

국내토양에서 분리한 혐기성 세균 *Streptococcus* sp.  
An-21-1 이 생성하는 항생물질

II. 항생물질을 생성하는 혐기성 세균의 발효 및 항생물질의 분리 정제

박승춘·윤효인·오태광\*  
충남대학교 수의과대학  
한국과학기술원 유전공학연구소\*  
(1992년 8월 31일 접수)

Antibiotics produced by anaerobic fermentation of *Streptococcus* sp.  
An-21-1 isolated from domestic soil

II. Fermentation and purification of antibiotics from anaerobe

Seung-chun Park, Hyo-in Yun, Tae-kwang Oh\*  
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University  
Genetic Engineering Research Institute, KAIST\*  
(Received Aug. 31, 1992)

**Abstract** : In order to search for new antibiotics from anaerobic bacteria, a large number of samples from domestic soil were collected and processed by appropriate methods. A potential strain, *Streptococcus* sp. An-21-1, was found to produce antimicrobial compounds.

The Results were as follows ;

1. During fermentation, the bacteria grew rapidly up to 20hr, thereafter entered the death phase. The optimal temperature and pH for the bacterial growth were 37°C and pH 7.0, respectively.
2. Antibiotics were purified from culture broth by solvent extraction, silica gel column chromatography and Sepadex LH 20 column.
3. Physicochemical properties of Ap-1 and Ap-2 were similar ; Their melting points were between 234-237°C . Color reactions of ninhydrin, 2,7-dichlorofluorescein, 4-dimethylaminobenzaldehyde, Dragendroff's reagent and 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, were positive. Therefore, we assumed that these antibiotics have amine group, imine group, alkaloid, and lipid components. These were stable to heat. UV spectrophotometry showed two peaks at 210 nm and 260 nm.

From above results, we assumed these antibiotics are belong to the peptide antibiotic family.

**Key words** : anaerobic bacteria, *Streptococcus* sp, An-21-1, C-SPY medium.

서 론

항생물질은 미생물이 생성하는 비교적 저분자의 대사 산물로 병원성 미생물에 대해 항균활성을 갖고 있는 물

질이다. 미생물의 대사과정은 크게 두가지로 분류하고 있는데 1차대사는 미생물의 세포성장과 유지에 필수적인 저분자의 대사중간물질의 광합성과 생물화합반응에

필요한 에너지를 공급하는 모든 동화 및 이화반응을 지칭하고 있으며 미생물의 세포의 성장이나 분열에는 직접적인 관여를 하고 있지는 않는 것으로 알려져 있다. 미생물의 2차 대사산물인 항생물질은 1차 대사산물보다 그 생합성 경로가 매우 다양하고 복잡하다.<sup>1</sup> 일반적으로 항생물질의 생성은 균체 생장시기를 거쳐 항생물질 생산시기에 이른다.<sup>2</sup> 항생물질의 생산은 여러 요인에 의해 영향을 받으므로 산업적 생산이 용이하지는 않는 것으로 알려져 있으므로 이들 생화학적 인자에 대한 실험이 선행되어야 한다. 항생물질의 생산에 영향을 미치는 요인으로는 enzyme inhibition과 repression<sup>3,4</sup>, carbon catabolite repression<sup>5</sup>, nitrogen repression<sup>6</sup>, phosphate regulation<sup>7</sup>, ammonia regulation<sup>8</sup> 등에 영향을 받으므로 이들 조건을 잘 연구하여 최적조건에서 최대생산을 유도하여야 한다.<sup>9</sup>

그러므로 본 실험에서는 전보에서 이미 보고된 토양에서 분리한 혐기성세균 *Streptococcus* sp. An-21-1이 생성하는 항균물질이 다체내성균주에 항균력을 가지고 있으므로 이를 대량생산할 수 있는 최적발효조건을 탐색하고 더 나아가 항생물질의 분리 정제방법을 확립하여 향후 신규항생물질을 개발하기 위한 기초자료를 구하는데 있다.

### 재료 및 방법

**발효조건:** 10ml C-SPY 액체배지가 든 pressure tube 에서 37°C 2일 배양한 An-21-1 배양액을 70ml 액체배지가 든 10개 vial에 5% 접종하여 같은 조건으로 2일 배양한 것을 종균으로 사용하였다. 이 종배양액을 13L 액체배지가 든 carboy에 5% 균을 접종한 후 37°C에서 5일간 혐기배양하였다. 배양기간동안 20시간 간격으로 배양액을 소량 수확하여 시간별, 세포농도, pH 변화 그리고 항균 활성 역가 변화 정도를 조사하였다. 배양한 배양액을 5000rpm에서 15분간 원침하여 상층액을 실험에 공하였다.

