

Streptomyces peucetius var. *caesius* 에 의한 Adriamycin 生産에 관한 研究

第一報. 변이주의 분리

申 元 澈*

Studies on the Adriamycin produced from *Streptomyces*
peucetius var. *caesius*

Part 1. Isolation of Mutant

Won-Cheol Shin

Abstract

This study was to investigate the basic research about Adriamycin production from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Streptococcus pyogenes(YUFE 2204) was sensitive against Adriamycin and its MIC value was 3.125 μ g/ml.

Several mutants were isolated by UV-light. Among 325 mutants, *Streptomyces peucetius* var. *caesius* YS-107 was showed highest productivity of Adriamycin.

I. 緒 論

Adriamycin은 anthracycline 계통의 抗生物質으로 Gram positive, Gram negative bacteria에 抗菌作用이 있으며¹⁾ 항암제로써의 효과도 있는 것으로 報告되고 있다²⁻⁶⁾.

Adriamycin은 1969年 Arcamone에⁷⁾ 의하여 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*로부터 분리, 정제되어 구조식이 Fig.1과 같이 보고되었다. Fig.1에서 보는 바와 같이 Adriamycin은 물에 녹지 않는 anthraquinone

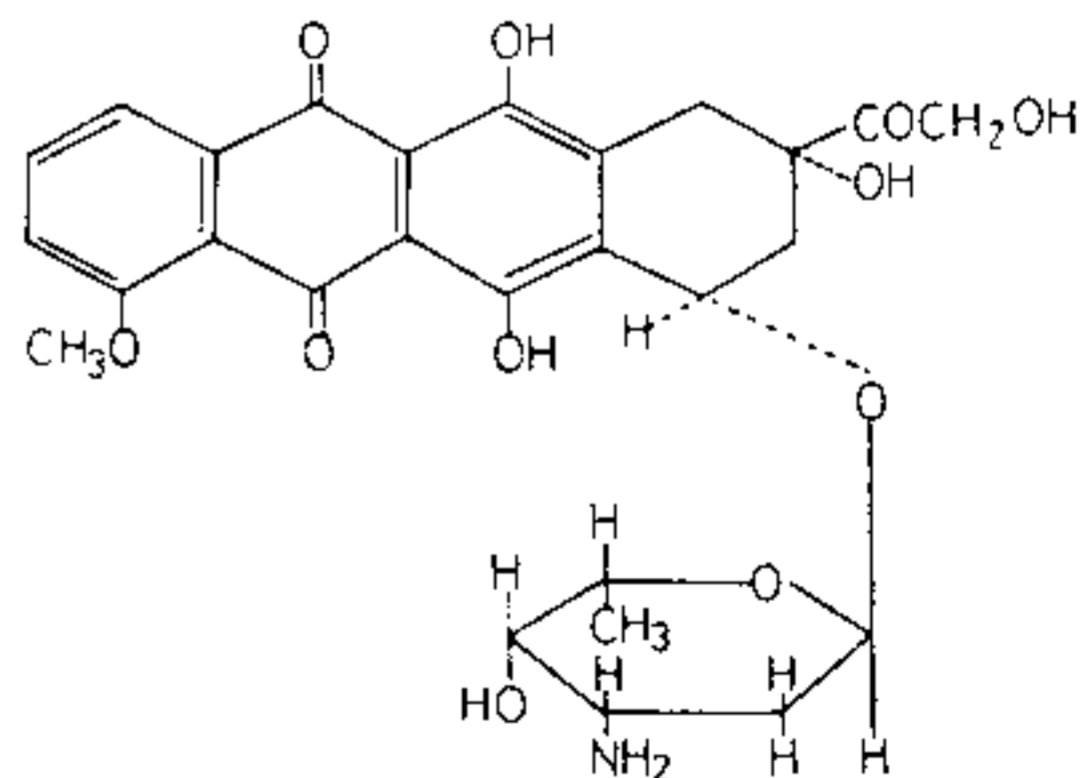


Fig. 1. Structure of Adriamycin.

* 工科大學 醱酵工學科 專任講師

chromophore와 틀에 녹는 daunosamine이 glycosidic linkage로 연결되어 있으며 高溫, 酸性和 알칼리성에서 매우 不安定한 것으로 밝혀졌다.

