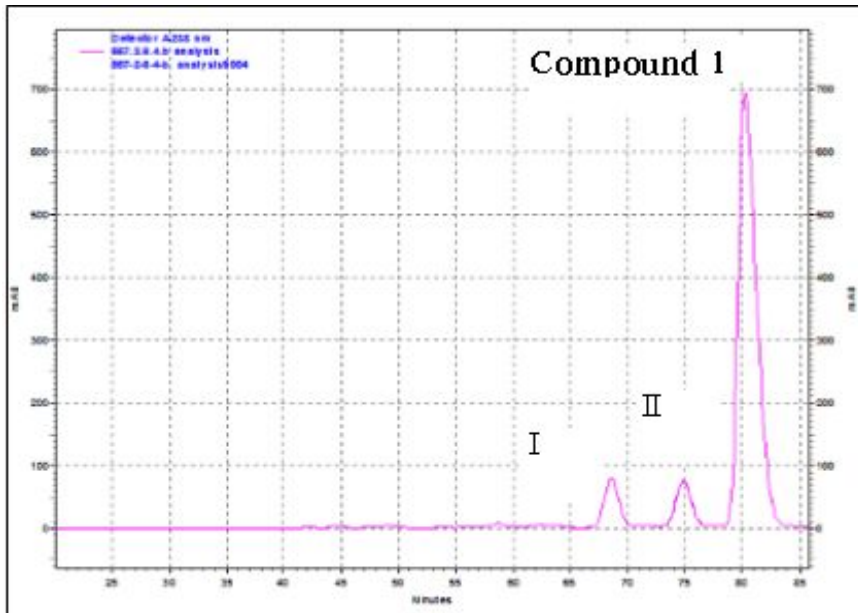


Fig. 8 HPLC profile of active fraction

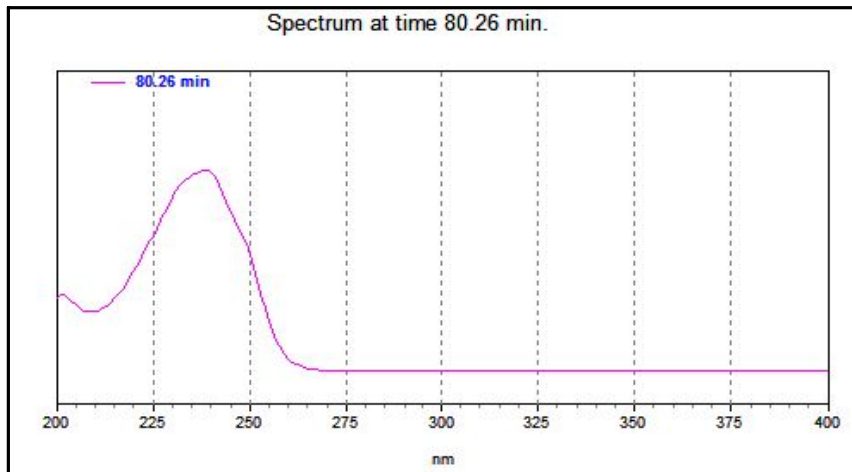


Fig. 9 UV spectrum of compound 1

## 6. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 구조 결정

Compound 1은 colorless oil 이며 RP TLC을 사용한 VS (Vanillin-sulfuric acid)반응에서 H<sub>2</sub>O : MeOH=10 : 90의 용매계를 사용하였을 때 R<sub>f</sub> 0.23의 값으로 짙은 보라색을 나타냈다.

분리된 compound 1의 구조는 NMR spectroscopy와 질량 분석 및 문헌 조사를 통해 구조를 결정하였다.

Table 5. Physico-chemical properties of compound 1

	Compound 1
Appearance	Colorless oil
FAB-MS(m/z)	610[M+H] <sup>+</sup>
IR ν <sub>max</sub> (KBr)cm <sup>-1</sup>	3353,1714,1681
Solubility	
soluble	MeOH, EtOAc, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
insoluble	H <sub>2</sub> O, n-Heptane



Compound 1의 NMR data에서 HMQC과  $^1\text{H}$ -NMR data을 통하여 carbon 32개와 proton 59개가 존재함을 확인하였다. (Fig. 10)

HMQC data을 토대로  $\text{sp}^2$  carbon이 3개( $\delta$  140.7 (C-14), 130.5 (C-16), 125.3(C-15))를 확인하였고 oxygenated carbon 6개( $\delta$  73.7(C-26), 73.5(C-20), 71.6(C-21), 71.0 (C-31), 69.1 (C-23), 58.2(C-32))의 존재를 알 수 있었다.(Fig. 12, 13)  $^1\text{H}$ -NMR data에서 4개의 methyl proton을 확인 할 수 있었는데 double로 갈라지는 2개의 methyl proton  $\delta$  0.93(H-27)과  $\delta$  0.88 (H-28), triple의 갈라짐을 보이는 2개의 methyl proton  $\delta$  0.87 (H-30)과  $\delta$  0.84(H-35)을 각각 확인 할 수 있었다. HMQC data와  $^1\text{H}$ -NMR data의 비교를 통하여 methine 10개, methylene 17개와 methyl 5개가 있음을 확인할 수 있었다.