**분리정제조건:** 정제조건을 설정하기 위해 유기용매 추출, charcoal 흡착실험, 이온교환수지 등의 예비실험을 실시하였다.

**An-21-1 균주가 생산하는 항생물질의 분리 정제:** An-21-1 균주 배양액을 원침하여 상층액을 얻어 pH를 10으로 조절한 후 Fig 1에서 나타낸 것과 같은 순서로 분리 정제하였다.

**물질의 정제도:** 분리정제과정을 거치는 동안 물질의 정제도를 알아보기 위해 분리정제의 각 단계마다 얻어진 물질을 검정균을 이용하여 그 항균력을 조사하였다. 각 단계의 물질을 시료로 하여 1/4, 1/8, 1/16 등으로 희

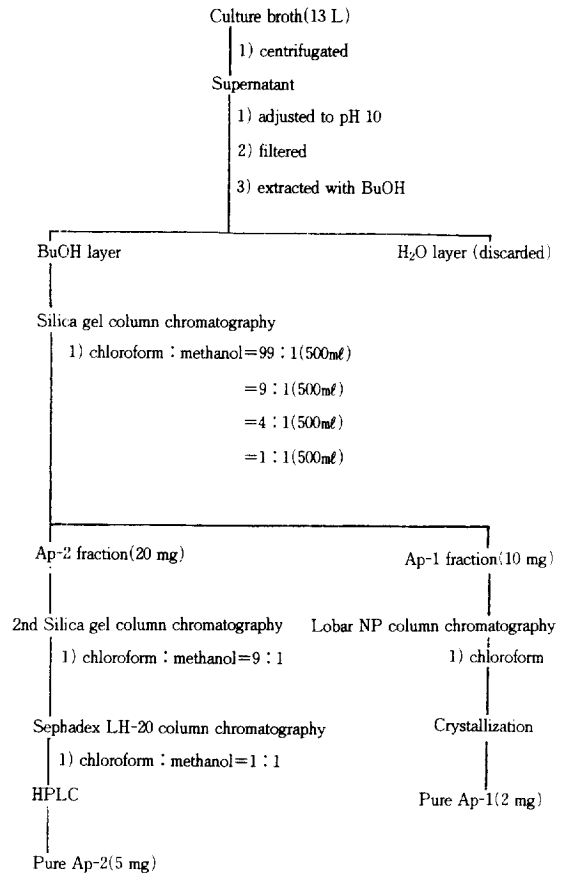


Fig 1. Schematic presentation of purification procedure of antibiotics from strain An-21-1.

석하여 paper disk법으로 검정균에 대한 증식저지환의 크기를 측정하여 standard curve를 작성하였다.<sup>11</sup>

**항생물질의 이화학적 성상:** 분리 정제된 물질을 기준의 물질과 비교하기 위하여 분리 정제된 항생물질 Ap-1과 Ap-2를 소량 취해서 methanol, ethanol, chloroform, benzene, hexane, water 등의 용매에 대한 용해성을 조사하였다. 항균물질 Ap-1과 Ap-2의 물성을 알아보기 위하여 ninhydrin, 2, 4-dichlorofluorescein, anilinephthalate, bromocresol green, rhodamine B, 4-dimethylaminobenzaldehyde, Dragendroff's reagent, 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, molybdophosphoric acid 반응을 실시하였다.<sup>10</sup> Silica Gel plate(Merck, Silica Gel 60F254)를 이용하여 물질의 순수도를 측정하기 위해 thin layer chromatography(TLC)를 수행하였으며 여러 용매조건에서 전개시켜 R<sub>f</sub>치를 조사하였다. 분리 정제된 항생물질 Ap-1과 Ap-2를 소량 취해서 methanol, ethanol, chloroform, benzene, hexane, water 등의 용매에 대한 용해성을 조사하였다. 분리 정제된 항생물질 결정시료 Ap-1 0.1mg과 분말시료 Ap-2 0.

1mg 정도를 micromelting point apparatus (Yanagimoto Co., model Yanaco MP)의 시료대에 올려서 서서히 가열시키면서 시료의 변화를 조사하여 측정하였다.

열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 분리 정제된 시료 Ap-1과 Ap-2 10 µg/ml의 농도로 시료를 만들고 시험관 상부를 밀봉한 후 각 실온 및 100°C에서 2분 처리로 실험을 실시하여 각 시료의 *E coli* BE에 대한 항균력을 조사하였다. Ap-1과 Ap-2의 흡수 최대를 관찰하기 위하여 UV spectrophotometer (Schimazu Uv-260 Spectrophotometer)를 이용하여 파장 500nm에서 190nm까지 1nm/sec의 속도로 scanning하였다. 시료는 10 µg/ml 농도로 methanol에 녹였으며, 1N HCl과 1N NaOH를 첨가하여 산과 알칼리에서의 이행도를 조사하였다.