本 研究는 아직 우리나라에서 生産되지 않고 있는 Adriamycin의 産業化를 目的으로 자외선에 의해 生産性이 우수한 菌株를 분리하여 최적 배양 조건의 검토와 분리된 변이주로부터 生産되는 Adriamycin의 구조를 비교 검토하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 변이주의 선정

(1) 자외선 조사⁸⁾

*Streptomyces peucetius var. caesius*의 사면배양에 0.85% 생리식염수를 2ml 가하고 vortex mixer로 진탕하여 포자를 균일하게 현탁시킨 후, 0.4ml 취하여 생리식염수 3.6ml에 희석시켰다. 희석한 현탁액을 30cm 거리에서 10分 간격으로 자외선(15watt, Toshiba)을 조사시켜 현탁액을 취한후 Czapek's 한천 배지위에 도달하여 28°C incubator에서 1주일간 培養한 다음 생존율을 조사하였다.

(2) 변이주의 분리

자외선 조사에 의하여 분리한 菌을 peptone 0.6%, dry yeast 0.3%, CaCO₃ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.01% (pH 6.4)의 종배양액에 접종하여 28°C에서 48時間 동안 진탕배양하였다. 生産用 基本 培地로서는 glucose 6.0%, dry yeast 2.5%, NaCl 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, CaCO₃ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.01%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001%, ZnSO₄ 0.001% (pH 6.7)에 종배양액을 일정량씩 접종하여 28°C에서 96時間 진탕배양하였다. 배양후 피검균인 *Streptococcus pyogenes*(YUFE 2204)를 도달한 한천 평판배지에 paper disc method⁹⁾를 사용하여 30°C에서 하룻밤 배양 후 저지대가 찬균주 보다 크게 생기는 균주를 선별하였다.

2. Adriamycin의 정량법

Adriamycin의 정량은 Arcamone이⁷⁾ 사용한 Fig.2와 같은 정량법을 利用하였다.