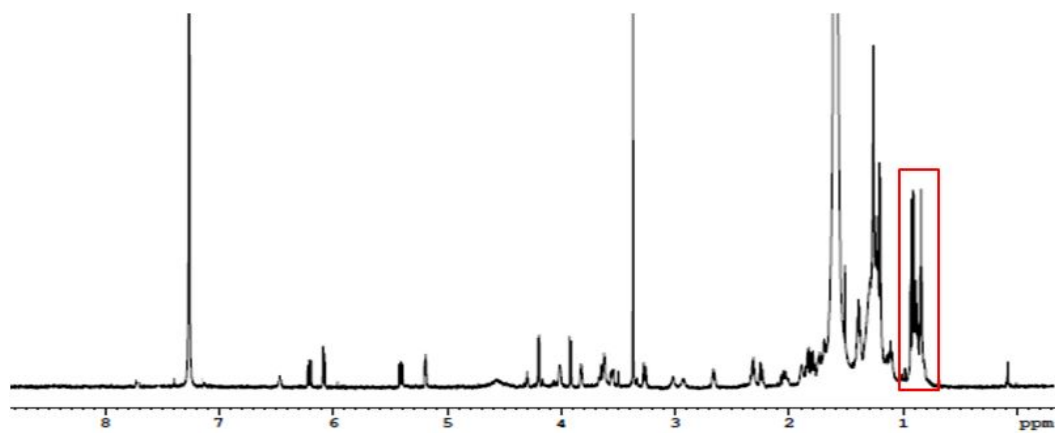
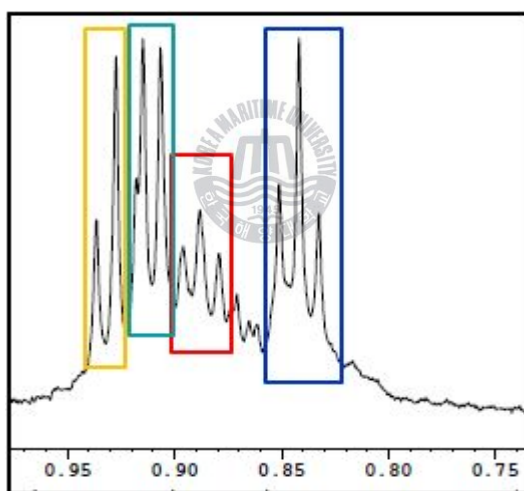


Fig. 10  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1



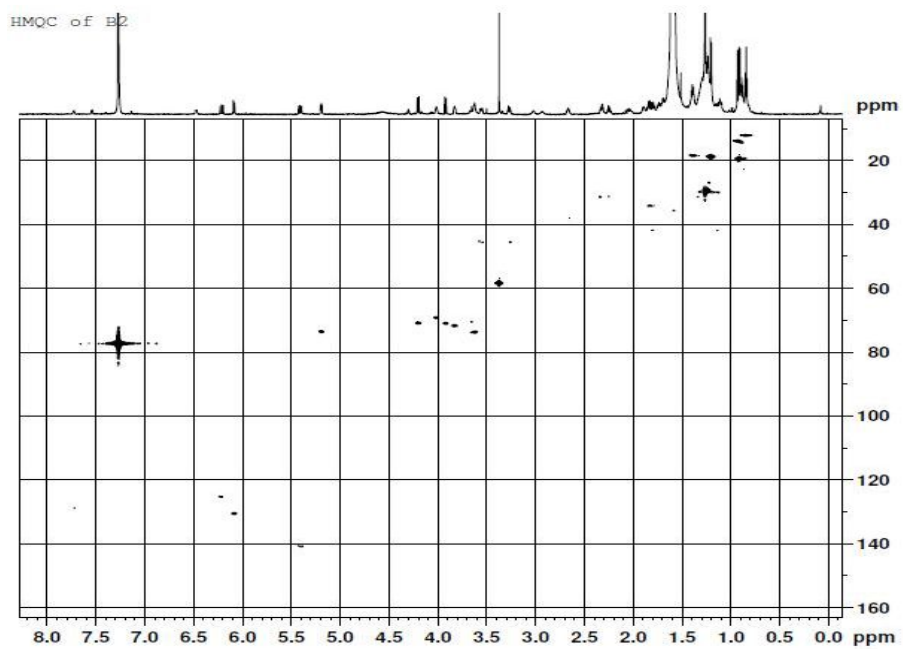


Fig. 11 HMOC spectrum of compound 1 (I)