### 결 과

**배양 :** 배양기간동안의 세포성장, pH 변화 그리고 항생력의 변화는 Fig 2에 나타내었다. 균의 성장은 20시간까지는 급격히 일어났지만 그 이후로는 사멸기로 들어갔으며, pH는 첫날 4.96으로 떨어진 후 거의 일정하게 유지되었다. 항생물질 생산은 120시간에 최대치를 나타내었다. 37°C에서 5일간 배양한 배양액 13L를 원침하여 상층액만을 취하여 5N NaOH로 pH를 10으로 조절한 후, butanol 13L로 3번 용출시킨 다음 rotary evaporator를 사용하여 감압농축하여 시료로 사용하였다.

**1차 silica gel column chromatography :** Butanol 추출 시료 100g을 silica gel이 충전된 column 상단에 가지고 chloroform : methanol series 용매로 용출시켜 분획마다 *E coli* BE에 대해 항균력을 조사하여 Fig 3에 나타내었다.

TLC 상에서 항균력을 나타내는 분획구 20부터 45까

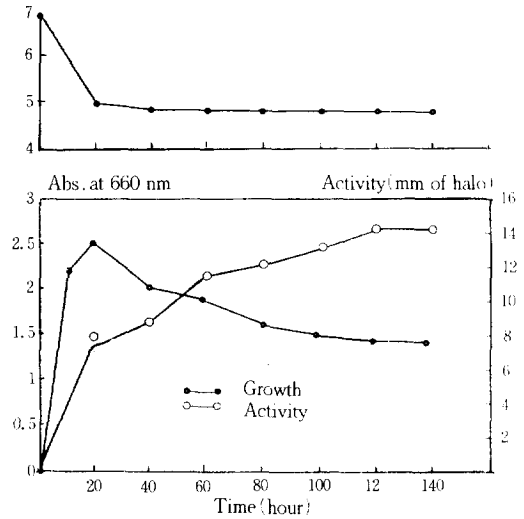


Fig 2. Growth and antibiotic production by strain An-21-1. Activity was tested by using *E coli* BE 1186 as test microorganism.

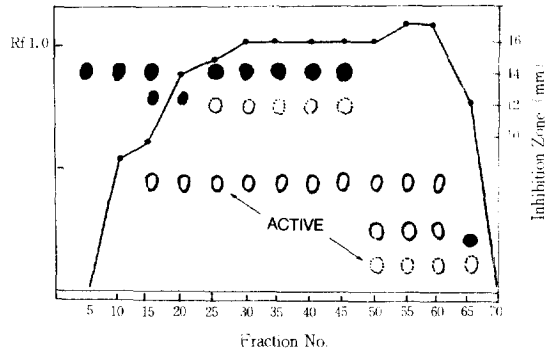


Fig 3. Silica gel column chromatogram of hexane extract from strain An-21-1 culture broth.

Table 1. Physicochemical properties of antibiotics from strain An-21-1 against *E coli* BE 1186

unit : inhibition zone diameter(mm)					
a)pH stability			b)Butanol extraction		
pH			pH		
2	7	10	2	7	10
13			BuOH layer		
13			9		
			H <sub>2</sub> O layer		
			10		
c)Ethylacetate extraction			d)Charcoal adsorption		
pH			pH		
2	7	10	2	7	10
EtoAc layer			Pass		
10			13		
H <sub>2</sub> O layer			Elute		
10			12		
e)Ion exchanger			f)Diaion HP-20		
Dowex-1			Dowex-50		
Pass			16		
13			14		
Elute			10		
			Pass		
			12		
			Elute		
			10		