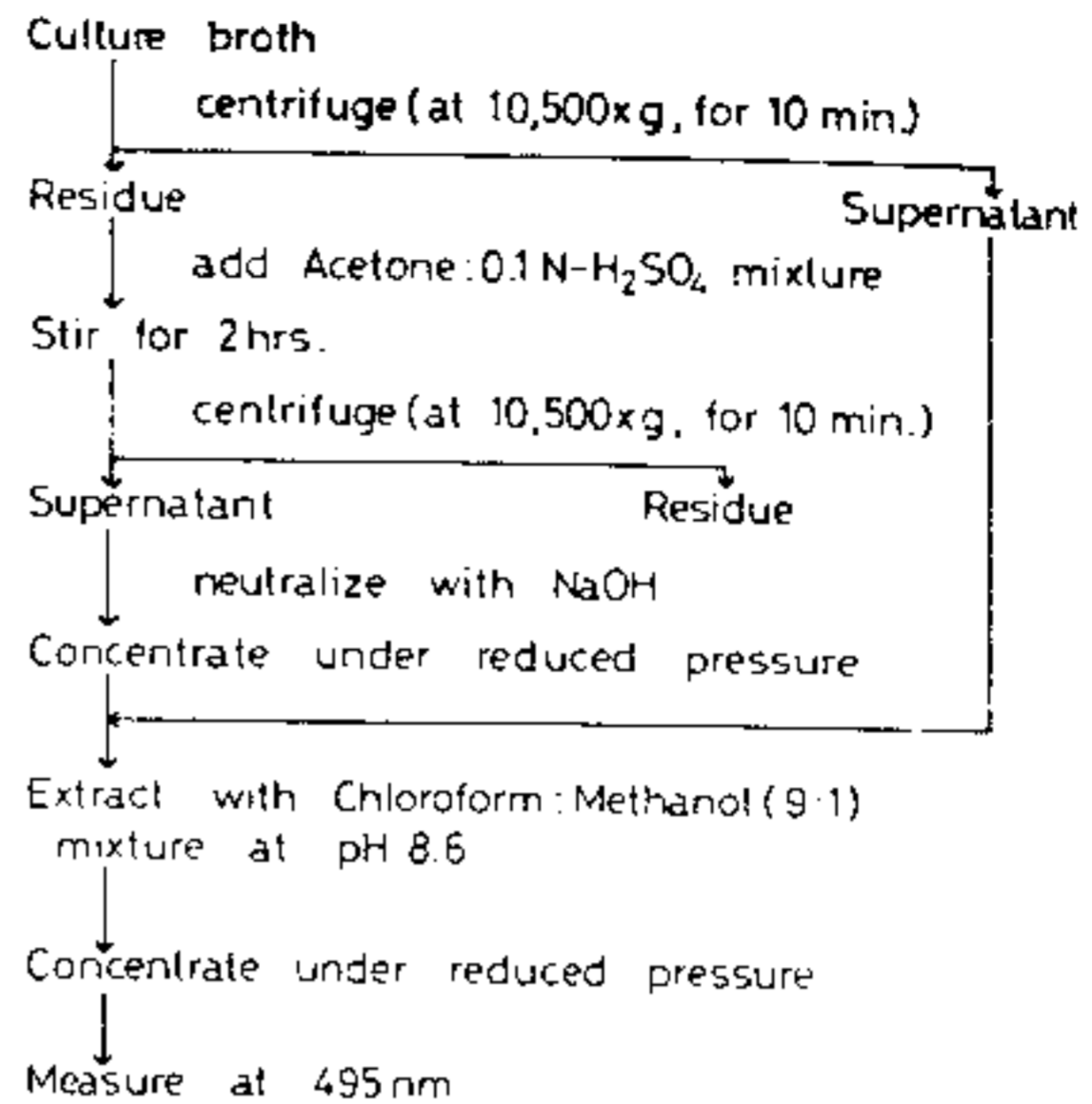


Fig.2. Procedure of quantitative analysis.

3. Adriamycin의 분리 및 정제

Adriamycin의 분리는 anthracycline 계통의 抗生物質을 분리하는 方法을 使用하였다^{10,11)}. (Fig.3) 배양액을 원심 분리하여 菌體를 모은