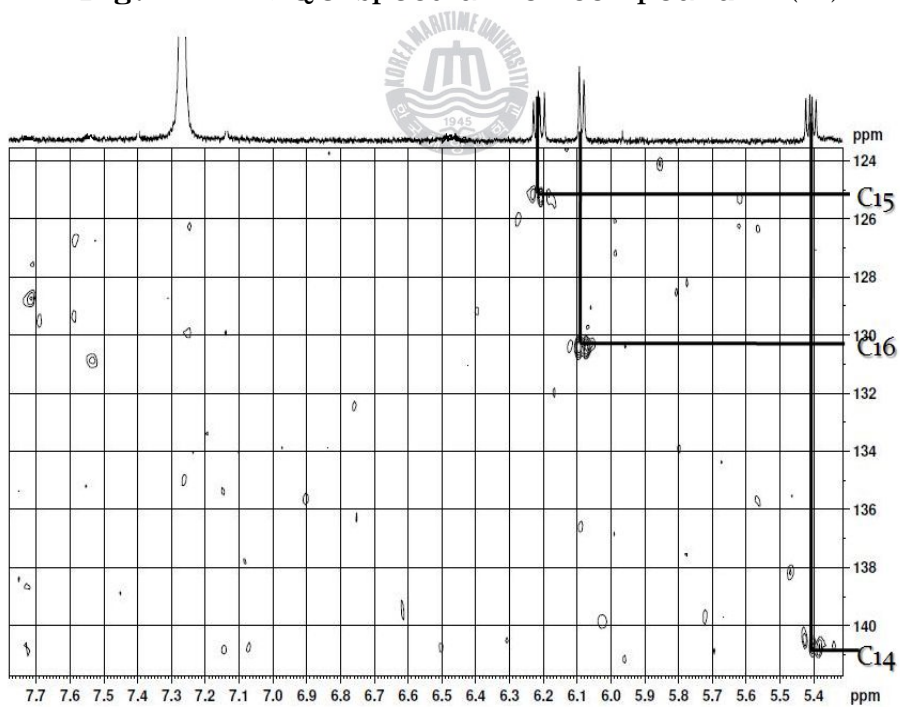


Fig. 12 HMOC spectrum of compound 1 (II)

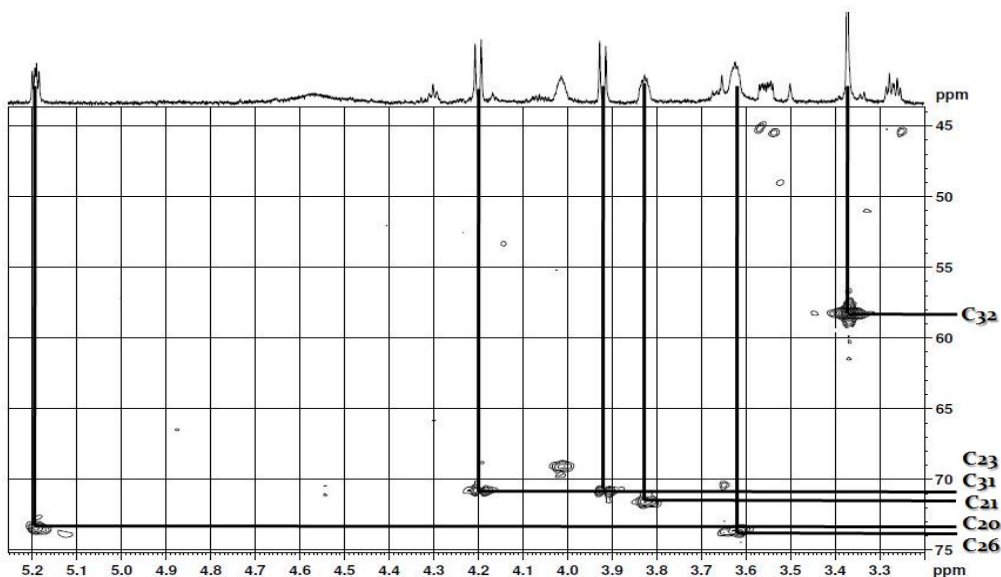


Fig. 13 HMQC spectrum of compound 1 (III)