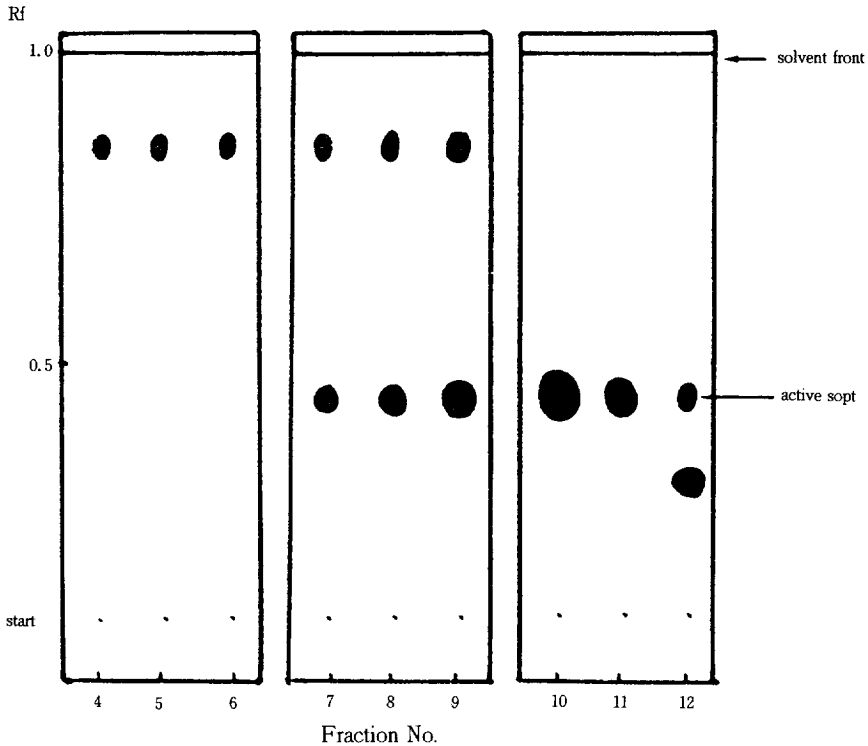


Fig 4. Chromatogram of the antibiotic Ap-1 after NP Lobar column chromatography. (solvent : 100% chloroform)

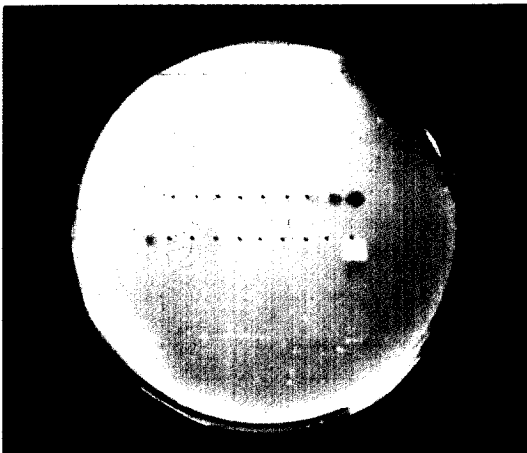


Fig 5. Bioautography of the Ap-1 fraction after NP Lobar column chromatography. (solvent : 100% chloroform)

지 모아 감압 농축하여 얻은 30mg을 Ap-1이라 명명하였으며 다음 분리 정제시료로 사용하였다. 분획구 50부터 65까지 TLC 상에서 다른 부위에 항균력이 나타나므로 따로 모아 감압 농축하여 얻은 50mg 물질을 Ap-2라 명명하고 다음 분리 정제시료로 사용하였다. TLC 전개 용매는 100% chloroform을 이용하였다.

Ap-1의 분리 정제 : 첫번째 정제단계에서 얻은 시료

10mg을 순상 Lobar silica gel column chromatography를 이용하였다. 각각의 분획을 TLC(전개용매 : 100% chloroform) 전개를 시도한 결과 분획 10이 하나의 점으로 나타났으며 이를 Fig 4에 나타내었다. 분리한 시료의 양이 적으므로 Fig 5에서 보여주는 것처럼 2 $\mu$ l를 모세관에 흡입시키는 방법으로 bioautography를 이용하여 항균력을 조사한 결과 분획 9, 10, 11에서 강력한 항균력을 확인하였다. Ap-1은 chloroform에서 Fig 6에서 같이 재결정물 2mg을 얻었으며 *E coli* JM 83에 항균력이 있는 것으로 나타났다.

Ap-2의 분리 정제 :

1) 2차 silica gel column chromatography : 첫번째 정제단계에서 얻은 시료 50mg을 silica gel이 충전된 column 상단에 가하고 chloroform : methanol(9 : 1)의 용매로 용출시켜 *E coli* BE에 항균력이 있는 분획구 60부터 70까지 모아 감압 농축한 시료 20mg를 얻어 결과를 Fig 7에 나타내었다.

2) Sephadex LH-20 column chromatography : 두번째 silica gel column chromatography에서 얻은 시료 20mg을 분자량에 의해 물질을 분리시키는 LH-20 column chromatography를 이용하여 분리하였다. 10mg씩 2회로 나누어 실시하였다. 즉, 시료 10mg을 column 상단



Fig 6. Photograph of the crystal obtained from Ap-1 fraction.

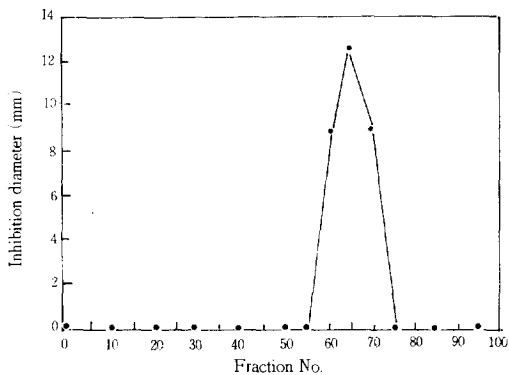


Fig 7. 2nd silica gel column chromatogram of the antibiotic Ap-1.