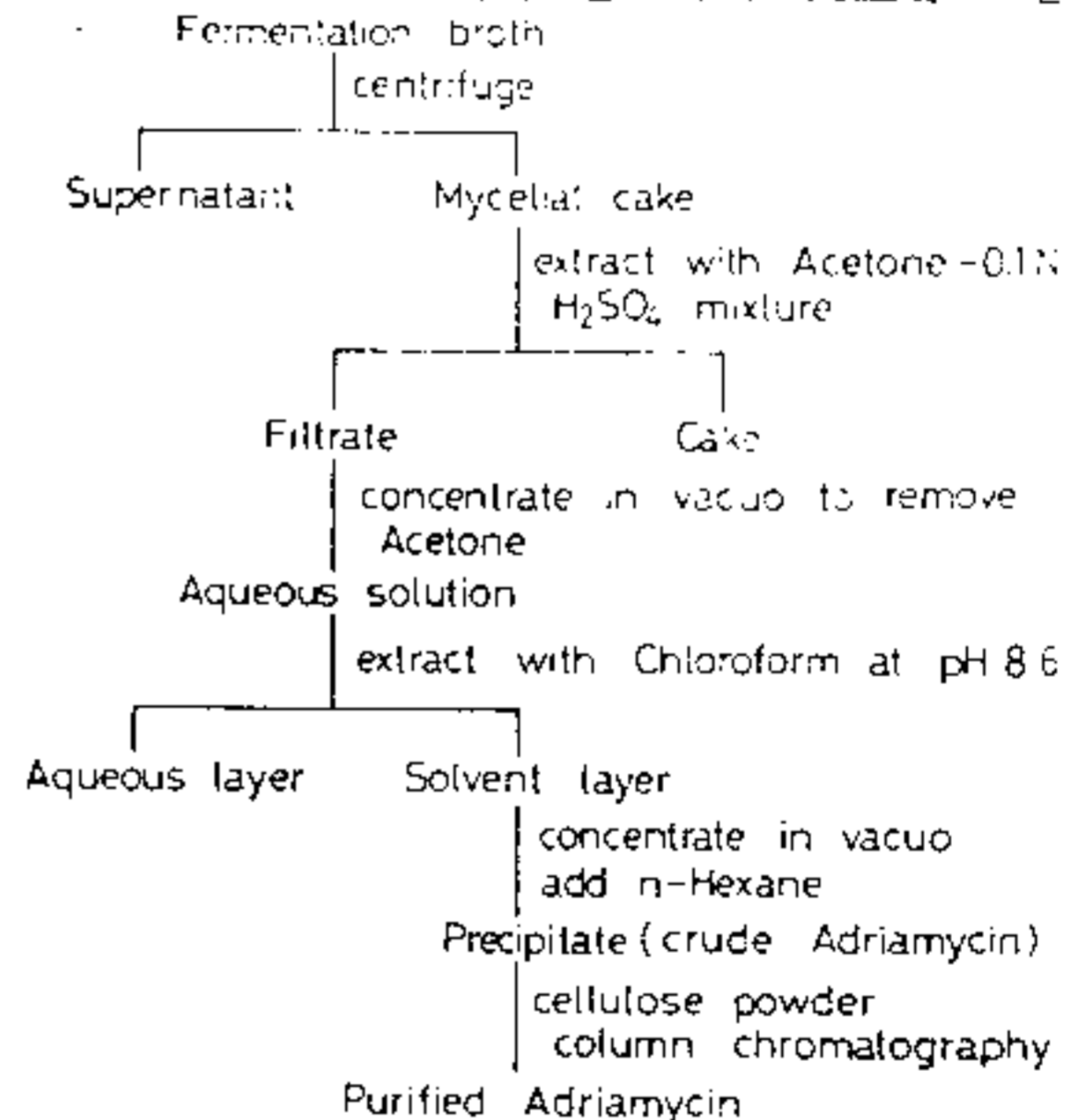


Fig.3. Purification method of Adriamycin. 후, acetone-0.1N H₂SO₄(4:1) 혼합물로 3회 추출하고 농축시킨 후 pH 8.5에서 chloroform-methanol(9:1) 혼합물로 추출하였다. 추출액을 methanolic-chloride로 pH 5.0으로 조절한 후 감압 농축시키고 과량의 n-hexane을 첨가하여 column chromatography를 行하였다.