우선 알게 된 carbon 33개와 proton 59개를 토대로  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY data로 proton과 proton 간의 coupling을 살펴보았다. (Fig. 14)

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum에서  $\text{sp}^2$  carbon과 연결된 proton인  $\delta$  6.21 (H-15)와  $\delta$  5.41(H-14),  $\delta$  6.09(H-16)이 각각 연결되어 있었으며,  $\delta$  5.41(H-14)에  $\delta$  3.27(H-13)과 연결되어 있었다. H-13 methine proton으로부터  $\delta$  1.23의 H-8 methylene proton을 거쳐  $\delta$  3.55의 H-2 methine proton으로 이어지는 연결이 확인되었다. H-2 ( $\delta$  3.55) methine proton과 H-27( $\delta$  0.88) methyl proton이 연결되어 있었고 H-4( $\delta$  2.24) methine proton과 H-28( $\delta$  0.93)의 methyl proton도 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. Methine proton H-13에 H-29( $\delta$  2.66) methylene proton을 거쳐 H-30( $\delta$  0.87) methyl proton에 이어지는 연결을 확인하였다. 그리고 H-18( $\delta$  2.32) methylene proton에서 H-20( $\delta$  5.19), H-21( $\delta$  3.8), H-23( $\delta$  4.01)

의 methine proton을 거쳐 H-24( $\delta$  3.54)로 이어지는 연결을 COSY data를 통하여 확인할 수 있었다.

COSY data를 통해 알게 된 부분 구조는 다음과 같다.(Fig. 15, 16)