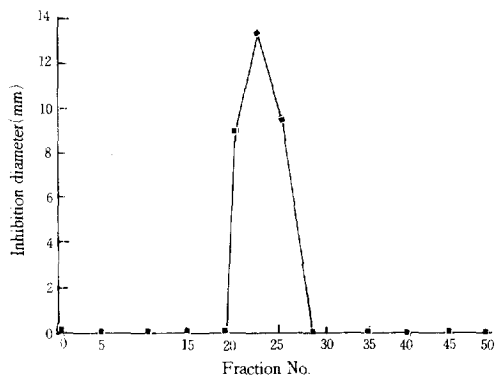


Fig 8. Sephadex LH-20 column chromatogram of the antibiotic Ap-2.

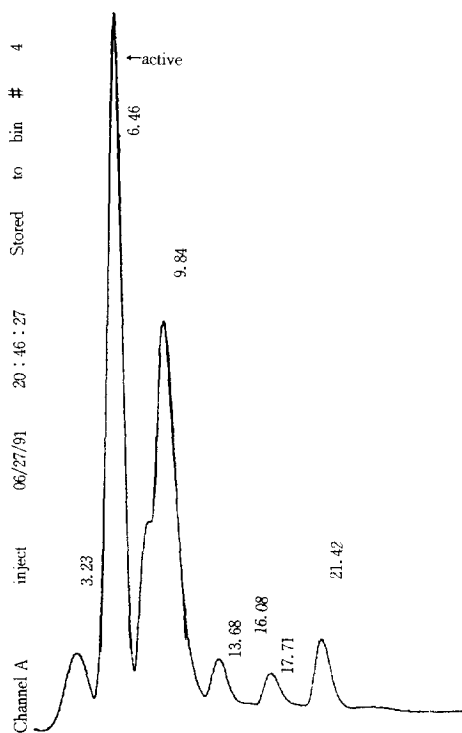
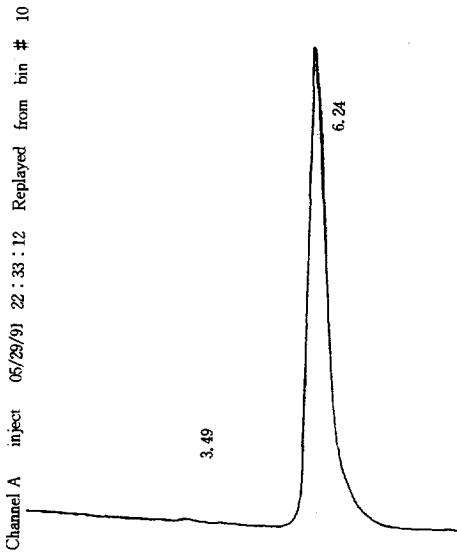


Fig 9. HPLC profile of partially purified antibiotic Ap-2.

column : RP-C18 analytic  
mobile phase : 80% MeOH

flow rate : 0.8ml/min



**Fig 10.** HPLC profile of purified antibiotic Ap-2.

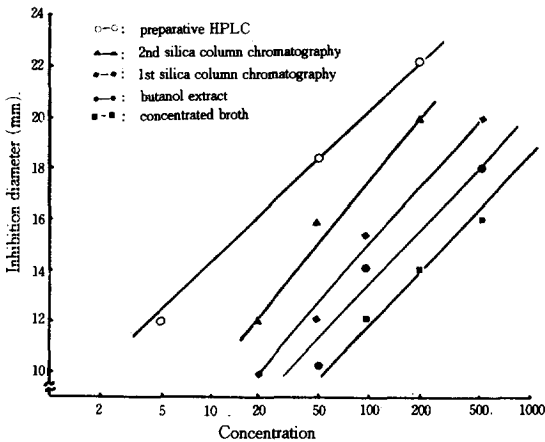
column : RP-C18 analytic      flow rate : 80% MeOH  
mobile phase : 0.8ml/min

**Table 3.** Rf value of antibiotics AP-1 and Ap-2 on silica TLC with various solvent systems

Solvent system	Rf value	
	Ap-1	Ap-2
Chloroform	0.50	0.15
Toluene : Acetic acid : Water (30 : 20 : 1)	0.90	0.82
Chloroform : Methanol (9 : 1)	0.90	0.85
Propanol : n-Hexane (1 : 1)	0.87	0.80
Chloroform : Methanol (99 : 1)	0.75	0.50