III. 實驗結果 및 考察

1. Adriamycin의 검량곡선과 항균력 검사

Adriamycin을 定量하기 위하여 Adriamycin

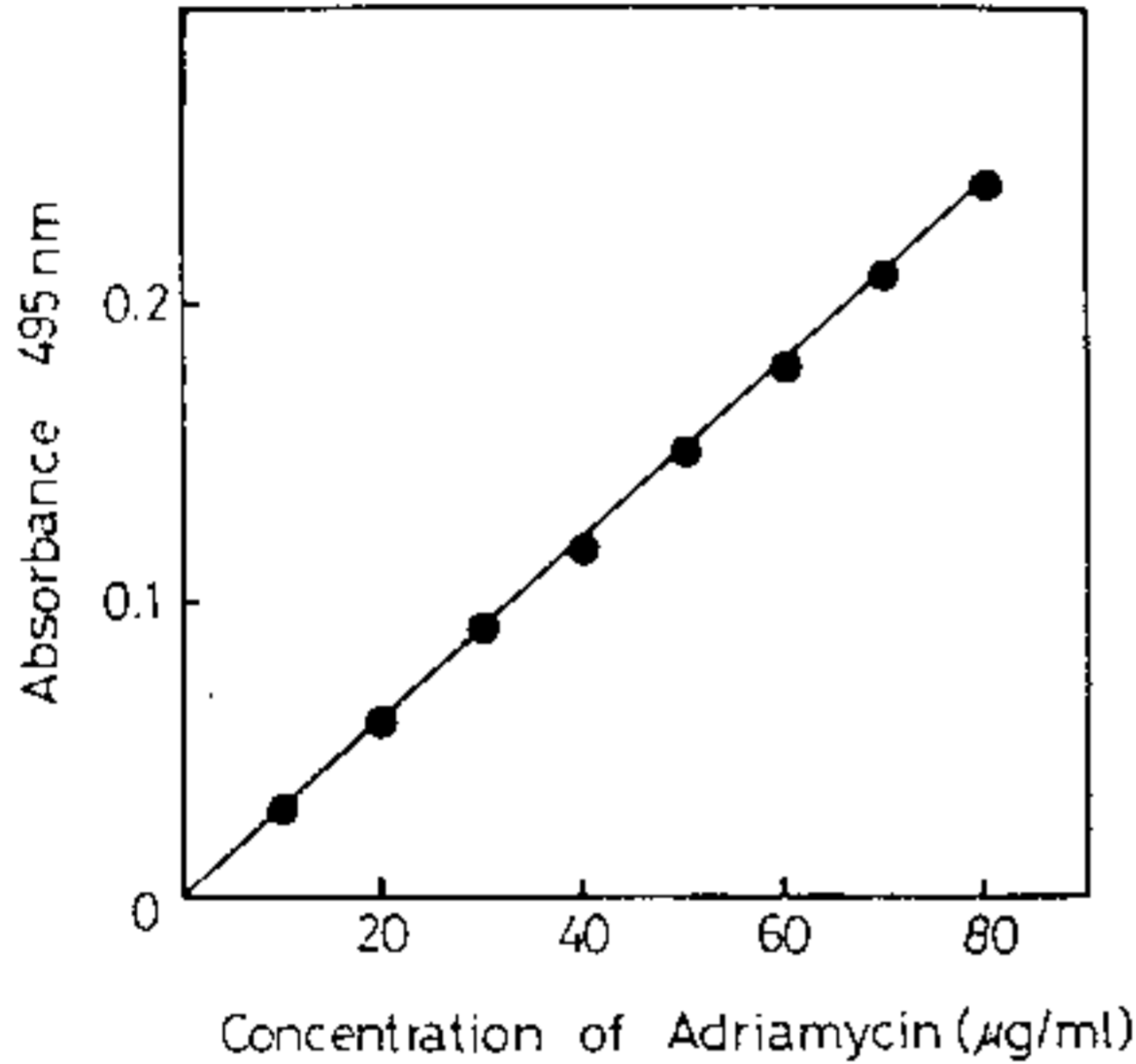


Fig. 4. Standard curve of Adriamycin at 495nm.

Table 1. Antispectra of Adriamycin.

	Concentration of Adriamycin (µg/ml)					
	100	50	25	12.5	6.25	3.125
<i>Streptococcus pyogenes</i> (YUFE 2204)	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (YUFE 2087)	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> (IAM 1025)	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> C600 (YUFE 2035)	+	+	+	+	+	+

+ : Growth
- : Non growth

2. Adriamycin 生産菌의 변이와 선별

*Streptomyces peucetius var. caesius*를 10分 간격으로 자외선을 조사하여 Peptone-Czapek's 한천 배지에 일정량 도달한 후 28°C에서 1주일간 배양한 뒤 생존율을 조사하였다.

의 최석역을 495nm에서 농도와 흡광도의 관계를 나타낸 결과로서 Fig. 4와 같은 검량곡선을 얻었다.

Adriamycin의 生産力價를 검정하기 위하여 Adriamycin의 抗菌 spectrum을 아래와 같이 검토하였다.

Nutrient broth에서 하룻밤 배양시킨 *Streptococcus pyogenes*(YUFE 2204), *Staphylococcus aureus*(YUFE 2087), *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 25619), *Proteus vulgaris*(IAM 1025), *E. coli* C600(YUFE 2035)을 serial dilution method에 의해 實驗을 行한 결과, MIC(Minimum Inhibitory Concentration)는 *Streptococcus pyogenes*(YUFE 2204) 3.125µg/ml, *Staphylococcus aureus*(YUFE 2087) 50µg/ml로 나타났다. 따라서 Adriamycin 生産菌을 변이시켜 변이주의 生産力價를 비교하는 screening에서는 Adriamycin에 감수성이 높은 *Streptococcus pyogenes*(YUFE 2204)를 피검균으로 使用하였다(Table 1).

Fig. 5에서 보는 바와 같이 *Streptomyces peucetius var. caesius*의 경우 15分 조사로써 99%가 사멸되었고 99.9% 사멸은 25分이 소요되었다. 자외선 조사로 분리된 균주는 빨간색을 나타내는 균주 26주, 분홍색 154주, 노란색 154주, 흰색 15주 등 총 349주 이었다. 이 균