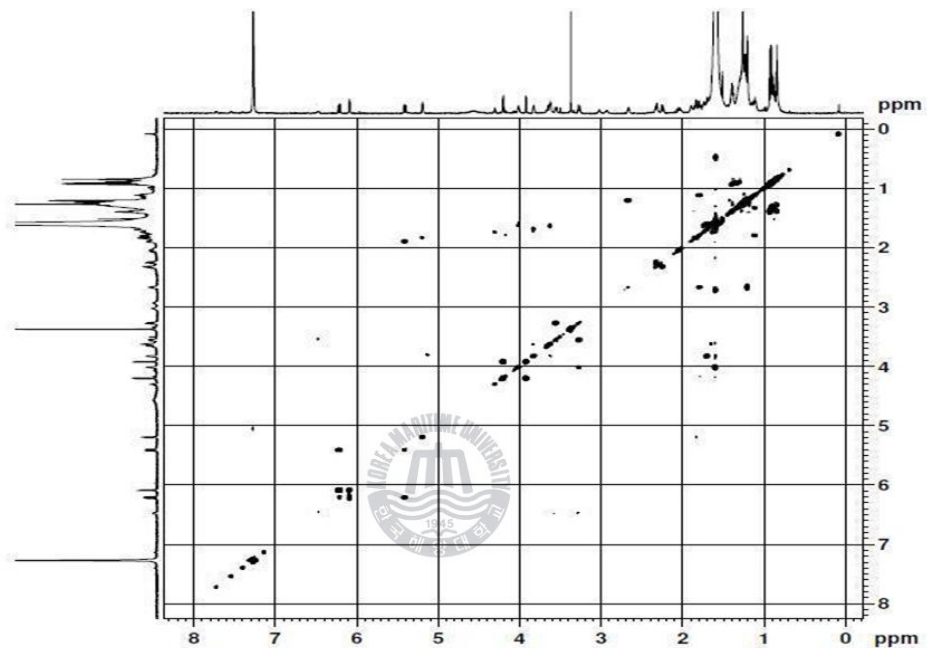


Fig. 14  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of compound 1

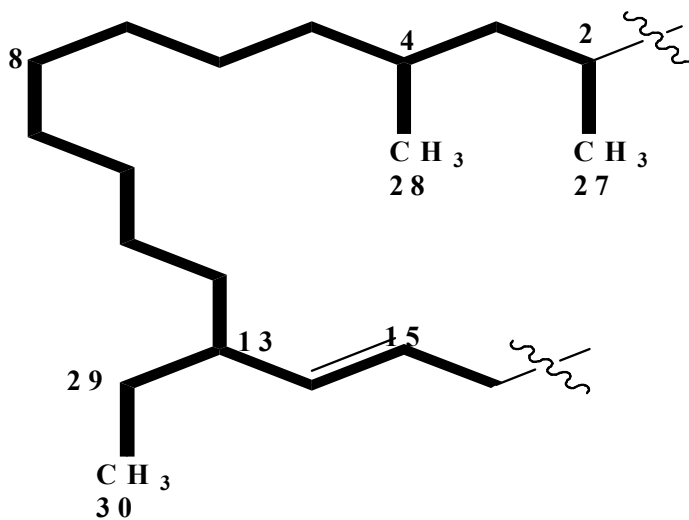


Fig. 15 Partial structure A of compound 1

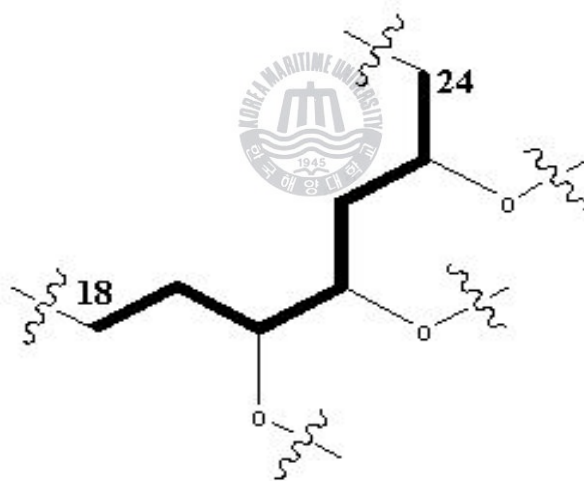


Fig. 16 Partial structure B of compound 1



Table 6. NMR data and COSY correlations of compound 1

Position	$\delta_c$	$\delta_H$	COSY
2	41.7	3.55	H-3, H-27
3	29.4	1.82(a) 1.15(b)	H-1, H-4
4	31.0	2.24	H-3, H-5, H-28
5	36.8	1.73	H-4, H-6
6	26.1	1.91	H-5, H-7
7	29.7	1.26	
8	28.8	1.23	H-7, H-9
9	29.1	1.23	H-8, H-10
10	29.8	1.18	H-9, H-11
11	27.4	1.39	H-10, H-12
12	34.9	1.85	H-11, H-13
13	45.3	3.27	H-13, H-14, H-29
14	140.7	5.41	H-15
15	125.3	6.21	H-14, H-16
16	130.5	6.09	H-15
18	31.3	2.32	H-19
19	32.1	1.26	H-18, H-20
20	73.5	5.19	H-19, H-21
21	71.6	3.8	H-20, H-22
22	35.4	1.89	H-21, H-23
23	69.1	4.01	H-22, H-24
24	45.8	3.54	H-23
26	73.7	3.62	
27	17.2	0.88	H-1
28	19.2	0.93	
29	37.8	2.66	H-13, H-30
30	12.0	0.87	H-29
31	71.0	4.20 3.92	
32	58.2	3.37	
33	34.0	1.26	
34	18.7	1.20	
35	13.8	0.84	

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of compound 1 were recorded at 800MHz and 200MHz in  $\text{CDCl}_3$ , respectively.

위에서 확인된 부분 구조 A와 B, IR spectrum data에서 확인 할 수 있는  $3353\text{cm}^{-1}$ 의 hydroxyl group과  $1714$ 에서의 ketone group,  $1681\text{cm}^{-1}$ 에서 확인 할 수 있는 amide group을 토대로 *Myxococcus* sp.가 생산해내는 활성 물질을 대상으로 문헌 조사를 실시하였다. 그 결과 myxovirescin group임을 알 수 있었고 myxovirescin group 내의 유도체 중에서 myxovirescin C<sub>1</sub>임을 알 수 있었다. Myxovirescin C<sub>1</sub> 과 compound 1의  $^{13}\text{NMR}$  spectrum data 비교를 통하여 다시 확인 하였다.(Table. 7)

Myxovirescin은 myxobacteria중에서 *Myxococcus virescens*, *Myxococcus flavescens*, *Myxococcus xanthus*에서 발견되었고 현재 myxovirescin group은 myxovirescin A을 비롯하여 20여개의 유도체가 발견되었다.



Table 7. Comparison of the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift of 1 and myxovirescin C<sub>1</sub>

Chemical shifts ( $\delta_c$ )		
Position	Compound 1	Myxovirescin C <sub>1</sub>
1	140.7	140.4
2	125.3	125.4
3	130.5	130.3
4	73.7	74.1
5	73.5	73.7
6	71.6	71.6
7	71.0	70.7
8	69.1	68.6
9	58.2	58.1
10	45.8	45.4
11	45.3	45.3
12	41.7	40.8
13	29.4	28.6
14	37.8	37.4
15	36.8	37.0
16	35.4	35.9
17	34.9	35.1
18	34.0	34.0
19	32.1	31.3
20	31.3	30.9
21	31.0	30.7
22	29.8	29.9
23	29.7	29.6
24	29.1	29.3
25	28.8	29.0
26	27.4	27.0
27	26.1	26.6
28	19.2	19.6
29	18.7	18.3
30	17.2	17.2
31	13.8	13.7
32	12.0	11.9