**Table 4.** Heat stability of antibiotics Ap-1 and Ap-2

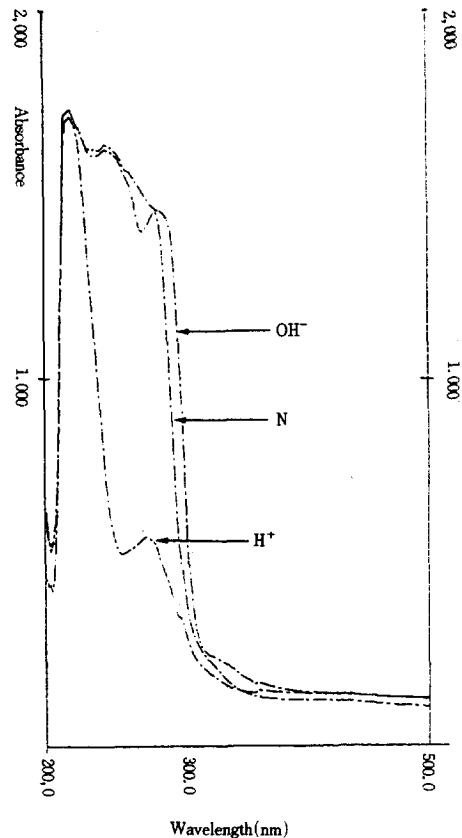
Heat treatment	Ap-1	Ap-2
Untreatment	16	17
25°C, 2 days	16	17
100°C, 2 min	15	16



**Fig 11.** Standard curves of antibiotic Ap-2 at each purification step.

**Table 2.** Color reaction of antibiotics AP-1 and AP-2

Reagent	reaction	
	Ap-1	Ap-2
Ninhydrin	+	+
2,4-Dichlorofluorescein	-	-
20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+	+
Bromocresol green	-	-
Rhodamine B	-	-
Anilinephthalate	-	-
4-Dimethylaminobenzaldehyde	+	+
Dragendorff's reagent	+	-
Molybdophosphoric acid	-	-



**Fig 12.** UV spectrum of the Ap-1 from the strain An-21-1.

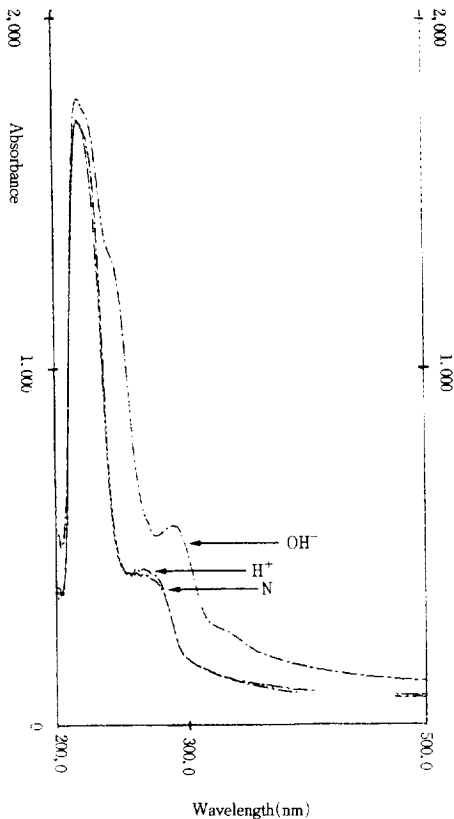


Fig 13. UV spectrum of the Ap-1 from the strain An-21-1.

에 가하고 2ml씩 용출시켰다. 각 분획구를 *E coli* BE에 대해 항균력을 조사한 결과, 분획구 20부터 27까지에서 항균활성이 나타남을 확인하였다. 활성 분획구들을 모아 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말시료 10mg을 얻었다(Fig 8).

3) HPLC에 의한 AP-2의 순수분리 : 2회의 LH-20 column chromatography에서 얻은 시료를 methanol에 소량 녹여 분석용 column에 분석하였을 때 아직 4개 이상의 물질이 혼재되어 있었다(Fig 9). 각각의 peak를 분획 채취하여 항균력을 조사한 결과 6분대의 peak만이 활성이 있는 것을 확인하였다. 활성을 나타내는 6분대의 peak를 preparative coulumn(ODS C-18)으로 활성 peak만을 모아서 감압 농축하였다. 감압 농축시료 5mg을 소량 녹여 분석용 column 상에서 단일 peak를 확인하여(Fig 10) 순수 분리된 노란색 분말 5mg을 얻었다.

이렇게 하여 얻은 결정시료 Ap-1과 Ap-2를 사용하여 물질의 각종 이화학적 특성을 조사하였다.