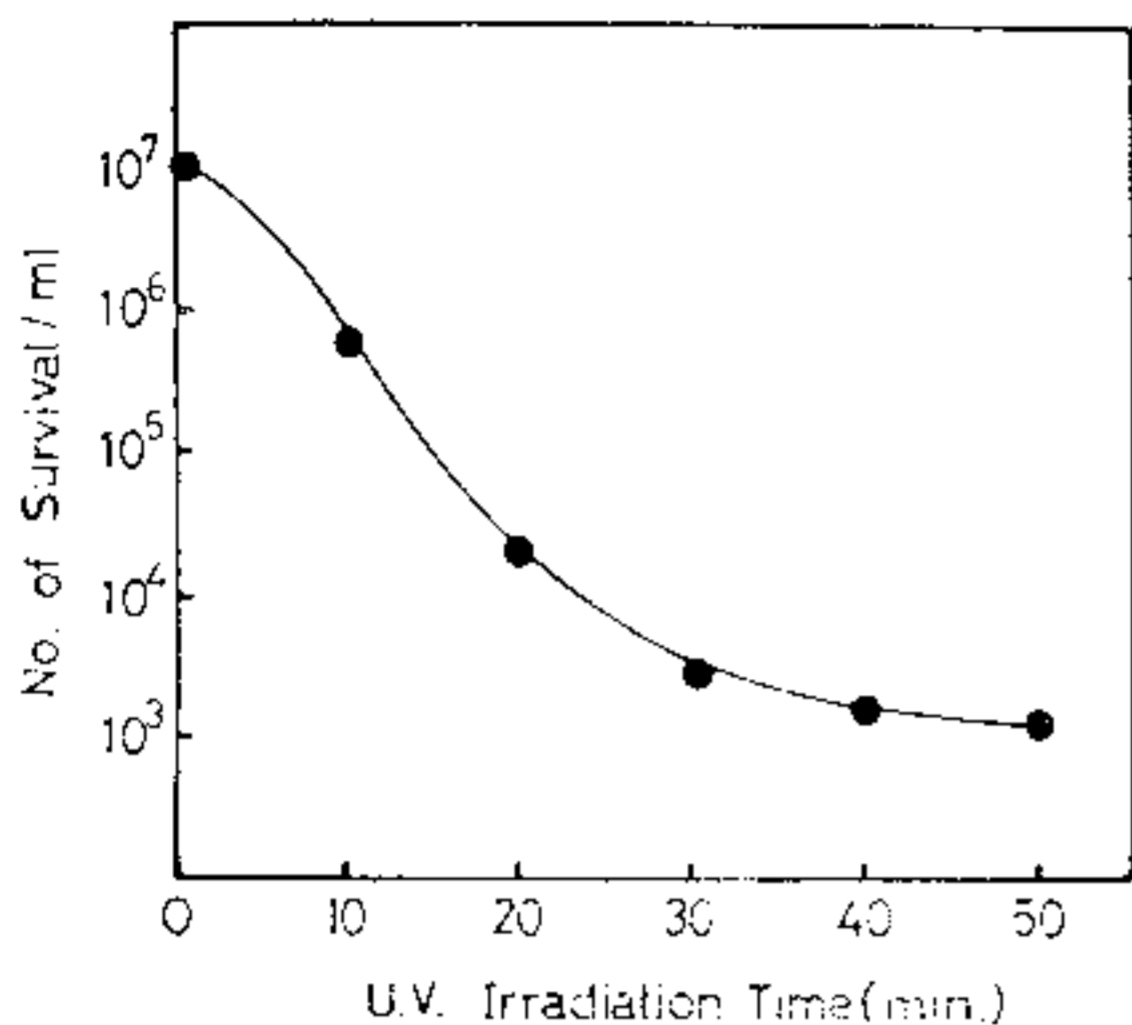


Fig. 5. Survival of *Streptomyces peucetius* var. *caesius* after U.V. irradiation.