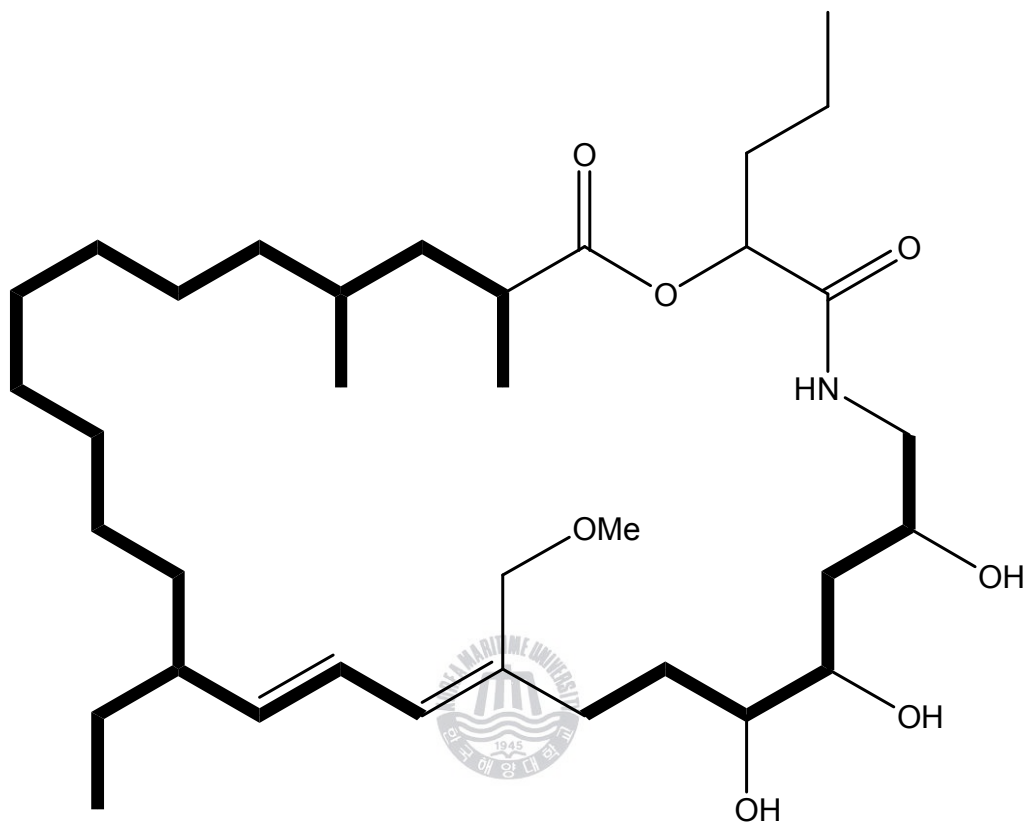


Fig. 17 Structure of compound 1 (Myxovirescin C<sub>1</sub>)

## 7. 균주 YH667이 생산하는 항생물질의 항균활성

YH667에서 분리한 compound 1(myxovirescin C<sub>1</sub>)을 *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*를 대상으로 10, 25, 50, 100 $\mu$ g/disc로 각각 희석하여 항균활성실험을 실시하였다. 그 결과 50 $\mu$ g/disc에서 *E. coli*에 대해 10.3 (10.7)mm의 inhibition zone이 나타났고 100 $\mu$ g/disc에서 13.2 (14.0)mm의 inhibition zone이 나타났음을 알 수 있었다. *S. aureus*의 경우 100 $\mu$ g/disc에서 9.1mm의 inhibition zone이 나타났다.(Table. 8) 이는 기존에 선행된 연구결과와 일치하였다.

Table 8. Antimicrobial activity of compound 1

	Conc. ( $\mu$ g/disc)	Inhibition zone(mm)		
		Bacteria		Yeast
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Compound 1 (myxovirescinC <sub>1</sub> )	10	-	-	-
	25	±	-	-
	50	10.3(10.7)	±	-
	100	13.2(14.0)	9.1	-