4) Ap-2의 정제도 : 각 정제 단계마다 얻어진 물질을 각각 1/2, 1/4, 1/8 등으로 희석하여 *E coli* BE 1186에

대한 항균력을 조사하였으며 이로써 정제효율성을 확인할 수 있었다. 그 결과는 Fig 11와 같으며 처음 시료로 이용했던 butanol 추출물로부터 최종 정제된 Ap-2까지는 그 항균력이 증가된 순도 높은 물질로 정제되었다.

항생물질의 이화학적 성질 : 분리 정제과정을 통하여 순수하게 분리 정제된 Ap-1과 Ap-2를 사용하여 물질의 이화학적 특성을 조사하였다.

1) 용해성 : Ap-1은 chloroform, benzene, hexane에 잘 녹았으며 methanol에 약간 녹고 water에는 녹지 않았다. Ap-2는 methanol에 잘 녹았으며 chloroform, water에 약간 녹았고 benzene, hexane에 전혀 녹지 않았다.

2) 정색반응 : Ninhydrin 반응과 2, 7-dichlorofluorescein, 4-dimethylaminobenzaldehyde 반응에서 양성반응을 나타내어 amino기 또는 imino기와 alkaloid, lipid의 존재를 확인할 수 있었다(Table 2).

3) Rf 측정 : 각각의 용매에서 항균물질 Ap-1과 Ap-2는 하나의 점으로 전개되었고 Ap-1이 Ap-2보다 비극성인 물질임을 알 수 있었다(Table 3).

4) 용해점 : 결정시료 Ap-1 0.1mg과 분말시료 Ap-2 0.1mg 정도의 시료를 사용하였다. Ap-1은 210°C에서 색이 변하기 시작하여 234°C에서 녹기 시작하였으며 257°C에서 갈변하여 분해되었다. 분말시료 Ap-2은 210°C에서 녹기 시작하여 237°C에서 갈변하며 분해되었다.

5) 열 안정성 : 정제된 시료를 사용하여 Ap-1과 Ap-2 물질의 열에 대한 안정성 시험을 실시한 결과는 Table 11과 같다. Ap-1, Ap-2 물질은 100°C에서 2분 가열시 항균력이 다소 떨어지는 것을 알 수 있었다.

6) UV spectrum의 측정 : 항균물질 Ap-1과 Ap-2에 대한 UV 특성을 조사한 결과를 Fig 16과 Fig 17에 나타내었다. Ap-1은 중성에서 212 nm, 260 nm에서 최대흡수치를 나타내었고, 산성 조건하에서는 212 nm, 264 nm에서 두 개의 흡수 peak를 보여 변화를 인정할 수 없으나 알칼리성의 경우 212 nm, 242 nm 및 289 nm에서 각각 흡수 peak를 나타내었다. 한편 Ap-2도 중성에서 212 nm, 251 nm, 258 nm, 264 nm에서 흡수를 관찰할 수 있었으며 산성 조건하에서의 흡수 peak 양상은 변화가 없었으나 알칼리성에서는 212 nm, 289 nm로 각각 흡수치를 나타내었다.

## 고 찰

혐기성 세균으로부터 항생물질의 분리정제에 관한 연구는 많이 이루어지고 있지 않으므로 혐기성 세균으로

부터 항생물질의 선별은 신규가능성이 매우 높다고 사료된다. 통성 혐기성세균은 혐기적 조건에서 TCA 회로를 거치지 않으므로 이차대사산물인 항생제는 생성량이 많지 않은 것으로 사료된다. 그러므로 본 실험에서는 Hungate 방법을 변형한 대량배양방법을 이용하여 실험을 수행한 결과 배양 후 120 시간째 최고의 항생능이 있음을 알았다. pH는 첫날 4.96으로 떨어진 후 일정하게 유지되었다. pH의 저하의 원인은 혐기성 세균이 발효시 lactic acid, butyric acid 등 휘발성 지방산의 생성되어 이루어지는 것으로 사료된다.