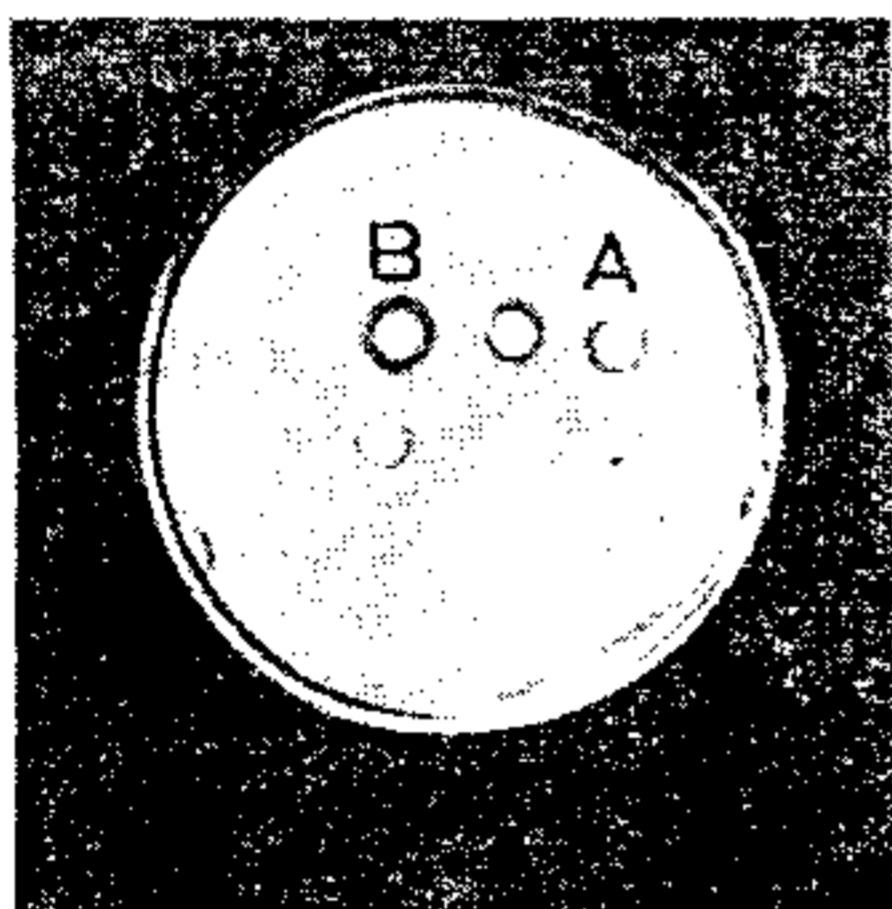


Fig. 6. Antimicrobial activity of mutants.
A: *Streptomyces peucetius* var. *caesius*
B, *Streptomyces peucetius* var. *caesius* YS-107

들을 Adriamycin 생산 기본 배지에 접종하여 28°C에서 96시간 진탕 배양한 다음 *Streptococcus pyogenes*(YUFE 2204)를 피검균으로 하여 배양액을 paper disc method에 의해 친균주 보다 항균력이 높은 12菌株를 분리하였는데 분리된 균은 colony가 빨간색과 분홍색을 나타내는 균주였다. 12균주를 같은 방법으로 2次 선별한 결과 친균주 보다 抗菌力이 높게 나타나는 *Streptomyces peucetius* var. *caesius* YS-107을 택하여 앞으로의 실험에 사용하였다(Fig. 6).

IV. 結 論

항균력과 항암효과를 지닌 Adriamycin을 生産하기 위한 基礎研究로서 정성, 정량방법의 확립과 新菌株보다 生産性이 우수한 변이주의 선별에 관한 實驗을 行하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

Adriamycin 생산성이 높은 변이주를 분리하기 위하여 피검균으로서는 *Streptococcus pyogenes*(YUFE 2204)가 적당하였고 이균의 MIC는 3.125 μ g/ml이었다.

25%의 자외선 조사에 의하여 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*는 99.9%가 사멸되었고 총 319주의 변이주중 2次 screening을 行하여 가장 生産性이 좋은 *Streptomyces peucetius* var. *caesius* YS-107 균주를 선별하였다.

앞으로 이 변이주를 利用하여 최적 배양 조건 및 구조에 관한 研究를 進行하고자 한다.

V. 參 考 文 獻

1. Arcamone, F.; U.S. Patent, 3590028 (1971).
2. Middleman, E., Luce, J.K. and Frei, E. III.; *Cancer*, 28, 844~850 (1971).
3. Wang, J.J.; *Cancer Res.*, 32, 511~515 (1972).
4. Iwamoto, Y., Hansen, I.L., Porter, T. II. and Folkers, K.; *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, 58, 633~638 (1974).
5. Mailer, K. and Petering, D. II.; *Biochem. Pharmacol.*, 25, 2085~2089 (1976).

6. Kim, O. K., Kim, D. S. and Lee, Y. B. ; *Yonsei Journal of Medical Science*, **13**, 1~14 (1980).
7. Arcamone, F. ; *Biotech. & Bioeng.*, **6**, 1101~1110 (1969).
8. 유주현, 양용, 양한철, 정동호 ; 식품공학실험 II, 탐구당, pp. 179~180 (1975).
9. 유주현, 양용, 양한철, 정동호 ; 식품공학실험 II, 탐구당, pp. 498 (1975).
10. Cassinelli, G. ; *J. Antibiotics*, **33**, 1468~1473 (1980).
11. Morris, C. J. O. R. and Morris, H. ; *Seperation Method in Biochemistry*, A Halsted Press Book, pp. 362~408 (1976).