#### IV. 결론

새로운 화합물을 얻기 위해서는 유전자 재조합이나 유기 합성, 자연에서의 물질 탐색을 통해 다른 화합물을 기초가 되는 독창적인 선도 물질을 바탕으로 하여 얻을 수 있다. 그 중에서 대표적인 것이 자연에서의 물질 탐색인데 그 중에서 myxobacteria은 새로운 자연계 재료로 각광받고 있다. Myxobacteria는 Proteobacteria  $\delta$  그룹에 속하며<sup>22)</sup> Gram-negative의 절대 호기성 토양 bacteria로 기아 상태에서 자실체를 형성하고 활주 운동을 하며 군집을 이루며 사는 독특한 생활사가 있는데 그 군집이 하나의 형태의 이루기도 한다.<sup>3, 22)</sup> 게다가 일반 다른 세균보다 genome size가 커 다양한 화합물의 생합성 능력을 가지고 있기에<sup>20)</sup> 천연물 생산자의 새로운 그룹으로 알려져 있다. Myxobacteria는 먹이를 무엇으로 하느냐에 따라 크게 2가지로 나뉘지는데 세루로즈를 용해하여 먹이로 하면 세루로즈 용해성 myxobacteria, 다른 세균을 용해시켜 먹이로 하면 용균성 myxobacteria라 한다.<sup>1)</sup> 세루로즈 용해성 myxobacteria에서는 대표적으로 epothilone이라 하는 강력한 항종양 활성을 가진 화합물을 생산하고<sup>1)</sup> 용균성 myxobacteria의 경우 myxothiazol이라 하는 전자 전달계 저해 물질을 생산해낸다.<sup>7)</sup> 하지만 이 2종류의 myxobacteria모두 통상의 분리 방법으로 분리되지 않아 방선균등의 다른 세균에 비해 알려진 바가 적다.

본 연구에서는 국내 토양을 대상으로 용균성 myxobacteria의 분리와 배양법, 먹이균 선정 실험, 2차 대사산물의 연구를 진행하였다. 용균성 myxobacteria의 배양법으로 baiting method를 사용하였고 baiting method에 사용되는 먹이균을 선정하기 위해 *E. coli* 외 3종의 균을 사용하여 실험한 결과 myxobacteria 출현수가 가장 많았던 *E. coli*를 먹이균으로 선정하였다. 먹이균 *E. coli*를 patch로 한 baiting method를 통해 194종의 용균성 myxobacteria를 분리해냈고 *Corallococcus* sp.,

*Archangium* sp., *Myxococcus* sp.순으로 많이 분리되었다. 분리된 194종 중 screening한 106을 실시했고 *Myxococcus* sp.의 경우 *E. coli*, *S. aureus*, *S.cerevisiae*, *R. rubra*, *C. albicans* 항균활성 실험에 사용되는 모든 공시균에서 inhibition zone 을 보였다. 그 중에서도 YH667의 경우 *E. coli*에 대해 10mm이상의 강한 항균활성을 보였다. 따라서 YH667의 *E. coli* 활성 본체 및 대사산물에 관한 연구를 수행하였다.

YH667은 제주도 토양에서 분리하였고 고체 배양과 액체 배양 시 노란색 색소를 내는 특징을 가지고 있으며 둥그런 돌기 모양의 자실체를 형성하였다. YH667의 자실체와 영양세포, 포자의 형태를 참고문헌과 대조한 결과 *Myxococcus* sp.로 밝혀졌다. YH667을 액체 배양하여 MeOH과 Acetone으로 추출하고 EtOAc와 H<sub>2</sub>O, MeOH, n-Heptane으로 분획하여 분리 시료를 얻었다. 분리 시료를 silica gel column chromatography와 RP-18 column chromatography, sephadex LH-20을 통해 분리 하였고 semi prep. RP-18 HPLC로 최종 분리 정제 하였다.

이렇게 하여 compound 1을 분리하였고, 이 과정에서 1의 유도체로 추정되는 두 개의 화합물도 분리 하였으나 모두 1mg 이하의 극미량으로 존재하였다. Compound 1은 RP-18 TLC에서 보라색 spot을 내었고 R<sub>f</sub> 0.23을 나타내었으며 238nm에서 최대 흡수를 보였다. Compound 1의 1D-NMR spectrum data에서 32개의 carbon과 59개의 proton을 확인하였고 2D-NMR spectrum data를 통해 부분 구조 A, B를 확인하였다. 이를 바탕으로 MS 및 IR data와 함께 문헌 조사를 통해 compound 1을 myxovirescin C<sub>1</sub>로 최종 결정하였다. Compound 1은 항균활성실험에서 50 $\mu$ g/disc에서 10.3(10.7)mm의 inhibition zone을 나타냈다.