미생물의 이차대사산물인 항생물질의 분리정제는 정확한 기초실험이 수행되어야 한다. 본 실험에서도 기초 실험을 실시한 결과 butanol에 추출되는 것으로 보아 지용성 성질을 갖고 있는 것으로 추측이 되었고 양이온 교환수지와 음이온 교환수지에 용출되므로 교환수지보다는 silica gel column을 이용한 분리방법을 선택하는 것이 유리한 것으로 사료된다. silica gel column chromatography 수행결과 2개의 항생물질이 분리되었다. 앞의 fraction에서 분리한 물질을 Ap-1이라 명하고 나중에 나온 분획구를 Ap-2라 명하였다. 항균물질 Ap-1은 benzene chloroform에서 재결정화로 순수분리하였으며, Ap-2는 sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 분자량의 차이로 분리를 수행하였다. 최종 분리는 HPLC를 이용하여 순수분리 정제하였다. 분리정제된 물질의 순도를 확인하기 위하여 TLC를 수행하였다. 그 결과 여러 용매조건에서 하나의 점으로 전개되었으며 Ap-1이 Ap-2보다 비극성으로 나타났다. 이러한 결과는 용해성에서 Ap-1이 chloroform, benzene, hexane 등 비극성 용매에 잘 녹는 것과 일치한 결과이다. 작용기를 추정하기 위하여 정색반응을 실시한 결과 2, 7, -dichloro-fluorecein, 4-dimethylaminobenzaldehyde, ninhydrin 반응에서 양성반응을 나타내어 amino기 또는 imino기와 alkaloid, lipid 존재를 추정할 수 있었다. UV spectrum에서 산성 조건에서는 두 개의 흡수 peak의 변화는 인정할 수 없으나 알칼리성의 경우에는 212 nm, 289 nm로 각각 최대흡수치를 보여주었다. 이상의 성적을 종합하여 Umege index에 나와있는 유사물질과 비교하여 신규가능성을 조사한결과 일치하는 물질은 찾아볼 수가 없었다. 그러므로 이 물질의 신규가능성은 매우 높은 것으로 추정이 된다. 따라서 앞으로 실행되어야 할 실험은  $^1\text{H}$  NMR spectrum,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  CO-SY spectrum, DEPT spectrum 등 기기분석을 수행하여 구조결정이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

항생제 다제내성균인 *E. coli* JM 변이주에 대한 신규항생물질 개발을 위해 국내 토양시료로부터 혐기성 세균 *Streptococcus* An-21-1 균주를 대상으로 혐기상태에서의 대량배양과 항균물질의 분리정제를 수행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 배양기간동안 균의 성장은 20시간까지는 급격히 일어났지만 그 이후는 사멸기에 접어들었다. 균의 생육에 적합한 온도는  $37^\circ\text{C}$ 이었고, pH는 7.0이었다. 항생물질의 생산능은 배양 후 120시간째 최고치를 나타내었다.

2. 배양액으로부터 항균물질 분리정제를 위해 silica gel column chromatography, sephadex LH-20 column chromatography, HPLC를 수행하여 항균물질 Ap-1과 Ap-2를 분리정제하였다.

3. 항균물질 Ap-1과 Ap-2은 모두 234-237 nm로 비슷한 용융점을 보여주었다. 정색반응 결과 amino기, imino기, alkaloid, lipid의 존재가 있는 것으로 추정되었다. 열에는 비교적 안정하였으며, UV spectrum결과 210 nm와 280 nm에서 흡수최대치를 보여주었다. 이상의 결과로 보아 이 물질은 peptide 계통의 항생물질로 추정된다.

## 참 고 문 헌

1. Martin JF, Demain AL. Control of antibiotic biosynthesis. *Microb Rev* 1980 ; 44 : 230~251.
2. Bu'Lock JD, Hamilton MA, Hulme AJ. Metabolic development and secondary biosynthesis in *penicillium urticae*. *Can J Microbiol* 1975 ; 11 : 765~778.
3. Demain AL, Kennel YM. Resting cell studies on carbon source regulation of beta-lactam antibiotic biosynthesis. *J Ferment Technol* 1978 ; 56 : 323~328.
4. Elstmer EF, Suhadolink RJ. The biosynthesis of the nucleoside antibiotics IX. Purification and properties of guanosine triphosphate 8-formylhydrolase that catalases production of formic acid from the ureido carbon of guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 1971 ; 246 : 6973~6987.
5. Gallo M, Katz. Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phonoxazinon synthetase and actinomycin formation by glucose. *J Bacteriol* 1972 ; 109 : 659~667.
6. Aharonowitz Y, Demain AL. Nitrogen nutrition and regulation and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbio* 1979 ; 25 : 61~67.



7. Martin JF, Demain AL. Control by phosphate of candidin production. *Biochem Biophysics Res Commun.* 1976 ; 71 : 1103~1109.
  8. Omura S, Tanaka C, Kiato H. Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. *Antimicrob. agents chemother.* 1980 ; 18 : 691~695.
  9. Martin JF, Demain AL. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* 1980 ; 44 : 230~251.
  10. Krebs KD, Heusser, Wimmer H. In : Spray Reagent E. Stahl (ed.). Thin-layer chromatography. Springer Verlag. 1973 ; 854~905.
  11. Lancini G, Parenti F. In : Determination of antibiotic activity by the agar diffusion test. Antigiotics. Springer Verlag, 1982 ; 18.
-