## V. 참고 문헌

1. B. Noren, G. Odham. 1973. *Antagonistic effect of Myxococcus xanthus. II. Isolation and characterization of inhibitory lipid-factor*. Lipids 8. 573-583.
2. E. Risenberg, S. Fytlovitch, S. Sarmeli, Y. Kashman. 1982. *Chemical properties of Myxococcus xanthus antibiotic TA*. Journal of antibiotics 35. 788-793.
3. H. Irschik, K. Gerth, T. Kemmer, H. Sterinmetz, H. Reichenbach. 1983. *The myxovalargins, new peptide antibiotics from Myxococcus fulvus (Myxobacterales)*. I. Cultivation, isolation, and some chemical and biological properties. Journal of antibiotics 36. 6-12.
4. H. Irschik, R. Jansen, G. Höfle, K. Gerth, H. Reichenbach. 1985. *The corallopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxobacteria*. H. Reichenbach. 1985. *The corallopyronins, new* Journal of antibiotics 38. 145-152.
5. H. Reichenbach. 2001. *Myxobacteria, producers of novel bioactive substance*. Journal of industrial Microbiology & Biotechnology 27. 149-156.
6. H. Reichenbach, G. Höfle, 1993, *Biologically active secondary metabolites from myxobacteria*. Biotech. Adv., 11, 219.
7. H. Reichenbach, G. Höfle, 1995, *In Myxobacteria II ; Dworkin, M., K aiser, D., Eds., American Society for Microbiology, Washington., 347.*



8. H. Reichenbach, G. Höfle, 1999, *Myxobacteria as a producers of Secondary metabolites*. In Grabley S., Thiericke, R., (Eds), Drug discovery from nature, Springer Verlag, Berlin, 149-179.
9. H. Reichenbach, M. Dworkin, In Balowsm, A. H. G. Truper, M. Dworkin(eds.), 1992, The prokaryotes (2nd ed), Springer Verlag, New York, *The Myxobacteria*, 3416-3487
10. K. Komagata, A. Kawaguchi, S. Yamanaka, 1987, *Isolation and identification of myxobacteria from soils and plant materials, with special reference to DNA base composition quinone system, and with a description of a new species, Myxococcus flavescens*. J. Gen. Appl. Microbiol., 33. 247-265
11. J. R. Evans, E. J. Napier, R. A. Fletton. 1978. *G1499-2, a new quinoline compound isolated from the fermentation broth of Cytophaga johnsonii*. Journal of antibiotics 31. 952-958.
12. K. Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach, W. Trowitzsch. 1980. *Myxothiazol, an antibiotic from Myxococcus fulvus. I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties*. Journal of antibiotics 33. 1474-1490.
13. K. Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach, W. Trowitsch. 1982. *The Myxovirensins, a family of antibiotics from Myxococcus virescens (Myxobacterales)*. Journal of antibiotics 35. 1454-1459.

14. K. Gerth, S. Paradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Múler. 2003. *Myxobacteria: Proficient products with various biological activities—past and future biotechnological aspects with the focus on the genus Sorangium*. Journal of Biothechnology, 106. 233-253
15. K. Gerth, W. Trowitsch, V. Wray, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach. 1982. *Pyrrrolnitrin from Myxococcus xanthus(Myxobacterales)*. Journal of antibiotics 35. 1101-1103.
16. L. Zhang, H. 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.
17. M. Weigele, W.Leingruber. 1967. *The structure of myxin*. Tetrahedron Lett. 1967. 715-718.
18. N. Onishi, K. Izaki, H. Takahashi. 1984. *A macrocyclic antibiotic M-230B produced by Myxococcus xanthus. Isolation and characterization*. Journal of antibiotics 37. 13-19.
19. S. Miyashiro, S. Yamanaka, S. Takayama & H. Shibai. 1988. *Novel macrocyclic antibiotics: Megovalicins A, B, C, D, G and H. I. Screening of antibiotics-producing myxobacteria and production of Megovalicins*. Journal of antibiotics, 41. 433-438.
20. S. M. Ringel, R. C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A. L. Gutt, B. Blair, G. Kanter, M. von Strandtmann. 1977. *Ambruticin(W7783), a new antifungal antibiotic*. Journal of antibiotics 30. 371-375.

21. W. Graef, D. Sukatsch. 1965. *Wassermycobakterien (Sporocytophaga cauliformis) und ihr antibiotischer Wirkstoff*. Arch. Hyg. Bakteriol 149. 694-707
22. W. Trowitsch, V. Wray, K. Gerth, G. Höfle. 1982. *Structure of myxovirescin A, a new macrocyclic antibiotic from gliding bacteria*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1982. 1340-1342
23. H. Reichenbach. 1994. *The fruiting, gliding bacteria : The myxobacteria*, 515-525. J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams(ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
24. 조경연, 2001, Myxobacteria의 군집생활, 자실체 형성 및 생리활성물질의 생산., 생물산업, 14, 11-16.

